

Thesis Title	Serotyping and DNA Analysis by PCR-Fingerprinting of Clinical and Environmental Isolates of <i>Cryptococcus neoformans</i> in Chiang Mai	
Author	Mr. Sermkidj Khayhan	
M.S.	Microbiology	
Examining Committee:	Assist. Prof. Dr. Pojana Sriburee	Chairman
	Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul	Member
	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom	Member
	Assist. Prof. Dr. Suchart Punjaisee	Member

ABSTRACT

A total of four hundred and thirty eight specimens of clinical and environmental samples, including cerebrospinal fluid (CSF) from cryptococcosis patients (80 samples), dove excreta (100 samples), pigeon excreta (55 samples), and eucalyptus flowers (203 samples), collected from various Amphoes in Chiang Mai during May 1999 to April 2000, were examined for isolating *Cryptococcus neoformans* by culturing on Sabouraud's dextrose agar and Littman's oxgall agar. Suspected yeast colonies were tested with India ink preparation, urease

test, phenol oxidase production, and sugar assimilation tests. There are 76 (95%), 45 (45%), 9 (16.4%), and 2 (1.0%) *C. neoformans* isolates recovered from CSF, dove excreta, pigeon excreta, and eucalyptus flowers, respectively. All clinical and environmental isolates were identified as *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A (*C. neoformans* var. *grubii*) by culturing on Canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) agar and by slide agglutination test, except one strain from a cryptococcosis patient in Amphoe San Pa Tong was found to be serotype AD.

In this study, PCR-fingerprinting with (GACA)₄ primer was used as DNA analysis for distinguishing among four standard serotypes (A, B, C, and D) of *C. neoformans* and 132 *C. neoformans* isolates from both clinical and environmental sources. The four standard serotypes were discriminated clearly by this technique with (GACA)₄ primer. Most of clinical and environmental strains (130 of 132), including one isolate of *C. neoformans* serotype AD showed identical PCR-fingerprinting pattern (designated as profile AI). Profile AI had two major bands of approximately 1250 and 960 base pairs. Profile AII was observed in two environmental isolates, one was an isolate from pigeon excreta and another was an isolate from eucalyptus flowers. Profile AII had two major bands of approximately 1150 and 570 base pairs.

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาซีโรทัยป์ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี PCR-fingerprinting

ผู้เขียน นายเสริมกิจ ขยัน

วิทยาสาสตรมหาบัณทิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์:

ผศ.ดร. พงนา ศรีบุรี	ประธานกรรมการ
รศ. ประสิทธิ์ ธรวิจิตรกุล	กรรมการ
ศ.ดร. นงนุช วณิชย์ชนากม	กรรมการ
ผศ.ดร. สุชาติ ปิ่นจัยสิทธิ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทั้งหมดจำนวน 438 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมมาจากผู้ป่วยโรค cryptococcosis คือ น้ำไขสันหลังของผู้ป่วย จำนวน 80 ตัวอย่าง และตัวอย่างสิ่งแวดล้อม คือ มูลนกเขา จำนวน 100 ตัวอย่าง มูลนกพิราบ จำนวน 55 ตัวอย่าง และคอกยูคาลิปตัส จำนวน 203 ตัวอย่าง โดยเก็บจากหลายอำเภอในจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงระยะเวลาระหว่าง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2542 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2543 โดยการเพาะบน Sabouraud's dextrose agar และ Littman's oxgall agar ทดสอบโคโลนี ยีสต์ที่สงสัยด้วยการทำ India ink preparation ทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease และ phenol

oxidase และทดสอบการใช้น้ำตาล (sugar assimilation tests) พบว่า สามารถแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ได้จากน้ำไขสันหลัง 76 isolates (คิดเป็นร้อยละ 95) มูลกนเขา 45 isolates (คิดเป็นร้อยละ 45.0) มูลกนพิราบ 9 isolates (คิดเป็นร้อยละ 16.4) และคอกชูกาลิปต์ส 2 isolates (คิดเป็นร้อยละ 1.0) เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและตัวอย่างสิ่งแวดล้อมทั้งหมด เป็น *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A (*C. neoformans* var. *grubii*) โดยการเพาะเชื้อบน Canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) agar และโดยวิธี slide agglutination test ยกเว้นเชื้อ *C. neoformans* 1 isolate ที่แยกได้จากผู้ป่วยในอำเภอสันป่าตอง พบว่าเป็น *C. neoformans* serotype AD

ได้ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยวิธี PCR-fingerprinting โดยใช้ primer (GACA)₄ ทดสอบกับเชื้อ *C. neoformans* สายพันธุ์มาตรฐาน 4 ซีโรทัยป์ (Standard serotype A, B, C, และ D) และเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและตัวอย่างสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 132 isolates จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 4 ซีโรทัยป์นั้นออกได้อย่างชัดเจน และพบว่า เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและตัวอย่างสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ รวมถึงเชื้อ *C. neoformans* serotype AD มีรูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ AI ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ 2 แถบ คือ แถบขนาดประมาณ 1250 และ 960 base pairs มีเชื้อ *C. neoformans* 2 isolates เท่านั้น ที่แยกได้จากมูลกนพิราบและจากคอกชูกาลิปต์ส ที่มีรูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ AII ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ 2 แถบ คือ แถบขนาดประมาณ 1150 และ 570 base pairs