

Thesis Title	Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Patterns of Clinical and Environmental Isolates of <i>Cryptococcus neoformans</i> in Chiang Mai	
Author	Ms. Khattiya Suda	
Degree	Master of Science (Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Assist. Prof. Dr. Pojana Sriburee	Chairperson
	Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul	Member

ABSTRACT

A total of 112 isolates of *Cryptococcus neoformans*, including 50 clinical Chiang Mai isolates, 50 environmental Chiang Mai isolates, 10 clinical Khon Kaen isolates and 2 clinical Japanese isolates were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD), using three primers (R28, OPH-02 and OPH-20). Genomic DNA of each isolate was extracted and PCR amplifications were performed with each primer. RAPD patterns analysed with these three primers revealed five patterns (pattern I, II, III, IV and V) among all 112 isolates of *C. neoformans*. For isolates belonged to *C. neoformans* serotype A, three patterns (pattern I, II and III) were found among 50 clinical Chiang Mai isolates, two patterns (pattern I and II) among 50 environmental Chiang Mai isolates, one pattern (pattern I) among 7 clinical Khon Kaen isolates and one pattern (pattern II) among 2 clinical Japanese isolates. One isolate of serotype B from Khon Kaen produced pattern IV, two untypeable isolates (K25 and K97) of the same province produced patterns V and I, respectively. Pattern I was the most common pattern.

In addition, domestic sources of cryptococcosis were determined from patients' homes in Chiang Mai. A total of 202 of avian droppings, including pigeon, dove, chicken, duck, goose, Hill Myna and Budgerigars droppings, were collected from 52 patients' homes from various Amphoes in Chiang Mai. Two samples (0.99 %) were positive for *C. neoformans*. Of these two isolates, one was recovered from dove dropping and the other from pigeon dropping. *C. neoformans* was not isolated from other kinds of avian droppings. Two environmental isolates and their two clinical isolates belonged to *C. neoformans* serotype A (var. *grubii*). To determine their relations, these two environmental (Do 3/2 and Pge 12/2) and their two clinical (Cne 3 and Cne 12) isolates of *C. neoformans* were analyzed by RAPD with three primers. RAPD profiles with these three primers revealed three patterns (I, II, VI) among isolates. The RAPD patterns of Cne 3 and Do 3/2 were identical (pattern II). In contrast, the RAPD patterns of Cne 12 and Pge 12/2 were different, pattern I and VI, respectively.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์รูปแบบ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน นางสาวชัตติยา สุดา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. พงณา ศรีบุรี ประธานกรรมการ
รศ. ประสิทธิ์ ธรวิจิตรกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ 3 แบบ คือ R28, OPH-02 และ OPH-20 เชื้อที่ใช้ทดสอบมีจำนวนทั้งหมด 112 isolates ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่อย่างละ 50 isolates เชื้อที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในจังหวัดขอนแก่น 10 isolates และเชื้อที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากประเทศญี่ปุ่น 2 isolates ศึกษาโดยการแยกดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์แต่ละชนิดและเปรียบเทียบแบบแผน RAPD ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 3 แบบ ผลจากการศึกษาพบว่า เชื้อ *C. neoformans* serotype A ให้แบบแผน RAPD 5 แบบ คือ แบบที่ I, II, III, IV และ V สำหรับเชื้อที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ 50 isolates ให้แบบแผน RAPD 3 แบบคือ แบบที่ I, II และ III เชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่ 50 isolates ให้แบบแผน RAPD 2 แบบคือ แบบที่ I และ II เชื้อที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในจังหวัดขอนแก่น 7 isolates ให้แบบแผน RAPD 1 แบบคือ แบบที่ I และเชื้อที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากประเทศญี่ปุ่น 2 isolates ให้แบบแผน RAPD 1 แบบคือ แบบที่ II เชื้อ 1 isolate จากขอนแก่นซึ่งเป็น serotype B ให้แบบแผน RAPD เป็นแบบที่ IV และเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในจังหวัดขอนแก่น 2 isolates (K25 และ K97)

ซึ่งเป็น untypeable serotype ให้แบบแผน RAPD เป็นแบบที่ V และ I ตามลำดับ แบบแผน RAPD ที่พบมากที่สุดคือ แบบที่ I

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาแหล่งของโรค cryptococcosis ของผู้ป่วยโรคนี้ในจังหวัด เชียงใหม่ ทำการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ปีกบริเวณบ้านและบริเวณข้างเคียงจำนวน 202 ตัวอย่าง ได้แก่ มูลนกพิราบ มูลนกเขา มูลไก่ มูลเป็ด มูลห่าน มูลนกขุนทอง และมูลนกหงษ์หยก ได้เก็บจากบ้าน ของผู้ป่วยจำนวน 52 ราย จากหลายอำเภอในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ 2 isolates จาก 202 ตัวอย่าง (0.99 %) บริเวณบ้านของผู้ป่วย โดย 1 isolate แยกได้จากมูลนกเขา อีก 1 isolate แยกได้จากมูลนกพิราบ ไม่สามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้จากมูลสัตว์ปีกชนิดอื่น เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย 2 isolates และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจาก บ้านของผู้ป่วยเหล่านั้น 2 isolates พบว่าเป็น *C. neoformans* serotype A (var. *grubii*) จากการศึกษา ความสัมพันธ์โดยวิเคราะห์แบบแผน RAPD ของเชื้อทั้งที่แยกจากสิ่งแวดล้อม 2 isolates (Do 3/2 และ Pge 12/2) และเชื้อที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย 2 isolates (Cne 3 และ Cne 12) พบว่า Cne 3 และ Do 3/2 ให้แบบแผน RAPD ที่เหมือนกันคือ แบบที่ II ขณะที่ Cne 12 และ Pge 12/2 ให้แบบ แผน RAPD ที่แตกต่างกันคือ แบบที่ I และ VI ตามลำดับ