Thesis Title	Detection of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in Soil Contaminated with Avian and Bat Droppings by Nested-PCR
Author	Miss Treepradab Norkaew
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Advisory Committee	Assoc.Prof. Dr. Pojana Sriburee Advisor Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul Co-advisor

ABSTRACT

The fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* grow in soil contaminated with bat and avian excreta. The aims of this study are to detect *C. neoformans* and *H. capsulatum* in natural environments by using nested PCR method. A total of 265 soil samples were determined, including samples from soil contaminated with droppings of bats (88 samples), birds (86 samples) including white wagtail (15 samples), wagtail (17 samples), pigeon (21 samples), myna (30 samples), Red-whiskered Bulbul (3 samples) and chicken (91 samples). Samples were collected in Chiang Mai except some samples of soil contaminated with bat guano were from Nakornsawan and Maehongson province. Genomic DNA was directly extracted from each sample by phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. *C. neoformans* was detected by nested-PCR using universal fungal primers (FungusI, FungusII, amplified product of 429 bp) and primers specific for a gene encoding 18S rRNA of this fungus (CrypI,CrypII, amplified product of 278 bp). One sample of soil contaminated with myna droppings was positive for *C. neoformans* by nested PCR. However, this soil sample and other all were negative for this fungus when isolating

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

on L-dopa agar. The specificity of the PCR with CrypI and CrypII primers was confirmed by the total absence of amplification products when genomic DNA from *Mycobacterium avium*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium marneffei*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* and *Histoplasma capsulatum* were applied in the reaction. Detection limit of nested PCR assay for *C. neoformans* was $2x10^3$ cells per sample for both first round and second round.

The nested PCR was also used to detect *H. capsulatum* in each extracted sample. Using primers specific for a gene encoding 100 kDa-like protein of this fungus (Hc primers), PCR products of 391 and 210 bp were amplified with primers HcI, HcII and HcIII, HcIV, respectively. Seven of 88 (7.95 %) soil contaminated with bat guano, 1 of 21(4.76 %) soil contaminated with pigeon droppings samples and 10 of 91 (10.99 %) soil contaminated with chicken droppings samples were positive for *H. capsulatum*. Sequencing analysis of PCR products showed 94 to 99 % identity to nucleotide sequences of gene encoding 100kDa-like protein of *H. capsulatum*. The specificity of the PCR with HcI, HcII and HcIII, HcIV primers was confirmed by the total absence of amplification products when genomic DNA from *M. avium*, *A. fumigatus*, *P. marneffei*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. neoformans* were applied in the reaction. Detection limit of nested PCR assay for *H. capsulatum* was $2x10^3$ cells per sample for second round. The nested PCR method will be a very useful alternative tool for the detection of fungi especially *H. capsulatum* in natural environments. The method for the isolation of this fungus are difficult and not practical for general mycology laboratories since the mycelial form of *H. capsulatum* has been classified into the risk group level 3. This study indicates the association of bat and avian droppings and *H. capsulatum* in this area of Thailand. Soil contaminated with chicken droppings may be the possible reservoirs of this pathogenic fungi in Chiang Mai.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* และ *Histoplasma capsulatum* ในดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลของสัตว์ปีกและค้างคาวโดยใช้เทคนิค Nested-PCR

ผู้เขียน นางสาวตรีประดับ หน่อแก้ว

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. พจนา ศรีบุรี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อราก่อโรค *Cryptococcus neoformans* และ *Histoplasma capsulatum* เจริญได้ดีในดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลของสัตว์ปีกและค้างคาว วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจหาเชื้อรา *C. neoformans* และ *H. capsulatum* ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิค nested PCR ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 265 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลค้างคาว 88 ตัวอย่าง ดินที่ปนเปื้อนมูลนก 86 ตัวอย่าง ประกอบด้วย นกอุ้มบาตร (15 ตัวอย่าง), นกเค้าลม (17 ตัวอย่าง), นกพิราบ (21 ตัวอย่าง), นกเอี้ยง (30 ตัวอย่าง), นกปรอดหัวโขน (3 ตัวอย่าง) และ มูลไก่ (91 ตัวอย่าง) ตัวอย่างทั้งหมดได้เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ ยกเว้นตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลของค้างคาวบางตัวอย่างเก็บมาจากจังหวัดนครสวรรค์และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากตัวอย่างด้วยวิธี phenol-chloroform-isoamyl alcohol ตรวจหาเชื้อรา *C. neoformans* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อราทุกชนิด (FungusI, FungusII, ให้ผลผลิตขนาด 429 คู่เบส) ในการทำ nested PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 18S rRNA ของเชื้อราชนิดนี้ (CrypI, CrypII, ให้ผลผลิตขนาด 278 คู่เบส) จากการทำ nested PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *C. neoformans* ในตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลของนกเอี้ยง 1 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกเชื้อในตัวอย่างที่ให้ผลบวกนี้และตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหาร L-dopa agar การทดสอบความจำเพาะของ PCR ด้วยไพรเมอร์ CrypI

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ CrypII ยืนยันโดยการที่ไม่สามารถตรวจพบผลผลิต PCR เมื่อใช้ DNA ของเชื้อ *Mycobacterium avium*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium marneffei*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* และ *Histoplasma capsulatum* ในการทำ PCR และปริมาณเชื้อ *C. neoformans* ที่น้อยที่สุด ที่สามารถตรวจพบได้ เท่ากับ $2x10^3$ เซลล์ต่อตัวอย่าง ทั้งปฏิกิริยา PCR รอบแรก และรอบที่สอง

ได้ใช้วิธี nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ *H. capsulatum* ในตัวอย่างที่ได้สกัด DNA แล้ว โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 100 kDa-like protein (ไพรเมอร์ Hc) ของเชื้อชนิดนี้ ซึ่งผลผลิต PCR ที่ได้จะเท่ากับ 391 และ 210 คู่เบส เมื่อใช้ไพรเมอร์ HcI- HcII และ HcIII- HcIV ตามลำดับ ตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Histoplasma capsulatum* ซึ่งเป็นดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลค้างคาว 7 จาก 88 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.95) มูลนกพิราบ 1 จาก 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ4.76) และมูลไก่ 10 จาก 91 ตัวอย่าง (ร้อยละ10.99) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ 100 kDa- like protein ของเชื้อ *H. capsulatum* ร้อยละ 94-99 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ HcI, HcII และ HcIII, HcIV ยืนยันโดยการที่ไม่สามารถตรวจพบผลผลิต PCR เมื่อใช้ DNA ที่ได้มาจากเชื้อ *M. avium*, *A. fumigatus*, *P. marneffei*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* และ *C. neoformans* ในการทำ PCR ปริมาณเชื้อ *H. capsulatum* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ เท่ากับ $2x10^3$เซลล์ต่อตัวอย่าง ในปฏิกิริยา PCR รอบที่สอง วิธี nested PCR เป็นวิธีที่มีประโยชน์มากวิธีหนึ่งในการตรวจหาเชื้อราโดยเฉพาะเชื้อ *H. capsulatum* ในตัวอย่างจากธรรมชาติ เนื่องจากการแยกเชื้อราชนิดนี้ทำได้ยาก และไม่อาจทำได้ในห้องปฏิบัติการเชื้อราทั่วไป เพราะเชื้อ *H. capsulatum* ในภาวะที่เป็นราสายจัดเป็นเชื้ออันตรายระดับ 3 (Risk group level 3) การศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลของค้างคาวและสัตว์ปีกกับเชื้อรา *H. capsulatum* ในบริเวณนี้ของประเทศไทย และดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลของไก่อาจเป็นแหล่งของเชื้อราก่อโรคชนิดนี้ในจังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved