

Thesis Title Determination of Mating Type of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai

Author Miss. Jeerawat Buranasathien

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pojana Sriburee Chairperson

Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul Member

ABSTRACT

A total of 183 isolates of *Cryptococcus neoformans*, including 144 clinical isolates and 39 environmental Chiang Mai isolates were determined their mating type by PCR using two sets of primers. The first set was specific for mating pheromone gene (*MAT α* and *MATa*), another one was specific for *STE20* gene (*STE20A α* , *STE20Aa*, *STE20D α* and *STE20Da*). The standard strains used for positive control were *C. neoformans* H99 (*MAT α* , serotype A), *C. neoformans* IUM99-3617 (*MATa*, serotype A), *C. neoformans* JEC21 (*MAT α* , serotype D) and *C. neoformans* JEC20 (*MATa*, serotype D) which produced PCR products of approximately 588-, 865-, 443- and 440-bp, respectively when primers specific for *STE20* gene (*STE20A α* , serotype A mating type α ; *STE20Aa*, serotype A mating type a; *STE20D α* , serotype D mating type α and *STE20Da*, serotype D mating type a) were used. Using primers specific for mating pheromone gene (*MAT α* and *MAT a*), a 101-bp fragment was produced by standard strains of mating type α while a 117-bp fragment was produced by standard strains of mating type a. The

mating pheromone primers (MF α) amplified a 101 base pair DNA-fragment of all 183 isolates of *C. neoformans*. Using STE20 primers, only STE20 A α amplified a fragment of 588-bp of all 183 isolates of *C. neoformans*. Determination of mating type by PCR revealed that all 183 isolates had α mating type and A serotype. To confirm PCR products, fragments amplified by STE20 A α primer from 4 clinical (Pt2, C2, 46C11-52, and 47C11-2) and 2 environmental isolates (D17 and Pg2) were analysed by nucleotide sequencing. All had a high degree of homology to the corresponding segment of the published gi|56566254|gb|AF542529.2| *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 which has α mating type and A serotype.

In addition, multiplex PCR technique to determine the four mating type patterns (A α , Aa, D α and Da) of *C. neoformans* was developed to test with 30 isolates of *C. neoformans*. All produced 588-bp fragments which corresponded with the result from previous PCR study. The multiplex PCR represents a rapid, simple and relatively economical tool for epidemiological and virulence studies, as it reduces the number of PCRs from four to one.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การตรวจเมทติ้งไทป์ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน

นางสาวจิรวัดน์ บุรณะเสถียร

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:

รศ.ดร. พงนา ศรีบุรี

ประธานกรรมการ

รศ. ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล

กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาเมทติ้งไทป์ของ *C. neoformans* ที่แยกได้จากจังหวัดเชียงใหม่ทั้งหมด 183 isolates ประกอบด้วยเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 144 isolates และจากสิ่งแวดล้อม 39 isolates ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดแรกเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ mating pheromone gene คือ *MAT α* และ *MATa* อีกชุดหนึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *STE20* gene คือ *STE20A α* , *STE20Aa*, *STE20D α* และ *STE20Da* การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เชื้อมาตรฐานที่ทราบชนิดเมทติ้งไทป์และซีโรไทป์จำนวน 4 สายพันธุ์มาเป็นตัวแปรควบคุมคือ *C. neoformans* H99 (*MAT α* , serotype A), *C. neoformans* IUM99-3617 (*MATa*, serotype A), *C. neoformans* JEC21 (*MAT α* , serotype D) และ *C. neoformans* JEC20 (*MATa*, serotype D) ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 588 865 443 และ 440 base pair ตามลำดับเมื่อทำการทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *STE20* gene และเมื่อทำการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ mating pheromone gene พบว่าสายพันธุ์ที่มีเมทติ้งไทป์เป็นชนิดแอลฟา (*MAT α*) จะให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 101 base pair ส่วนสายพันธุ์ที่มีเมทติ้งไทป์เป็นชนิดเอ (*MATa*) จะให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 117 base pair การศึกษาพบว่าเชื้อทดสอบทั้ง 183 isolates มีเมทติ้งไทป์ชนิดแอลฟา (*MAT α*) คือให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 101 base pair เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ mating pheromone gene และเมื่อทำการทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *STE20* gene พบว่าเฉพาะไพรเมอร์ *STE20A α* เท่านั้นที่

สามารถขยายแถบดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบทั้ง 183 isolates โดยให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 588 base pair ซึ่งแสดงว่า เชื้อทดสอบทั้ง 183 isolates มีเมทติ้งไทป์เป็นชนิดแอลฟา (*MAT α*) และมีซีโรไทป์เอ ได้นำ PCR product จากการใช้ไพรเมอร์ STE20 A α ของ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 4 isolates คือ Pt2, C2, 46C11-52 และ 47C11-2 และจากสิ่งแวดล้อม 2 isolates คือ D17 และ Pg2 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเป็นการยืนยันผลของการทำ PCR พบว่าทั้ง 6 isolates มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับ gi|56566254|gb|AF542529.2| *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 ซึ่งมีเมทติ้งไทป์เป็นชนิดแอลฟา (*MAT α*) และมีซีโรไทป์เอ

นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาวิธี multiplex PCR เพื่อศึกษารูปแบบของเมทติ้งไทป์ทั้ง 4 ชนิด คือ A α , Aa, D α และ Da โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *STE20 gene* ทั้ง 4 คู่ ผลพบว่า *C. neoformans* ที่ใช้ในการศึกษาให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 588 base pair วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำง่ายและประหยัดค่าใช้จ่าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved