



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*
(การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร

สิงหาคม 2543



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ *Molecular Typing of Cryptococcus neoformans*
(การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร

สิงหาคม 2543

สัญญาเลขที่ PDF/54/2540

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*
(การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา)

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของนักวิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code: PDF4080054

Project Title: Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Ariya Chindamporn, Chulalongkorn University

E-mail Address: fmedacd@md2.md.chula.ac.th

Project Period: 2 years and 4 months

To study the prevalence, phenotype and genotype of clinical isolated *Cryptococcus neoformans*, the cultures in Mycology unit, King Chulalongkorn Memorial Hospital from August 1997 to July 1999 were recruited. The microscopic morphology examination using India-ink preparation, biochemical identification kit, API 20CAUX (BioM'erieux, France), urease test, phenol oxidase test were performed to obtain the genus and species. Their varieties and serotypes were examined by canavanine-glycine medium and CrytoCheck (Iatron, Japan) respectively. The polymorphism in the hypervariable region using minisatellite M13 primer in the polymerase chain reaction or so called PCR-RAPD profile was used for genotypic study. A total of six hundred thirty eight strains from cryptococcal meningitis patients were isolated from cerebrospinal fluid (97%) and others (3%). Most of the patients whom the specimens were sent were suffered from HIV infection (50.5% of the available data, the total data was available only 53%). In contrast, only four non-HIV infected patients whom physicians diagnosed as SLE were included. The phenotype and serotype results revealed that all these cultures were *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A (*C. grubii*). Further, one hundred forty strains were used to investigate for the PCR-RAPD profile. Among these strains, three types of the profiles (96.5%, 2.8%, and 0.7%) were found. The major type were indistinguished from the VNI genotype from the report of Meyer et al. Another two types bearing the 2-3 intense bands different from the VNI type. The polymorphic profiles were found in 3 strains isolated from 1/5 cases (HIV infected patients) whom admitted 2-3 episodes and 1 strain from 1/3 cases (SLE patients). The genotypic profile of these four strains were the same and different from the major type. The last profile was from the individual isolate from HIV-infected patient. In conclusion, the result of phenotype and genotype was corresponsed to each other but the later using PCR-RAPD method revealed more degree of strain discrimination. However, to confirm this discrimination with other molecular technique is suggested.

Keywords: PCR-RAPD, M13 primer, molecular typing, *Cryptococcus neoformans*

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF4080054

ชื่อโครงการ: การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา

ชื่อนักวิจัย: รศ. ดร. อริยา จินตามพร

E-mail Address: fmedacd@md2.md.chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 4 เดือน

การศึกษาความชุก ลักษณะทางกายภาพ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยใช้เชื้อที่ส่งยังหน่วยเชื้อรา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือน สิงหาคม 2540 ถึงเดือนกรกฎาคม 2542 วิธีการแยก genus และ species อาศัยการศึกษาทางจุลทรรศน์วิทยาด้วย India-ink preparation, การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย API 20C AUX (BioMérieux, France), urease test, phenoloxidase test และวิธีการแยก variety และ serotype ด้วย canavanine-glycine medium และ CryptoCheck (Iatron, Japan) ตามลำดับ ลักษณะทางพันธุกรรมศึกษาจากความหลากหลายในบริเวณ hypervariable โดยวิธี PCR-RAPD ใช้ M13 primer เชื้อจำนวนหกร้อยสามสิบแปดสายพันธุ์แยกได้จากน้ำไขสันหลัง (97%) และจากสิ่งส่งตรวจอื่น(3%)จากผู้ป่วย cryptococcal meningitis ผู้ป่วยเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี (50.5% จากข้อมูลที่มี, ข้อมูลที่มีอยู่ทั้งหมดคิดเป็น 53% ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด) มีผู้ป่วยในกลุ่มนี้ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี และเป็นโรค SLE เพียง 4 คน ผลจากการศึกษา phenotype และ serotype พบว่า เชื้อทั้งหมดเป็น *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A (*C. grubii*) จากนั้น ได้ทำการศึกษารูปแบบ PCR-RAPD ของเชื้อจำนวน 140 สายพันธุ์ และพบว่า มี 3 รูปแบบ (96.5%, 2.8%, and 0.7%) เชื้อส่วนใหญ่มีรูปแบบเช่นเดียวกับรูปแบบ VNI ที่รายงานโดย Meyer และคณะ รูปแบบอีกสองรูปแบบนั้นมีจำนวนแถบ DNA ที่แตกต่างจากรูปแบบแรกประมาณ 2-3 แถบ รูปแบบที่หลากหลายพบในเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย 1 ใน 5 คน (กลุ่มติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล 2-3 ครั้ง และ 1 สายพันธุ์จากผู้ป่วยจำนวน 1/3 คนที่เป็น SLE เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีรูปแบบเดียวกันซึ่งแตกต่างจากรูปแบบ VNI อีกหนึ่งรูปแบบพบในเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วีที่เข้ารับการรักษาเพียงครั้งเดียว โดยสรุป ผลการทดลองของ phenotype และ genotype มีความสอดคล้องกันโดยวิธี PCR-RAPD ให้ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่ละเอียดกว่า อย่างไรก็ตาม ควรยืนยันความหลากหลายนี้ด้วยวิธีอื่น

คำหลัก: PCR-RAPD, M13 primer, molecular typing, *Cryptococcus neoformans*

Acknowledgement

1. ทู่นสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
2. เจ้าหน้าที่หน่วยร่ววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. คุณพัชรี กัมมารเจษฎากุล และคุณกมลรัตน์ โพธิ์ปิ่น ที่ได้ช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการ
4. The Hitachi Scholarship Foundation, Japan. สำหรับการสนับสนุนในการเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง "Molecular and Serological Characterization of *Cryptococcus neoformans* from Thai Clinical Isolates" โดย Ariya Chindamporn, Patcharee Kammanchasadakul, and Samaniya Sukroongreung. ในการประชุม 9th International Congress on Infectious Diseases, April 10-13, 2000 ที่ Buenos Aires, Argentina
5. ศาสตราจารย์ กิตติคุณ แพทย์หญิงสมนีย์ มิลินทรานุกร ที่กรุณาเป็น mentor

การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา (Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*)

โรค cryptococcosis เกิดจากเชื้อราฉวยโอกาส encapsulated yeast ชื่อ *Cryptococcus neoformans* ที่มักจะก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะผู้ป่วยเอดส์ ส่วนของ capsule ของเชื้อนี้ประกอบด้วย polysaccharide ที่ต่างกัน ทำให้แบ่งเชื้อได้เป็น 2 varieties คือ var. *neoformans* (serotype A, D, AD) และ var. *gattii* (serotype B, C) ยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนที่แสดงถึงความแตกต่างของอาการและหรือพยาธิสภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อที่ variety ต่างกัน กล่าวกันว่า ผู้ป่วยที่เป็นโรคที่เกิดจาก *C. neoformans* var. *gattii* มักเป็น competent host ขณะที่ ผู้ป่วยที่เป็นโรคที่เกิดจาก *C. neoformans* var. *neoformans* มักเป็น immunocompromised host ในปี 1999, Franzot SP et al. จัดแบ่ง serotype A จาก serotype D เป็น variety ใหม่ ชื่อ *C. neoformans* var. *grubii* มีหลักฐานที่แสดงถึงการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อทั้ง serotype เดียวกันและต่างกัน หลักฐานเหล่านั้นส่วนใหญ่เป็นข้อมูลสรุปจากต่างประเทศ และมักใช้อ้างอิงในการประชุมวิชาการด้านโรคติดเชื้อทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศอยู่เนืองๆ ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีอุบัติการณ์ของโรคเอดส์สูง และผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่นๆอีกมาก จากจุดนี้จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษา รวบรวมข้อมูลของประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นแนวทางและด้านลึก ตัวอย่างข้อมูลที่น่าสนใจ เช่น อุบัติการณ์ของโรค อุบัติการณ์ของเชื้อ (variety ใด serotype ใด) ทั้งสองอุบัติการณ์มีความสัมพันธ์กับสภาวะผู้ป่วยอย่างไร เชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อใหม่เป็นชนิดเดิมหรือไม่ เหล่านี้เป็นคำถามที่จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคและของเชื้อก่อโรค

วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. ศึกษาความชุกของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วง 24 เดือน
2. พิสูจน์แยกชนิดของยีสต์นี้ว่าเป็น serotype ใด variety ใด
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อที่แยกได้กับประวัติของผู้ป่วย (ผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และหรือเป็นผู้ป่วยเอดส์หรือไม่)

4. ศึกษา molecular fingerprint ของ *Cryptococcus neoformans* ทั้งสอง varieties ที่แยกได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัย minisatellite phage M-13 core sequence เป็น primer

บททวนวรรณกรรม

Cryptococcus neoformans เป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุก่อโรค cryptococcosis โดยส่วนใหญ่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง Buss (1984) รายงานเป็นครั้งแรกถึงการแยกเชื้อนี้ได้จากรอยโรคในผู้ป่วย ปีเดียวกัน Sanfelice แยกเชื้อนี้ได้จากน้ำผลไม้และน้ำนม ปรากฏว่า ในช่วงประมาณ 10 ปีนี้ มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคนี้มากขึ้น โดยพยายามปรับปรุงวิธีการวินิจฉัยโรค วิธีพิสูจน์แยกชนิดเชื้อ ศึกษาการก่อโรค ศึกษาพยาธิวิทยา รวมทั้งระบาดวิทยา เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคเพิ่มขึ้นและการเพิ่มนี้สอดคล้องกับการเพิ่มของอุบัติการณ์ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่น เช่น การปลูกถ่ายอวัยวะ มะเร็งเม็ดเลือดขาว เบาหวาน ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเป็นประจำ เป็นต้น ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้มีโอกาสที่จะเป็นโรคนี้ได้อีกและสามารถถึงแก่ชีวิตได้ จากรายงานของ Speed และคณะ (1994) พบว่าอุบัติการณ์โรค cryptococcosis ในมลรัฐวискอนซินเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า จากการคำนวณในปี 1980 – 81 และ 1989 – 90 ซึ่งเป็นช่วงที่อุบัติการณ์ผู้ป่วยเอดส์เพิ่มขึ้น นอกจากเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคในคนแล้วยังสามารถทำให้เกิดโรคในสัตว์ได้ด้วย ตามที่มีรายงานพบว่าทำให้เกิดพยาธิสภาพในแมว และใน ferret สำหรับประเทศไทย ได้มีรายงานการพบโรคนี้เป็นครั้งแรกโดยสถิตินิมานการและคณะ (1960)

เชื้อที่ก่อให้เกิดโรค cryptococcosis นี้ มี 2 varieties คือ var.*neoformans* serotype A, D, AD และ var.*gattii* (serotype B,C) (*C. basicillisporus*) การก่ออาการและอาการแสดงในผู้ป่วย การรักษา นิเวศวิทยาและระบาดวิทยามีความแตกต่างกันโดย var.*neoformans* มักจะเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเอดส์ และมีรายงานจากประเทศต่างๆทั่วโลกซึ่งสอดคล้องกับนิเวศวิทยาของเชื้อที่พบว่าเชื้อนี้เป็นป็นป้อนในดิน มูลนก และตามเปลือกไม้ เช่น เปลือกต้นยูคาลิปตัส ต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*, *E. teleiticornis*) บริเวณใกล้เคียงต้นยูคาลิปตัส ทั้งในเขตร้อน และเขตอบอุ่น ขณะที่อีก variety นั้นมักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคใน healthy host มีรายงานน้อยที่พบเป็นผู้ป่วยเอดส์เมื่อเปรียบเทียบกับ variety แรก ด้านระบาดวิทยา โดยส่วนใหญ่เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อเอช ไอ วี ทั่วโลกมักเป็น serotype A สำหรับการติดเชื้อจาก serotype D มักพบในแถบยุโรป เช่น ในประเทศฝรั่งเศส

อิตาลี เดนมาร์ก เป็นต้น ผู้ป่วยเหล่านั้นมักเป็นผู้ป่วยที่สูงอายุกว่าอีกกลุ่ม และมักมีพยาธิสภาพที่ผิวหนังและมีประวัติการใช้ corticosteroid Franzot SP และคณะ (1999) รายงานความแตกต่างทั้ง phenotype และ genotype ระหว่าง serotype A และ serotype D จึงจัดแยก serotype A จาก variety *neoformans* ตั้งชื่อใหม่เป็น var. *grubii*

เนื่องจากวิทยาการก้าวหน้าทางอณูวิทยาทำให้เกิดเทคนิคใหม่ขึ้นที่สามารถจะศึกษา DNA polymorphism ได้ ทำให้ความรู้เกี่ยวกับระบาดวิทยา ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มความละเอียดและแม่นยำในการพิสูจน์แยกชนิดเชื้ออีกด้วย โดยความสามารถของ Schwarz และ Cantor (1982) ที่คิดค้นเทคนิคการศึกษา chromosomal pattern (karyotype) ขึ้น Perfect และคณะ (1989) ได้อาศัยหลักการ DNA polymorphism และเทคนิคที่คิดค้นใหม่ (contour clamped homogeneous field gel electrophoresis) นี้ในการบ่งชี้ความแตกต่างของ strain จากนั้น Polacheck และคณะ (1992) ปรับปรุงหลักการใช้ repetitive DNA sequences ที่ใช้ในการวินิจฉัยและแยกพิเคราะห์เชื้อและศึกษาระบาดวิทยาใน *Candida albicans* มาพัฒนาการศึกษา DNA fingerprint ในเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในอเมริกาและประเทศแอฟริกา โดยใช้ specific probes CND1.4 (specific กับ serotype A, D) และ CND1.7 (*C. neoformans* specific probe) hybridize กับ restriction fragment length polymorphic (RFLP) DNA จากการทดลองพบว่า สามารถแยก serotype A, D จาก B, C ได้ (หรือแยก variety ได้) ต่อมามีการปรับปรุงใช้ probe ชนิดอื่นที่เป็น repetitive sequence เช่น CNRE-1, UT-4p เป็นต้น ด้วยข้อจำกัดของการศึกษา karyotype ที่ต้องเตรียม DNA อย่างมีนวล และระวังไม่ให้เกิดการแตกหักของ chromosome และต้องใช้เวลานานเช่นเดียวกับ Southern hybridization Vilgalys และคณะ (1990) อาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) ในขบวนการนี้เวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยกว่าและมีความไวจำเพาะสูงกว่าวิธีที่กล่าวข้างต้น primers ที่ใช้ คือ SR1-R, 5.8S, 5.8s-R, LR-1, LR-3, LR-5, LR-6, LR-7, LR7-R และ LR-12 ผลปรากฏว่าสามารถแยก serotype ได้และเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้ออีกด้วย นอกจากนี้ primers ข้างต้นที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนใน PCR แล้ว ยังมี primers อื่นอีก เช่น ITS1, ITS4, CN4, CN5, CN6 เป็นต้น การทดลอง PCR ที่กล่าวข้างต้นนี้ต้องอาศัย primers เป็นคู่ (sense, antisense) ในการเพิ่มจำนวน DNA sequence ที่สนใจ โดย Meyer และคณะ (1993) พัฒนาการศึกษา DNA fingerprint ด้วย PCR และ random amplification of polymorphic DNA (RAPD) อาศัย oligonucleotide primer เพียง 1 ชนิด ซึ่งปรับปรุงมาจาก oligonucleotide probe ชนิดของ primer ที่ใช้มีคุณสมบัติเป็น minisatellite กระจายอยู่ใน genome ของเชื้อ และสามารถเพิ่มจำนวน DNA ในช่วง hypervariable ได้ การทดสอบด้วย single primer ให้ผลที่แน่นอนเมื่อ

ทดลองซ้ำ (reproducibility) และมีความจำเพาะสูงเช่นกัน single primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาและสามารถในการศึกษาระบาดวิทยาได้โดยรายงานของ Meyer และคณะ (1993) นี้ และ Sorrell และคณะ (1996) คือ phage M-13 core sequence (GAGGGTGGXGGXTCT) ซึ่งผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยชุดหลังทำให้ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาในทวีปออสเตรเลียว่า *C.neoformans* var.*gattii* (*C. bacillisporus*) ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นโรค cryptococcosis มีรูปแบบ PCR fingerprint และ RAPD pattern คล้ายกับ *C.neoformans* var.*gattii* ที่แยกได้จากต้นยูคาลิปตัสและยังพบว่าเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระหมีโคลามีสัญลักษณ์ genotype เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากต้นยูคาลิปตัสที่มีนั้นใช้เป็นอาหาร

วิธีการทดลอง

1. กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ผู้ป่วยที่เป็นโรค cryptococcosis และแยกได้เชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทุกรายที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วง 24 เดือน
2. แยกวิเคราะห์เชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ ด้วยวิธีต่อไปนี้
 - a. แยกวิเคราะห์เชื้อที่ได้ด้วย API Kit
 - b. พิสูจน์ยืนยัน species *neoformans* ด้วยอาศัย urease test, phenoloxidase test โดย species นี้ให้ผล urease test positive และให้ brown pigment เมื่อทดสอบด้วย phenoloxidase test
 - c. ศึกษา variety ด้วย canavanine-glycine medium (CGB-medium)
 - d. ศึกษา serotype ด้วยน้ำยา CryptoCheck kit (Iatron, Tokyo, Japan) (อภิสิทธิ์จากการจาก Dr. T. Kanbe, Nagoya University School of Medicine, Japan)
 - e. เก็บเชื้อทั้งหมดไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส
3. รวบรวมข้อมูลผู้ป่วยที่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากบันทึกประวัติผู้ป่วยว่าอยู่ในสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือไม่ อย่างไร บันทึกอาการและอาการแสดงของผู้ป่วย บันทึกการตรวจพบว่าเป็นการติดเชื้อใหม่ (reinfection) หรือไม่ อาการข้างเคียงอื่นๆและการรักษา
4. ศึกษา PCR fingerprint ของเชื้อทั้ง 2 varieties ด้วยอาศัย single primer