

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptococcus neoformans*

จากมูลนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร



นายดำรงเดช ปิยะบงการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-7192-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**GENETIC DIVERSITY OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLATES
FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS IN BANGKOK**

Mr. Damrongdej Piyabongkarn

**A Thesis submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)**

**Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2004
ISBN 974-17-7192-4**

Thesis Title GENETIC DIVERSITY OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*
ISOLATES FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS
IN BANGKOK

By Mr.Damrongdej Piyabongkarn

Field of study Medical Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.

Accepted by Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Somatat Wongsawang.....Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr.med.vet.)

Ariya Chindamporn.....Thesis Advisor
(Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.)

Srisurang Tantimavanich.....Member
(Associate Professor Srisurang Tantimavanich, Ph.D.)

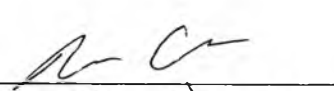
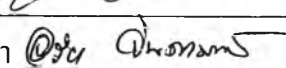
คำร้องขอ ปิยะบงการ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร (GENETIC DIVERSITY OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLATES FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS IN BANGKOK) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อริยา จินตามพร, 65 หน้า. ISBN 974-17-7192-4.

การศึกษานี้เป็นการแยกชนิดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ในระดับโมเลกุลด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ใช้ M13 primer จากมูลนกพิราบทั่วกรุงเทพมหานคร โดยสุ่มเก็บมูลนกพิราบในพื้นที่ 21 เขต จากทั้งหมดจำนวน 50 เขต ระหว่างเดือนมิถุนายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547 จำนวนตัวอย่างในแต่ละเขตที่เก็บคือ 16 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบได้จำนวน 30 ตัวอย่าง จาก 10 เขตใน 21 เขตที่ทำการสุ่มเก็บ เขตที่พบว่ามีปริมาณตัวอย่างที่พบเชื้อ *C. neoformans* มากที่สุดคือ เขตสัมพันธวงศ์ 13 ตัวอย่างจาก 16 ตัวอย่าง (81.3%) เขตที่พบรองลงมาเป็นเขตมินบุรีและธนบุรี คือ 3 ใน 16 ตัวอย่าง (18.8%) เขตภาษีเจริญ ลาดพร้าว ยานนาวาและบางพลัด พบ 2/16 ตัวอย่าง (12.5%)เขตที่พบน้อยที่สุด คือ เขตพญาไท พระนคร และป้อมปราบศัตรูพ่าย พบ 1/16 ตัวอย่าง (6.3%) จาก 30 ตัวอย่างนี้ ได้สุ่มแยกเชื้อมาศึกษาจำนวน 53 สายพันธุ์ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ canavanine glycine bromothymol blue เป็น *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) จำนวน 52 สายพันธุ์ (98%)และ *C. neoformans* var. *gattii* (serotype B หรือ C) จำนวน 1 สายพันธุ์ (2%) และด้วยวิธี RAPD พบเป็น *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), molecular type VNI จำนวน 50 สายพันธุ์ (94.3%) และด้วยจำนวน band ของ RAPD profile ที่ต่างกัน จำแนกได้เป็น 7 subtypes และเป็น molecular type VNII จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มี profile ต่างกัน และได้ 1 สายพันธุ์ของ *C. neoformans* var. *gattii* จากการศึกษานี้สรุปว่า สามารถพบ *C. neoformans* ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แยกได้จากมูลนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

4489069620 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*/ PIGEON DROPPINGS/RAPD/ BANGKOK

DAMRONGDEJ PIYABONGKARN: GENETIC DIVERSITY OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ISOLATES FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS IN BANGKOK. THESIS ADVISOR : ASSOCIATED PROFESSOR ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D., 65 pp. ISBN 974-17-7192-4.

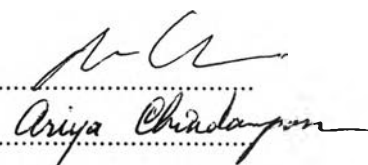
This study was designed to differentiate *Cryptococcus neoformans* isolates from pigeon droppings from Bangkok area by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) using M13 as a single primer. Out of the 51 districts, the samples were collected from twenty one random districts during the periods of June 2003 to April 2004. Sixteen samples from each district were included. The results showed that *C. neoformans* were presented in 30 samples, collected from 10 districts out of 21 randomized districts. Samphantawong district was the predominant area, showing the highest detectable percentage of *C. neoformans*, that was 13 of 16 samples (81.3%), followed by 3 of 16 samples (18.8%) from Min Buri and Thon Buri. 2 of 16 samples (12.5%) from Pasri Jareon, Ladpraw, Yannawa, and Bang Plad, and only 1 of 16 samples (6.3%) was found in Phayathai, Pranakorn, and Pomprab Satrupai, respectively. Randomized 53 isolates were recovered from 30 samples. Canavanine glycine bromothymol blue was used to investigate the variety level. It was shown that 52 isolates (98%) were *C. neoformans* var. *grubii* /*neoformans* (serotype A/D, AD) and 1 isolate (2%) was *C. neoformans* var. *gattii* (serotype B or C). From RAPD analysis, 50/52 (94.3%) was *C. neoformans* var. *grubii*, molecular type VNI, serotype A ,2/52(3.77%) was classified as *C. neoformans* var. *grubii*, molecular type VNII, serotype A, and only one was *C. neoformans* var. *gattii* (serotype B or C). The different of band numbers in each profile can discriminate the VNI type into 7 subtypes, VNI.1, VNI.2, VNI.3, VNI.4, VNI.5, VNI.6, and VNI.7 and the VNII type into 2 subtypes. In conclusion, *C. neoformans* isolates from pigeon droppings in Bangkok showed various genetic diversity.

Field of study Medical Microbiology

Academic year 2004

Student's signature.....

Advisor's signature.....



ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude to Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her kindness and helpful suggestion.

I would like to thanks to staff and my friends in laboratory of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

I wish to thanks Dr. Meyer, the chief scientist of the Molecular Mycology Laboratory, the University of Sydney, Westmead Hospital, Sydney, Australia, for Cryptococcal standard strains.

Special thanks to Miss Montakarn Chaiyodwong for helpfully everything.

Finally, I am grateful to my family for their love and warm encouragement, which enable me to fulfil this study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT(THAI).....	iv
ABSTRACT(ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II OBJECTIVES.....	5
III LITERATURE REVIEW.....	6
Mycologic features.....	6
Ecology and epidemiology.....	8
Biochemistry, molecular biology and virulence.....	12
Cryptococcosis.....	13
Behavior of the pigeon.....	15
IV MATERIALS AND METHODS.....	16
Sample size estimation and cluster sampling.....	16
Sample collection and transportation.....	17
Material processing.....	17
Identification of <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
The genetic diversity study.....	18

	Page
V RESULTS.....	20
VI DISCUSSION.....	46
REFERENCES.....	51
APPENDICES.....	59
APPENDIX A Media, reagents, materials, and instruments.....	60
APPENDIX B Media and reagent preparation.....	62
VITAE.....	65

LIST OF TABLES

Table	Page
1	Distribution of <i>Cryptococcus neoformans</i> from 21 districts in Bangkok.....23
2	Variety and molecular type of <i>C. neoformans</i> from 21 Bangkok districts.....27
3	Serotype, molecular types and molecular sizes of major bands of each Cryptococcal isolates.....29
4	Diversity of pigeon dropping isolate based on the RAPD (classified by the number of bands and 100 bp differentiation).....35

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Specimens collection technique.....	36
2 Pigeon droppings scattered on the side way around Wats.....	36
3 Dark brown colonies on the surface of caffeic acid agar at 7 days after inoculation.....	37
4 <i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> changed the color of CGB agar to blue color whereas <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii/neoformans</i> did not.....	37
5 Random amplified polymorphic DNA generated with the M13 primer for identification of the molecular types in Yannawa and Samphantawong districts.....	38
6 Random amplified polymorphic DNA generated with the M13 primer for identification of the molecular types in Samphantawong and Pomprab Satrupai districts.....	39
7 Random amplified polymorphic DNA generated with the M13 primer for identification of the molecular types in Samphantawong and Thon Buri districts.....	40
8 Schematic representation of the RAPD profile.....	41
9 Schematic representation of the RAPD profile.....	42
10 Schematic representation of the RAPD profile.....	43
11 Schematic representation of the RAPD profile.....	44
12 Geographic distribution of the molecular type in Bangkok.....	45

LIST OF ABBREVIATIONS

AIDS	=	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BAL	=	Bronchoalveolar lavage
bp	=	Base pair
<i>C.</i>	=	<i>Cryptococcus</i>
DNA	=	Deoxy nucleic acid
DW	=	Distilled water
<i>E.</i>	=	<i>Eucalyptus</i>
<i>et al.</i>	=	et alii
FTIR	=	Fourier Transform Infrared
g	=	Gram
GXM	=	Glucuronoxylomannan
M	=	Molar
MAT	=	Mating type
Min	=	Minutes
ml	=	Milliliter
°C	=	Degree Celsius
PFGE	=	Pulse Field Gel Electrophoresis
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
var.	=	Variety
α	=	Alpha
μ g	=	Microgram
μ l	=	Microliter
HIV	=	Human immunodeficiency virus
μ m	=	Micrometer