

ABSTRACT

The pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* is a fungus-like microorganism that causes a life-threatening infectious disease, called pythiosis, in humans and animals living in tropic and subtropic countries. Thailand is an endemic area of human pythiosis. Basic information about *P. insidiosum*'s natural history is still very limited. New cases of pythiosis have been increasingly reported. Patients suffer from this disease and have poor prognosis. Diagnosis of pythiosis is difficult. Conventional antifungal drugs are ineffective for treatment. Surgical removal of infected organs (mostly, eyes and legs; leading to life-long disabilities) and death from progressive infection are common outcomes. Regarding diagnosis, there are needs for rapid, reliable, and easy-to-use diagnostic tests. Regarding treatment, it is apparent that more needs to be done in the way of basic research to provide insights into *P. insidiosum*'s biology and pathogenesis, and thereby lead to the discovery of novel strategies for pathogen and infection control, such as, new antimicrobial agents and vaccines. Here, we report two newly-developed serodiagnostic tests (user-friendly formats of immunochromatography and hemagglutination) for facilitating rapid and reliable diagnosis of human pythiosis. The tests have high detection specificity and sensitivity, and a short turn around time of 30-60 minutes. We also report a genetic identification and characterization of the 74-kDa immunodominant protein of *P. insidiosum*, which is a potential virulence factor, diagnostic target, and vaccine candidate. The 74-kDa immunodominant antigen is encoded by a putative exo-1,3-beta glucanase gene. Glucanase genes are an interesting group of genes since in some pathogenic fungi, they have roles play in pathogenesis (adhesion and invasion) and host immune responses (stimulation of host immunity). Based on the glucanase gene, 22 *P. insidiosum* clinical isolates are divided into 2 phylogenetic groups. Because genetic and genomic information is lacking for *P. insidiosum*, which makes molecular studies of this pathogen difficult, we have undertaken an EST study, and report on the first dataset of 486 ESTs, assembled into 217 unigenes. Of these, 144 had significant sequence similarity with known genes, including 47 with ribosomal protein homology. Potential virulence factors included genes involved in antioxidation, thermal adaptation, immunomodulation, and iron and sterol binding. Effectors resembling pathogenicity factors of plant-pathogenic oomycetes, were also discovered. In conclusion, our project, supported by the Thailand research fund and the commission on higher education, has, as a final report, successfully developed two useful tests for rapid diagnosis of human pythiosis, shown that the 74-kDa immunogen is glucanase (a potential candidate for diagnostic test and vaccine development), and reported the first EST dataset of *P. insidiosum* for exploring genetic diversity and better understanding pathogenesis of the pathogen.

บทคัดย่อ

Pythium insidiosum คือ fungus-like microorganism ที่อยู่ในกลุ่ม oomycetes และเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อร้ายแรงที่เรียกว่า "Pythiosis". โรคนี้เกิดได้ในคนและสัตว์ที่อาศัยอยู่ในประเทศเขตร้อน. ประเทศไทยถือเป็น endemic area ของโรค pythiosis ที่เกิดในคน. ในปัจจุบัน มีการรายงานการพบโรค pythiosis มากขึ้น. อย่างไรก็ตาม ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคนี้นี้ยังมีไม่มากนัก. ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดจะมีการพยากรณ์โรคไม่ดี. การวินิจฉัยมีความยากลำบาก. การรักษาด้วยยารต้านเชื้อราไม่ได้ผล การรักษาหลักจึงเป็นการผ่าตัดส่วนที่ติดเชื้อออก (อวัยวะที่ติดเชื้อมากที่สุดคือตาและขา) ซึ่งทำให้เกิดความพิการถาวร และในบางรายการที่โรคลุกลามไปมาก ผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากการติดเชื้อในที่สุด. เมื่อพิจารณาถึงปัญหาการวินิจฉัย พบว่ามีความต้องการชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลรวดเร็ว และสามารถใช้ง่าย. และหากพิจารณาถึงปัญหาการรักษา พบว่ามีความจำเป็นที่ต้องศึกษาด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เพื่อค้นหาวิธีการรักษาใหม่ที่ได้ผลดีกว่าเดิม เช่น ยาหรือวัคซีนต้านเชื้อ *Pythium*. ในโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาชุดตรวจเลือดเพื่อช่วยวินิจฉัยโรค human pythiosis สองวิธี คือ immunochromatography และ hemagglutination ซึ่งมีหลักการทดสอบที่ง่ายต่อการใช้งาน มีประสิทธิภาพสูง และให้ผลที่รวดเร็ว (เวลาที่ใช้ในการทดสอบ ~30-60 นาที). คณะผู้วิจัยยังได้รายงานการศึกษาและวิเคราะห์ทางชีวพันธุศาสตร์ ซึ่งพบว่า immunodominant protein ขนาด 74-kDa ของเชื้อ *P. insidiosum* คือ เอนไซม์ exo-1,3-beta glucanase gene ซึ่งอาจสามารถนำมาพัฒนาเป็น vaccine ได้. Glucanase genes เป็นโปรตีนที่น่าสนใจ เพราะในเชื้อราบางชนิด glucanase มีบทบาทในการก่อให้เกิดโรค (ช่วยให้เกิดการเกาะติดของเชื้อ และช่วยในการซ่อนเชื้อในเนื้อเยื่อ) และมีบทบาทในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย. จากการใช้ glucanase gene เพื่อศึกษา phylogenetics พบว่าเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 22 สายพันธุ์ ถูกแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม. นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาความหลากหลายของยีนของ *P. insidiosum* โดยวิธี expressed sequence tags (ESTs) เพราะข้อมูลทางชีวพันธุศาสตร์ของเชื้อ *P. insidiosum* มีน้อยมาก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการศึกษาด้าน molecular pathogenesis. ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยรายงาน ESTs จำนวนทั้งสิ้น 486 ESTs ซึ่งสามารถ assembled ได้ 217 unique genes. ในจำนวนนี้ 144 ESTs มีลำดับเบสคล้ายกับยีนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานในฐานข้อมูลสากล. แต่ที่น่าสนใจคือ พบมี ESTs จำนวนหนึ่งมีลำดับเบสคล้ายกับ virulence factors ของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น เช่น ยีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับ antioxidation, thermal adaptation, immunomodulation, และ iron and sterol binding. นอกจากนี้ยังพบ effector genes ซึ่งน่าจะมีส่วนในการก่อให้เกิดโรคด้วย. โดยสรุปแล้วโครงการวิจัยนี้ (ซึ่งได้รับทุนจาก สกว-สกอ) ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค human pythiosis, ค้นหาและวิเคราะห์ยีนที่ถอดรหัสเป็น 74-kDa immunogen, และรายงานฐานข้อมูลชีวพันธุศาสตร์ของเชื้อ *P. insidiosum* โดยใช้ ESTs เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นให้เข้าใจชีววิทยาและกระบวนการเกิดโรค pythiosis.