ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46222

DETECTION OF *Cryptococcus neoformans* AND *Histoplasma capsulatum* IN SOIL CONTAMINATED WITH AVIAN AND BAT DROPPINGS BY NESTED-PCR

TREEPRADAB NORKAEW

MASTER OF SCIENCE
IN MICROBIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011

b00256087

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46222

DETECTION OF *Cryptococcus neoformans* AND *Histoplasma capsulatum* IN SOIL CONTAMINATED WITH AVIAN AND BAT Ddroppings BY NESTED-PCR

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

TREEPRADAB NORKAEW

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MICROBIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011

DETECTION OF *Cryptococcus neoformans* AND *Histoplasma capsulatum* IN SOIL CONTAMINATED WITH AVIAN AND BAT DROPPINGS BY NESTED-PCR

TREEPRADAB NORKAEW

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MICROBIOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON
Assist. Prof. Dr. Kunyaluk Chaicumpar

.....MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Pojana Sriburee

.....MEMBER
Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Pojana Sriburee

.....CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul

26 October 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and deepest appreciation to Assoc. Prof. Dr. Pojana Sriburee my thesis advisor, for her invaluable advices, supervision and encouragement throughout this study which enable me to carry out my study successfully. I express my sincere gratitude to Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul my co-advisor, for his guidance and valuable suggestions.

I would like to thank Dr. Yoshitsugu Miyazaki, Dr. Hideaki Ohno and Dr. Koichi Tanabe , Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases,Tokyo, Japan for their helpful guidance and providing some biological and chemical agents. My sincere gratitude is given to the examining committee, Assist. Prof. Dr. Kunyaluk Chaicumpar for her suggestions and helpful advice.

I give deep appreciation to my colleagues, Miss Siriporn Jongkae, Miss Piyawan Takarn, Miss Ariya Tzarphmaag, Mr. Aksarakorn Kummasook, Miss Panjaphorn Nimmanee for their help in laboratory techniques and their valuable suggestions.

Finally, I would like to express my gratitude and deepest appreciation to my family for their understanding and encouragement which never been forgotten.

Treepradab Norkaew

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

E 46222

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

E 46222

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.

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

E 46222

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

E 46222

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

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKHOWLEDGEMENT	iii
ABSTRACT (in English)	iv
ABSTRACT (in Thai)	vi
TABLE OF CONTENTS	viii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xiv
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
CHAPTER 2 LITERATURE REVIEWS	6
2.1 *Histoplasma capsulatum*	6
2.1.1 History and taxonomy	6
2.1.2 General morphology and characteristics	7
2.1.3 Sexual reproduction	9
2.1.4 Epidemiology and ecology	11
2.1.5 Pathogenesis	13
2.1.6 Diagnosis	13
2.1.7 Treatment	18
2.1.8 Isolation of *H. capsulatum* from soil	20

2.2 *Cryptococcus neoformans* 21

2.2.1 History and taxonomy 21

2.2.2 General morphology and characteristics 22

2.2.3 Sexual reproduction 23

2.2.4 Epidemiology and ecology 24

2.2.5 Pathogenesis 26

2.2.6 Diagnosis 28

2.2.7 Treatment 32

CHAPTER 3 OBJECTIVES 33

CHAPTER 4 MATERIALS AND METHODS 34

4.1 Experimental design 34

4.2 Sample collection 35

4.3 Material processing 42

4.4 DNA extraction 42

4.5 Detection of *Cryptococcus neoformans* in soil contaminated with avian and bat droppings by culture and nested-PCR 43

4.5.1 Isolation of *C. neoformans* by culture method 43

4.5.2 Detection of *C. neoformans* by nested PCR 44

4.5.3 Nucleotide sequence analysis of *C. neoformans* 46

4.5.4 Sensitivity test of PCR conditions of *C. neoformans* 47

4.5.5 Specificity test of PCR condition *C. neoformans* 48

4.6. Detection of *H. capsulatum* in soil contaminated with avian and bat droppings by nested-PCR 48

4.6.1 Detection of *H. capsulatum* by nested PCR 48

4.6.2 Nucleotide sequence analysis of *H. capsulatum* 49

4.6.3 Sensitivity test of PCR conditions of *H. capsulatum* 49

4.6.4 Specificity test of PCR condition *H. capsulatum* 50

CHAPTER 5 RESULTS 52

5.1 To detect *Cryptococcus neoformans* in soil contaminated with avian and bat droppings by culture and nested-PCR 52

5.1.1 Detection of *C. neoformans* by culture and nested PCR 52

5.1.2 Sensitivity test of PCR condition to detect *C. neoformans* 52

5.1.3 Specificity test of PCR condition to detect *C. neoformans* 53

5.2 To detect *Histoplasma capsulatum* in soil contaminated with avian and bat droppings by nested-PCR 61

5.2.1 Detection of *H. capsulatum* by nested PCR 61

5.2.2 Sensitivity test of PCR condition to detect *H. capsulatum* 61

5.2.3 Specificity test of PCR condition to detect *H. capsulatum* 62

CHAPTER 6 DISCUSSION 70

CHAPTER 7 SUMMARY 74

REFERENCES 77

APPENDIX 93

CURRICULUM VITAE 97

LIST OF TABLES

Table		Page
1	List of 267 soil contaminated with avian and bat dropping samples	35
2	Biochemical characteristics of *C. neoformans*	44
3	Oligonucleotide primers for 18S rDNA gene of *C. neoformans*	45
4	PCR master mix preparation for the detection of *C. neoformans*	46
5	Oligonucleotide primers for 100 kDa like protein gene of *H. capsulatum*	51
6	PCR master mix preparation for the detection of *H. capsulatum*	51
7	Detection of *C. neoformans* from soil contaminated with avian and bat droppings by culture and nested PCR	60
8	Detection of *H. capsulatum* in soil contaminated with avian and bat droppings by nested PCR	68
9	Nucleotide sequencing analyses of PCR products	69

11 Representative gel of PCR analyses with Hc I, Hc II and Hc III, Hc IV (bat guano samples) 63

12 Representative gel of PCR analyses with Hc I, Hc II and Hc III, Hc IV (chicken dropping samples) 64

13 Sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) using *H. capsulatum* specific primers 65

14 Ability to detect *Histoplasma capsulatum* cells in soil suspensions by nested PCR 66

16 Specificity of PCR assays with DNA from various pathogenic organisms by using Hc I - Hc II and Hc III - Hc IV primers 67

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	Percent
°C	Degree celcius
µg	Microgram
µl	Microliter
µM	Micromolar
x g	Gravity
g	Gram (s)
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
BLAST	Basic local alignment search tools
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
CFU	Colony forming unit
cm	Centrimeter
CNS	central nervous system
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
et al.	And others
h	Hour (s)
HIV	Human immunodeficiency virus
kDa	Kilodalton

Kb	Kilobase
M	Molar
mg	Milligram (s)
min	Minute (s)
ml	Milliliter (s)
mm	Millimeter (s)
mM	Millimolar
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MW	Molecular weight
ng	Nanogram
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolution per minute
s	Second
SDA	Sabouraud dextrose agar
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Taq	*Thermus aquaticus*
TAE	Tris-acetate buffer
U	Unit (s)
UV	Ultraviolet
V	Volt