

ABSTRACT

Pythium insidiosum is the etiologic agent of pythiosis, an emerging and fatal infectious disease of humans and animals living in tropic and subtropic countries. *P. insidiosum* exists in two stages: branching hyphae and biflagellate zoospore. Although morphology of *P. insidiosum* resembles to fungi, but it is closely related to diatom and algae. Human pythiosis is found mostly in Thailand, while the disease state in animals is found worldwide. Thalassemia is a predisposing factor. Healthcare professionals are unfamiliar with the disease. Diagnosis of pythiosis is difficult. Conventional antifungal drugs are ineffective, leaving radical surgery of infected organ is the main treatment option for pythiosis. 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. Recently, we have identified a 74-kDa immunoreactive protein of *P. insidiosum*. Proteomic and genetic analyses revealed a partial *P. insidiosum* exo-1,3- β -glucanase gene (*PinsEXO1*) sequence that encodes this immunogen. In pathogenic fungi, glucanases have roles in morphogenesis, pathogenesis, and host immune responses. Role of the glucanase in *P. insidiosum* is unknown. *PinsEXO1* might have functions resembled to fungal glucanases, and could be a potential virulence factor, diagnostic target, and vaccine candidate. In this project, we aims to characterize *PinsEXO1* and apply the gene for clinical uses. Full-length *PinsEXO1* (2,229 bp) was successfully identified, using Adaptor and RACE PCR. Sequence analysis showed that *PinsEXO1* was phylogenetically different from fungal glucanases. *PinsEXO1* was significantly up-regulated when it grew at body temperature, compared to room temperature. Limited carbon source down-regulated *PinsEXO1*. We showed that *PinsEXO1* was an efficient DNA target for specific PCR identification of *P. insidiosum*. Two B-cell epitopes of *PinsEXO1* protein (Peptide-A and B), predicted by bioinformatics analysis, were strongly reactive against sera from pythiosis patients, but not control sera tested. Western blot analysis of hyphal and culture filtrate antigens, using rabbit anti-Peptide-A/B serum, showed that *PinsEXO1* was not secreted. Immunostaining suggested that *PinsEXO1* localized at cell wall. By comparing the two peptides, Peptide-A was a more suitable epitope for development of an efficient peptide-based ELISA for diagnosis of pythiosis. In conclusion, the glucanase gene, *PinsEXO1*, of *P. insidiosum*, was first immunologically and genetically characterized here. Highly-expressed *PinsEXO1* at body temperature and surface localization of its protein imply that the gene might have role in host interaction. *PinsEXO1* was proven to be useful for molecular and immunological detection of *P. insidiosum*.

บทคัดย่อ

Pythium insidiosum คือ fungus-like microorganism ที่อยู่ในกลุ่ม oomycetes และเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อร้ายแรงที่เรียกว่า “Pythiosis”. โรคนี้เกิดได้ทั้งในคนและสัตว์ที่อาศัยอยู่ในประเทศเขตร้อน. ประเทศไทยถือเป็น endemic area ของโรค pythiosis ที่เกิดในคน. ในปัจจุบัน มีการรายงานการพบโรค pythiosis มากขึ้น. อย่างไรก็ตาม ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคนี้นี้ยังมีไม่มากนัก. ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดจะมีการพยากรณ์โรคไม่ดี. การวินิจฉัยมีความยากลำบาก. การรักษาด้วยยารต้านเชื้อราไม่ได้ผล การรักษาหลักจึงเป็นการผ่าตัดส่วนที่ติดเชื้อออก (อวัยวะที่ติดเชื้อมากที่สุดคือตาและขา) ซึ่งทำให้เกิดความพิการถาวร และในบางรายการที่โรคลุกลามไปมาก ผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากการติดเชื้อในที่สุด. เมื่อพิจารณาถึงปัญหาการวินิจฉัย พบว่ามีความต้องการชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลรวดเร็ว และสามารถใช้ได้ง่าย. และหากพิจารณาถึงปัญหาการรักษา พบว่ามีความจำเป็นที่ต้องศึกษาด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เพื่อค้นหาวิธีการรักษาใหม่ที่ได้ผลดีกว่าเดิม เช่น ยาหรือวัคซีนต้านเชื้อ *Pythium*. เมื่อไม่นานมานี้ คณะผู้วิจัยได้รายงานการพบ immunodominant protein ขนาด 74-kDalton ของเชื้อ *P. insidiosum* และจากการวิเคราะห์ทางด้าน Proteomic and genetic พบยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนนี้คือ *exo-1,3-β-glucanase gene (PinsEXO1)*. Glucanase เป็นโปรตีนที่น่าสนใจ เพราะในเชื้อราบางชนิด glucanase มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อ, ช่วยก่อให้เกิดโรค (การเกาะติดและการซ่อนไซเนอเยอซิส), และมีบทบาทในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย. หน้าที่ของ *P. insidiosum* glucanas อาจจะเหมือนกับที่พบในเชื้อรา แต่ก็ยังไม่มีการพิสูจน์. วัตถุประสงค์ของโครงการนี้คือ เพื่อศึกษาหน้าที่ของ *P. insidiosum* *PinsEXO1* และใช้ประโยชน์จากยีนนี้ในทางคลินิก. จากการใช้เทคนิค Adaptor and RACE PCR ทำให้สามารถทราบลำดับเบสของ *PinsEXO1* ทั้งหมด. เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทาง phylogenetics พบว่า *PinsEXO1* มีลำดับเบสแตกต่างกับเชื้อราชนิดอื่นๆ. เมื่อดูการแสดงออกของยีน พบว่า *PinsEXO1* แสดงออกสูงเมื่อเชื้อเจริญที่อุณหภูมิร่างกาย และมีการแสดงออกต่ำเมื่อเชื้อเจริญในภาวะที่ขาดคาร์บอน. คณะผู้วิจัยได้ใช้ *PinsEXO1* เป็นเป้าหมายในการตรวจหา *P. insidiosum* ด้วยวิธี PCR พบว่ามีประสิทธิภาพดี. นอกจากนี้ยังใช้วิธีทาง Bioinformatics คำนาย B-cell epitopes ได้ 2 epitopes คือ Peptide-A และ -B ซึ่งมี binding activity ดีกับ anti-*P. insidiosum* antibody ใน serum ผู้ป่วย pythiosis ทั้งหมดที่ทดสอบ. จากการทำ Western blot analysis กับ crude antigens ที่สกัดได้จากเชื้อ ร่วมกับ antibody จากกระต่ายที่สร้างต่อ Peptide-A และ -B พบว่าโปรตีน PinsEXO1 ไม่มีการหลั่งออกมานอกเซลล์ และการใช้ immunostaining assay บ่งบอกว่าโปรตีน PinsEXO1 อยู่ที่ผนังเซลล์. เมื่อเปรียบเทียบ Peptide-A และ -B เพื่อใช้ทำ Peptide ELISA สำหรับวินิจฉัยโรค Pythiosis พบว่า Peptide-A มีประสิทธิภาพดีกว่า. โดยสรุป โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษายีน *PinsEXO1* ของ *P. insidiosum* ในด้านที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันวิทยาและยีนติกส์เป็นครั้งแรก และแสดงว่ายีน *PinsEXO1* อาจมีบทบาทต่อการเกิดโรค. นอกจากนี้ยีน *PinsEXO1* ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. insidiosum* ได้