รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อเรื่อง การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างประเภททางพันธุกรรมของเชื้อรากับความสามารถในการก่อโรค

ชื่อเรื่อง An association between fungal genotypes and their virulence

รหัสโครงการ
SCH-NR2011-144

อ. ดร. นายแพทย์ พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อเรื่อง การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างประเภททางพันธุกรรมของเชื้อรากับความสามารถในการก่อโรค

ชื่อเรื่อง An association between fungal genotypes and their virulence

รายนามคณะผู้วิจัย

1. อ. ดร. นายแพทย์ พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์
   หน่วยงานคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2. รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ภัทรชัย กีรติสิน
   หน่วยงานคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

วันเริ่มต้นโครงการ 1 สิงหาคม 2555
วันสิ้นสุดโครงการ 31 กรกฎาคม 2557

(..... / ตรวจสอบเนื้อหาแล้ว)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ปี พ.ศ. ที่ได้รับทุน 2555

บทคัดย่อ

Cryptococcus neoformans/C. gattii species complex เป็นกลุ่มของยีสต์ที่พบก่อโรคได้บ่อยในผู้ป่วยเอดส์ และพบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราในสมองของมนุษย์ โดยมีปัจจัยก่อโรคที่สำคัญคือ เมลานิน แคปซูล และความสามารถในการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถแบ่งได้เป็น 7 haploid molecular type ซึ่งประกอบไปด้วย VNI, VNII, VNIV ของ *C. neoformans* และ VGI. VGII, VGIII และ VGIV ของ *C. gattii* โดยส่วนใหญ่มากกว่า 90% พบ VNI เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อ *Cryptococcus* (cryptococcosis) พบได้มากที่สุด สำหรับในประเทศไทย เนื่องจากข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาโมเลกุลของโรค cryptococcosis ยังมีไม่เพียงพอ เชื้อ *Cryptococcus* จำนวน 235 สายพันธุ์ที่เก็บจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในปีพ.ศ. 2545 ถึง พ.ศ. 2548 จึงได้ถูกทำการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาโมเลกุลและปัจจัยก่อโรคของเชื้อ รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยก่อโรคกับ genotype ของเชื้อดังกล่าวเพื่อประโยชน์ในการทำนายความรุนแรงของการก่อโรคในอนาคต จากการศึกษาด้วยวิธี *URA5*-restriction fragment length polymorphism (*URA5*-RFLP) พบว่าแบ่งเป็น *C. neoformans* จำนวน 230 สายพันธุ์ และ *C. gattii* จำนวน 5 สายพันธุ์ โดย 94.1% ของเชื้อทั้งหมดเป็น molecular type VNI ในขณะที่ 3.8%, 0.4% และ 1.7% เป็น molecular type VNII, VGI และ VGII ตามลำดับ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. neoformans* ส่วนใหญ่ (99.1%) เป็นผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ในขณะที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อทั้งหมด (100%) เป็นผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชาย (64.3%) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยทั้งหมดคือ 36.3 ปี สิ่งส่งตรวจที่แยกเชื้อได้ส่วนใหญ่คือน้ำไขสันหลัง (77.4%) จากการศึกษาด้วยวิธี M13 polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting พบว่าเชื้อที่เพาะได้จากผู้ป่วยคนเดียวกันในเวลาต่างๆ กันเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน การศึกษาปัจจัยก่อโรคในจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า VNI สร้างเมลานินได้มากกว่า VNII ในขณะที่ VNII สร้างแคปซูลได้มากกว่า VNI โดยสรุป การศึกษานี้บ่งว่าระบาดวิทยาของ cryptococcosis ในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างทางด้านระบาดวิทยาโมเลกุลกับนานาชาติ และการติดเชื้อในคนเดียวกันทั้งหมดจะเกิดจากเชื้อสายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ดี ความสัมพันธ์ของปัจจัยการก่อโรคและ genotype (molecular type) ที่พบยังไม่สามารถตัดสินให้เด็ดขาดได้ เนื่องจากจำนวนสายพันธุ์ของ VNII มีน้อยเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับ VNI การศึกษาเพิ่มเติมจึงความจำเป็นเพื่อที่จะทำให้เข้าใจถึงปัจจัยก่อโรคของเชื้อได้ดีขึ้น เพื่อที่จะนำไปสู่การดูแลรักษาผู้ป่วยที่ดียิ่งขึ้นในอนาคต

คำสำคัญ ปัจจัยก่อโรค, *Cryptococcus*, molecular type, โรคติดเชื้อ

Abstract

Members of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex are the causative agents of cryptococcosis worldwide. A previous epidemiological study of the yeast in Thailand showed high genetic diversity. The current study now aims to investigate if there is a correlation of *in vitro* virulence and molecular type of Thai cryptococcal stains. Two hundred and thirty five isolates recovered between the years 2002-2005 from a tertiary hospital in Thailand were studied. The molecular type was determined by *URA5*-RFLP analysis. The majority (94.1%) of the isolates belonged to the molecular type VNI, while 3.8%, 0.4% and 1.7% of the isolates were VNII, VGI and VGII, respectively. Most patients infected with *C. neoformans* were HIV positive (99.1%) and all *C. gattii* infected patients were from HIV negative patients. The majority (64.3%) was male and the mean age was 36.3. Most strains were isolated from CSF (77.4%). All serial isolates were genetically identical based on M13 fingerprinting analyses. *In vitro* virulence studies showed that VNI isolates produced more melanin, but less capsule, than the VNII isolates. Our study suggests that recurrent cryptococcosis in Thailand is typically caused by the same strain as indicated by the same genotype. A definite correlation between virulence and molecular type of Thai cryptococcal isolates need further investigations on a great variety of cryptococcal isolates.

Keywords: Virulence factor, *Cryptococcus*, molecular type, infectious diseases

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
การทบทวนวรรณกรรม	1
การออกแบบการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ระเบียบวิธีวิจัย	4
ผลการวิจัย	7
สรุปผลการทดลอง	11
ปัญหาและอุปสรรค	12
บรรณานุกรม	13
ภาคผนวก	18
ประวัติของหัวหน้าโครงการ	**18**
ประวัติของผู้ร่วมวิจัย	24
ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ลงวารสารทางวิชาการ	28

สารบัญภาพ

หน้าที่

แผนภูมิที่ 1. แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง molecular types, species และ serotype ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans-gattii* species complex 2

แผนภูมิที่ 2. การออกแบบการวิจัย 4

รูปที่ 1. การกระจายทางภูมิศาสตร์ขอ molecular types ของ *C. neoformans / C. gattii* species complex ที่แยกได้ในการศึกษานี้ 7

รูปที่ 2. ตัวอย่างแสดงการประเมิน molecular type ด้วยวิธี *URA5*-RFLP 8

รูปที่ 3. ตัวอย่างของการประเมิน genotype จากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนเดียวกันด้วยวิธี M13 PCR fingerprinting 8

สารบัญตาราง

หน้าที่

ตารางที่ 1. การติดเชื้อ HIV ของผู้ป่วย ที่เป็นโรค cryptococcosis แยกตามสปีชีส์ของเชื้อ 9

ตารางที่ 2. ชนิดของตัวอย่างตรวจที่แยกเชื้อได้ 9

ตารางที่ 3. การศึกษาเปรียบเทียบการแสดงปัจจัยก่อโรคระหว่างสายพันธุ์ของ VNI และ VNII 10