Thesis Title Detection of *Histoplasma capsulatum* in Clinical Specimens by Nested PCR

Author Mr. Tanpalang Puengchan

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Pojana Sriburee Advisor

Assoc. Prof. Dr. Sumalee Siriaungkul Co-advisor

Prof. Dr. Anak Iamaroon Co-advisor

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum is the etiologic agent of histoplasmosis, a systemic mycosis that can involve many organs when disseminated. The aim of this study was to detect *H. capsulatum* in clinical specimens (e. g. concentrated sputum, paraffin embedded tissue, lymph node and bone marrow) by nested PCR using primers specific for the segment of M antigen encoding gene of *H. capsulatum* (Msp primers). These Msp primers (Msp1F/Msp2R and Msp2F/Msp3R) generated products of approximately 318 and 269 bps for first round and second round PCR, respectively. The nested PCR method showed specificity of Msp primers for *H. capsulatum*, when compared with various species of fungi and bacteria. Determination of the sensitivity of the method revealed that the minimal yeast cells and DNA of *H. capsulatum* per reaction resulting in a positive PCR were 10 cells and 100 fg, respectively. Detection of *H. capsulatum* in clinical specimens revealed that 12 of 649 (1.85%) specimens were positive by nested PCR. These specimens included 5 concentrated sputum, 5 paraffin embedded tissue and 2 lymph node specimens. Only one lymph node

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

specimen was positive for *H. capsulatum* by routine culture method. Five of 12 paraffin embedded tissue specimens of positive GMS staining for fungus suspected *H. capsulatum* were positive by nested PCR method. The negative nested PCR results of those 7 paraffin embedded tissue specimens may be explained by either the effect of formalin in the process of fixation causing degradation of DNA in such specimens or those yeast cells seen by GMS staining were not *H. capsulatum*. Smears of 5 concentrated sputum specimens those were positive by nested PCR also showed small budding yeasts by PAS staining. Nucleotide Sequencing analyses of PCR products showed 94 to 99 % identity to the nucleotide sequence of gene encoding M antigen of *Ajellomyces capsulatus*.

Comparison between PAS staining and nested PCR for concentrated sputum specimens showed significantly excellent correlation for the detection of *H. capsulatum*. The correlative classification of culture and nested PCR methods for lymph node and bone marrow specimens was significantly good. However, the correlative classification of GMS staining and nested PCR method for paraffin embedded tissue specimens was significantly fair. The nested PCR using Msp primers was shown to be a sensitive, specific and rapid methods for the detection of *H. capsulatum* in clinical specimens. Other than clinical symptoms, direct examination and culture method, the results of nested PCR may be useful for physicians for the diagnosis and treatment of histoplasmosis in immunocompromised patients. Early diagnosis of histoplasmosis by the nested PCR may reduce mortality rate especially in patient groups at risk for disseminated histoplasmosis.

This method can also be used for the identification and confirmation of atypical strains of *H. capsulatum*. The nested PCR may be an alternative useful

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

method for the diagnosis of histoplasmosis especially for laboratories that lack of the biosafety level 3 facilities to isolate and identify *H. capsulatum*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจหาเชื้อรา *Histoplasma capsulatum* ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยวิธี nested PCR	
ผู้เขียน	นายฐานพลัง พึ่งจันทร์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. พจนา ศรีบุรี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. พญ. สุมาลี ศิริอังกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ. ดร. ทพ. อะนัฆ เอี่ยมอรุณ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Histoplasma capsulatum* เป็นสาเหตุของโรค histoplasmosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อราในหลายระบบที่สามารถแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจหาเชื้อรา *H. capsulatum* ในสิ่งส่งตรวจของผู้ที่ป่วย ได้แก่ เสมหะที่เป็น concentrated sputum, ชิ้นเนื้อที่ฝังในพาราฟิน ต่อมน้ำเหลือง และไขกระดูก ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนของ M antigen ในเชื้อรา *H. capsulatum* (ไพรเมอร์ Msp) (Msp1F/Msp2R และ Msp2F/Msp3R) ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 318 และ 269 คู่เบส ในการทำพีซีอาร์รอบแรกและรอบที่สองตามลำดับ จากการทดสอบความจำเพาะของวิธี nested PCR กับเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าไพรเมอร์ Msp มีความจำเพาะต่อเชื้อ *H. capsulatum* เท่านั้น ผลการทดสอบความไวของวิธี nested PCR พบว่าจำนวนเซลล์และปริมาณของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบเชื้อรา *H. capsulatum* ต่อปฏิกิริยาจะเป็น 10 เซลล์ และ 100 fg ตามลำดับ การตรวจหาเชื้อรา *H. capsulatum* ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 649 ตัวอย่าง พบว่ามี 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.85) ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี nested PCR ได้แก่ เสมหะที่เป็น concentrated sputum 5 ตัวอย่าง ชิ้นเนื้อฝังในพาราฟิน 5 ตัวอย่าง และต่อมน้ำเหลือง 2 ตัวอย่าง โดยต่อมน้ำเหลืองหนึ่งตัวอย่างให้ผลบวกจากการเพาะเชื้อ ตัวอย่างชิ้นเนื้อฝังในพาราฟินซึ่งจากการย้อม GMS พบเชื้อราที่สงสัยว่าจะเป็น *H. capsulatum* จำนวน 12 ตัวอย่าง ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี nested PCR 5 ตัวอย่าง ที่เหลืออีก 7 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ การที่วิธี nested PCR ให้ผลเป็นลบกับตัวอย่างชิ้นเนื้อฝังในพาราฟินเหล่านี้อาจอธิบายได้ว่าเป็นผลของฟอร์มาลินที่ใช้ในกระบวนการ fixation ชิ้นเนื้อทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายหรืออาจเป็นเพราะเซลล์ยีสต์ที่ย้อมพบด้วยวิธี GMS ในชิ้นเนื้อนั้นไม่ใช่เชื้อรา *H. capsulatum* จากการย้อม concentrated sputum ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี nested PCR จำนวน 5 ตัวอย่างด้วยวิธี PAS ตรวจพบเซลล์ยีสต์แตกหน่อที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดเล็ก การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง M antigen ของเชื้อรา *Ajellomyces capsulatus* ร้อยละ 94 ถึง 99

การเปรียบเทียบระหว่างวิธี nested PCR และการย้อม PAS ในสิ่งส่งตรวจชนิด concentrated sputum โดยหาความสัมพันธ์พบว่ามีความสอดคล้องกันแบบดีเยี่ยม (excellent correlation) อย่างมีนัยสำคัญ การหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธี nested PCR และการย้อม GMS ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อฝังในพาราฟินพบว่ามีความสอดคล้องกันแบบปานกลาง (fair correlation) อย่างมีนัยสำคัญ การหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธี nested PCR และวิธีการเพาะเชื้อ ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นต่อมน้ำเหลืองและไขกระดูกพบว่ามีความสอดคล้องกันแบบดี (good correlation) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าวิธี nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Msp เป็นวิธีที่มีความไว มีความจำเพาะ และเป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อรา *H. capsulatum* ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ผลจากการทำ nested PCR ประกอบกับอาการทางคลินิก ผลการย้อม และการเพาะเชื้อ อาจช่วยประกอบการวินิจฉัยของแพทย์ในการรักษาผู้ป่วยโรค histoplasmosis ที่บกพร่องทางภูมิคุ้มกัน การตรวจวินิจฉัยโรค histoplasmosis อย่างรวดเร็วด้วยวิธี nested PCR อาจช่วยลดอัตราการตายของผู้ป่วยโดยเฉพาะในกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย

วิธีนี้สามารถใช้เพื่อพิสูจน์และยืนยันชนิดของเชื้อรา *H. capsulatum* สายพันธุ์ที่เป็น atypical strains วิธี nested PCR อาจเป็นทางเลือกที่มีประโยชน์โดยเฉพาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่มี Biosafety level 3 ในการใช้แยกและ พิสูจน์ชนิดเชื้อรา *H. capsulatum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved