

<b>Thesis Title</b>	Phenotypic and Genotypic Relationships of <i>Pythium insidiosum</i> Isolated from Patients and Environments	
<b>Author</b>	Miss Jidapa Supabandhu	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Microbiology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom	Chairperson
	Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Member
	Assoc. Prof. Dr. Pramote Vanittanakom	Member
	Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim	Member

### ABSTRACT

*Pythium insidiosum* is an aquatic fungus-like organism, classified in the kingdom Stramenopila. It is the causative agent of the life-threatening human and animal disease, pythiosis. Thailand is broadly recognised as an endemic area of human pythiosis. Mortality rate and the risk of losing infected organs are very high. *P. insidiosum* is able to infect apparently healthy individuals and patients with hematological disorders such as thalassemia and leukemia. Most patients worked in agricultural areas, especially farmers. Direct, prolonged contact with stagnant water is frequently documented in pythiosis patients' history. In nature, *P. insidiosum* can produce asexual biflagellate zoospores that are assumed to be its infectious component, because they have special tropism to hair and to the damaged skin of human and animals. Therefore, contact with the natural habitat of this organism is a high risk factor of *P. insidiosum* infection. In this study, the ecological niche of *Pythium insidiosum* within the endemic agricultural areas of northern Thailand was

described. Water samples were collected from irrigation water, including rice paddy fields, irrigation channels, reservoirs in rice field and domestic reservoirs. Zoospores of *P. insidiosum* were captured from water by the use of a baiting technique that utilised sterile human hair. *Pythium* isolates were identified based on phenotypic characteristics and by using a specific PCR assay for *P. insidiosum*. In addition, internal transcribed spacer (ITS) regions of *P. insidiosum* rDNA were sequenced and used for phylogenetic analysis with 20 other known *P. insidiosum* DNA sequences available in the database and 11 DNA sequences of other closely related *Pythium* species, including *Lagenidium giganteum*. *P. insidiosum* was isolated from all 4 types of water source with a discovery rate of 26.1% (24 of 92 water sources). The sequences of 59 environmental isolates of *Pythium* spp. recovered from irrigation water confirmed 99% identity to *P. insidiosum*. The phylogenetic analysis showed that the environmental isolates were separated from other closely related species with high bootstrap support. This study provided the first evidence of *P. insidiosum* natural occurrence in endemic aquatic environments. The highest recovery rate of this hydrophilic pathogen was found to be at reservoirs in rice fields. The data showed that irrigation water may be an important source of *P. insidiosum* infection for individuals working in endemic agricultural areas.

Phenotypic and genotypic relationships of the clinical and environmental isolates collected in this study were determined by using Sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immunoblot analysis and microsatellite typing. Phenotypic analysis was based on patterns of mycelium-extract and culture filtrate proteins and patterns of antigenic proteins. For genotypic analysis, microsatellite markers were used, due to their high polymorphism and suitability for diploid organisms. The markers were first developed in this study by constructing partial genomic DNA library and designing proper primers flanking microsatellite sequences. The SDS-PAGE and immunoblot analyses enabled us to determine that pathogenic and natural-living *P. insidiosum* could not be distinguished by phenotypic and genotypic criteria. Most isolates showed unique phenotypic and genotypic patterns; only closely related isolates and clonal individuals showed similar patterns. These findings showed that the methods contained high discriminatory power and variability for distinguishing heterogeneous isolates. In addition, phenotypic and

genotypic relationships of closely related clinical and environmental isolates were affected by genetic background, regardless of geographic origin. The profiles of one environmental isolate from Lumphun province were closely related to a clinical isolate from Kanchanaburi province. The different geographic origin of the isolates suggests that patients might be infected from the environmental isolate's source, or this was evidence supporting the distribution of *P. insidiosum* in Thailand. Moreover, the distribution of *P. insidiosum* in natural sources was found to be heterogeneous within the investigated sites. This data suggested that unknown factors may be influencing the dispersal of the organism. This hypothesis needs to be tested by ascertaining the broader spatial genetic structure of *P. insidiosum* in order to determine the effective dispersal of *P. insidiosum* across endemic areas.

The dispersal potential of *P. insidiosum* has never been examined. The genetic structure of *P. insidiosum* populations was investigated in the northern and central regions of Thailand by using multi-locus microsatellite typing (MLMT) based on the multiplex PCR technique. Nine appropriate microsatellite loci were used. Six populations, based on geographic origin, of clinical and environmental isolates showed low to moderate levels of genetic differentiation between samples and little correlation between pathogens' genotype and geography. These data indicate substantial gene flow between the northern and central regions of Thailand. *P. insidiosum* probably spreads mostly via thick-walled, resistant oospores (sexual spores) and outcrossing may occur in nature, as no genotypes common to particular regions were detected and there is evidence of recombination within populations. It could be hypothesized that transportation, flood and irrigation systems may be involved in the dispersal of *P. insidiosum* across Thailand.

In conclusion, irrigation water especially water reservoir was found to be an important natural habitat of *P. insidiosum* in agricultural areas of Thailand. In addition, *P. insidiosum* isolates obtained from patients and environments were similar in both phenotypic and genotypic characteristics. However, there was some differentiation between isolates but this was unrelated to geographical distance. Gene flow and outcrossing may occur in nature. The results of this study suggest that any strain of *P. insidiosum* is potentially pathogenic and can provoke a case of pythiosis when it encounters a favorable environment in a susceptible host.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ทางลักษณะและพันธุกรรมของเชื้อพยาธิเยม  
อินสิดิโอสัมที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

ผู้เขียน

นางสาวจิตภา สุภาพันธ์

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร. นงนุช วณิชย์ธนาคม

ประธานกรรมการ

ศ.ดร. นิวัฒน์ มณีกาญจน์

กรรมการ

รศ.ดร. ปราโมทย์ วณิชย์ธนาคม

กรรมการ

ผศ.ดร. สิริดา ยังฉิม

กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อพยาธิเยมอินสิดิโอสัม เป็นจุลชีพที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา น้ำ จดอยู่ในอาณาจักร Stramenopila เป็นเชื้อสาเหตุของโรคพยาธิโอสิต มีการก่อโรคที่รุนแรงถึงแก่ชีวิตในคนและสัตว์ ประเทศไทยได้ขึ้นชื่อว่าเป็นแหล่งระบาดของโรคพยาธิโอสิตในมนุษย์ อัตราการเสียชีวิตและสูญเสียอวัยวะที่มีการติดเชื้อนั้นค่อนข้างสูง เชื้อพยาธิเยม อินสิดิโอสัมสามารถก่อโรคได้ทั้งในคนปกติและผู้ที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับโลหิต เช่น ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและมะเร็งเม็ดเลือดขาว ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาชีพเป็นเกษตรกร โดยเฉพาะชาวนา ผู้ป่วยมักมีประวัติสัมผัสโดยตรงกับน้ำนิ่งเป็นเวลานาน ในธรรมชาติ เชื้อพยาธิเยม อินสิดิโอสัมสามารถสร้างซุโอสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ มีแฟงเจลล่าสองเส้น ซึ่งเชื่อว่าเป็นระยะก่อโรคของเชื้อ เนื่องจากสปอร์ชนิดนี้มีความชอบในการว่ายน้ำเข้าหาเส้นขน/ผม และเนื้อเยื่อที่มีบาดแผลของสัตว์และมนุษย์ ดังนั้นการสัมผัสกับแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของเชื้อจึงเป็นปัจจัยเสี่ยงสูงที่ทำให้ติดเชื้อพยาธิเยมอินสิดิโอสัม ในการศึกษาครั้งนี้ได้อธิบายถึงแหล่งนิเวศวิทยาของเชื้อพยาธิเยมอินสิดิโอสัมในพื้นที่การเกษตรที่เป็นแหล่งระบาดของโรค ในภาคเหนือของประเทศไทย ได้มีการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำชลประทานได้แก่ น้ำในนาข้าว, ร่องน้ำชลประทาน, หนองน้ำในนา และ หนองน้ำในบ้าน ทำการแยกซุโอสปอร์ของเชื้อพยาธิเยมอินสิดิโอสัมออกจากน้ำด้วยวิธีใช้เส้นผมมนุษย์ที่ปราศจากเชื้อเป็นเหยื่อล่อ ตรวจพิสูจน์เชื้อพยาธิเยมที่แยกได้

ด้วยการดูลักษณะทั้งทางกายภาพ และตรวจด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ที่จำเพาะต่อ เชื้อฟิเทียมอินสิดิโอสัม นอกจากนี้ยังได้หาข้อมูลลำดับเบสส่วน Internal transcribed spacer ของยีน rDNA ของเชื้อฟิเทียมอินสิดิโอสัม เพื่อใช้ลำดับเบสส่วนนี้ในการวิเคราะห์ phylogenetic tree เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อฟิเทียมอินสิดิโอสัมที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูลอีก 20 ตัวและเชื้อ อื่นๆที่ใกล้เคียงในจีนัสฟิเทียม อีก 11 สปีชีส์ รวมถึงเชื้อลากานิดิเคียมโกเคนเทียม พบว่าสามารถ แยกเชื้อฟิเทียมอินสิดิโอสัมได้จากแหล่งน้ำทั้งสี่ประเภทโดยมีอัตราการพบเชื้ออยู่ที่ 26.1% (24/92 แหล่งน้ำ) เชื้อฟิเทียม 59 ตัวที่แยกได้จากน้ำชลประทานมีความเหมือนกับเชื้อฟิเทียมอินสิดิโอสัมอยู่ มากกว่า 99% และจากการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree สามารถแยกเชื้อที่พบออกจากเชื้อ ใกล้เคียงอื่น ๆ ได้ด้วยค่า bootstrap ที่สูง การศึกษานี้ได้ให้หลักฐานชิ้นแรกบ่งชี้ถึงการพบแหล่งที่ อยู่ในธรรมชาติของเชื้อในแหล่งน้ำที่มีการระบาดของโรค แหล่งน้ำที่มีอุบัติการณ์ของเชื้อชนิดนี้ มากที่สุดคือหนองน้ำในนา ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า น้ำชลประทานอาจเป็นแหล่งที่สำคัญต่อการ ติดเชื้อฟิเทียมอินสิดิโอสัมในคนที่ทำงานในพื้นที่การเกษตร

ความสัมพันธ์ทางลักษณะและพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อมที่เก็บ ได้จากการศึกษาครั้งนี้ วัดได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) วิธี immunoblot และ microsatellite typing ซึ่งการวิเคราะห์ทาง ลักษณะอยู่บนพื้นฐานของรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากสาหร่าย, โปรตีนที่เชื้อหลั่ง ออกมาในอาหารเหลว และรูปแบบของโปรตีนแอนติเจน ส่วนการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมได้ใช้ microsatellite marker เนื่องจากมีความหลากหลายสูงและเหมาะแก่การศึกษาเชื้อที่มีโครโมโซมเป็น diploid ซึ่ง marker ชนิดนี้ได้ทำการพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกในการศึกษาครั้งนี้จากการสร้างธนาคารดีเอ็นเอบางส่วน และออกแบบ primer ที่ขนาบข้างลำดับเบสของ microsatellite นั้นอย่างเหมาะสม ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ immunoblot ทำให้ทราบว่าเชื้อที่ก่อโรคกับเชื้อ ที่อาศัยในธรรมชาติไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยการวิเคราะห์ลักษณะและพันธุกรรมเป็นเกณฑ์ เชื้อ ส่วนใหญ่มีรูปแบบทางฟิโนไทป์และจีโนไทป์ที่มีความเฉพาะตัว มีเพียงเชื้อที่มีความใกล้เคียงกัน มากและเชื้อที่มาจากโคลนเดียวกันเท่านั้นที่แสดงรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้มีค่าความสามารถสูง ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ และมีความหลากหลาย สำหรับแบ่งแยกเชื้อที่มีความแตกต่างกันออกจากกัน นอกจากนี้ ความสัมพันธ์ทางลักษณะและ พันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมที่มีความใกล้เคียงกัน พบว่าขึ้นอยู่กับ พันธุกรรมของเชื้อ แต่ไม่ขึ้นกับแหล่งกำเนิดตามภูมิศาสตร์ เชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่แยกได้จากจังหวัด ลำพูนพบว่ามีความใกล้เคียงกันกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจากจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งแหล่งกำเนิดที่

แตกต่างกันของเชื้อทั้งสองอาจเป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยอาจติดเชื้อมาจากแหล่งที่อยู่ของเชื้อจากสิ่งแวดล้อมนั้น หรืออาจเป็นหลักฐานสนับสนุนการกระจายตัวของเชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัมในประเทศไทย

ความเป็นไปได้ในการแพร่กระจายของเชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัม ยังไม่เคยมีการค้นคว้ามาก่อน ในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรของเชื้อที่แยกได้จากภาคเหนือและภาคกลางโดยใช้ วิธี multi-locus microsatellite typing (MLMT) อาศัยพื้นฐานของเทคนิค multiplex PCR โดยทดสอบจาก microsatellite จำนวน 9 โลไซ พบว่าเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมทั้ง 6 กลุ่มประชากรแบ่งตามพื้นที่ทางภูมิศาสตร์มีความแตกต่างกันในระดับน้อยถึงปานกลางในระหว่างกลุ่มประชากร และมีความสัมพันธ์กันไม่มากนักระหว่างจีโนไทป์ที่พบกับแหล่งที่อยู่ทางภูมิศาสตร์ของเชื้อ ข้อมูลที่ได้บ่งบอกถึงว่ามีการถ่ายเทและเคลื่อนย้ายยีนของเชื้อระหว่างภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทย เป็นไปได้ว่าเชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัมอาจแพร่กระจายผ่านสปอร์แบบอาศัยเพศ เรียกว่าโอโอสปอร์ ซึ่งมีผนังหนาและทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดี และจากนั้นเชื้ออาจเกิดการแลกเปลี่ยนยีนกันระหว่างเชื้อต่างจีโนไทป์ในธรรมชาติ ทั้งนี้ เนื่องจากว่าไม่พบจีโนไทป์ที่จำเพาะต่อพื้นที่นั้น ๆ และมีหลักฐานสนับสนุนการเกิด recombination ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่า การขนส่ง, น้ำท่วม และระบบชลประทาน อาจเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัมในประเทศไทย

โดยสรุป น้ำชลประทานโดยเฉพาะหนองน้ำพบว่าเป็นแหล่งที่อยู่สำคัญในธรรมชาติของเชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัมในพื้นที่การเกษตรของประเทศไทย นอกจากนี้ เชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัมที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีความคล้ายคลึงกันทั้งทางลักษณะและพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม ได้พบความแตกต่างกันบ้างระหว่างตัวเชื้อแต่ทั้งนี้ก็ไม่ได้สัมพันธ์กับระยะทางตามภูมิศาสตร์ เป็นไปได้ว่าการถ่ายเทยีนและการแลกเปลี่ยนยีนกันระหว่างเชื้อต่างจีโนไทป์อาจเกิดขึ้นในธรรมชาติ จากผลการทดลองครั้งนี้อาจบ่งชี้ได้ว่าเชื้อพืเทียมอินสิดีโอซัมไม่สาวยพันธุ์ใดก็ตาม มีความเป็นไปได้ที่จะก่อให้เกิดโรคพืทีโอสิสเมื่อเชื้อพบกับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อต้องการในโฮสต์ที่ไวต่อการติดเชื้อ