

สถานการณ์ปัจจุบันด้านชีววิทยา และการทำให้เกิดโรคของเชื้อเพนิซิลีเลียม มาร์เนฟฟี

Current status on biology and pathogenesis of *Penicillium marneffei*

อักษรกร คำมาสุข*

Aksarakorn Kummasook*

แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

*ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: akummasook@gmail.com)

*Corresponding author (E-mail: akummasook@gmail.com)

Received April 23, 2014

Accepted as revised May 3, 2014

Abstract

Penicillium marneffei is a dimorphic fungus that causes an opportunistic infection in AIDS patients. It is endemic to Southeast Asia, Southern of China and Northeastern of India. Recently, molecular genetic studies lead to better understanding the risk of this fungal infection. Several factors contribute to the virulence of this fungus including adhesion to the macrophage by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the ability to switch from conidia to yeast cells, the protection from oxidative stress by melanin and stress-response proteins. Although recent studies have made progression in control of the infection, the pathogenesis of *P. marneffei* has yet to be understood.

Keywords: *Penicillium marneffei*, dimorphic fungus, fungal pathogenesis, opportunistic fungus, AIDS patient

บทคัดย่อ

เพนิซิลีเลียม มาร์เนฟฟีเป็นราสองรูปที่ก่อโรคฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์ แหล่งระบาดของเชื้ออยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตอนใต้ของประเทศจีน และเขตตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย ปัจจุบันมีการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ของเชื้อทำให้มีความเข้าใจปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคมมากขึ้น ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคมียหลายประกอบด้วย glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ซึ่งใช้ในการเกาะติดกับแมคโครฟาจ ความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนรูปจากโคนิดีเป็นยีสต์ การปกป้องจากการถูกทำลายโดยสภาวะเครียดแบบออกซิเดชันโดยเมลานินและโปรตีนที่สร้างขึ้นในสภาวะที่เชื้อมีความเครียด ถึงแม้ว่าความรู้จากการศึกษาเร็ว ๆ นี้ช่วยให้สามารถควบคุมการติดเชื้อได้ดีขึ้นอย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษากลไกการก่อโรคของเชื้อเพื่อให้เข้าใจมากยิ่งขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: เพนิซิลีเลียมมาร์เนฟฟี ราสองรูป การทำให้เกิดโรค เชื้อราฉวยโอกาส ผู้ป่วยเอดส์

Penicillium marneffei เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสในผู้ที่มิภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ โดยเฉพาะในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮองกง จีน และตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย¹⁻⁴ ในการศึกษาแหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อนี้ นักวิทยาศาสตร์คาดว่าเชื้อน่าจะอาศัยอยู่ในดิน แต่การแยกเชื้อส่วนใหญ่สามารถแยกได้จากอวัยวะภายในของสัตว์ในตระกูลอื่น⁵ แต่อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ยังเชื่อว่าเชื้อน่าจะอาศัยอยู่ในดินที่ขึ้น และผู้ป่วยได้รับเชื้อผ่านทางหายใจ⁶ เชื้อนี้จัดเป็นราสองรูปที่สามารถเจริญในรูปร่างที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และสามารถเปลี่ยนรูปร่างเป็นยีสต์โดยแบ่งเซลล์แบบ fission ที่สภาวะอุณหภูมิในร่างกายมนุษย์ ในการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อในห้องปฏิบัติการประจำวัน อาศัยการย้อมสีลักษณะรูปร่างของเชื้อที่อยู่ในแมกโครฟาจ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่างของเชื้อ¹ การศึกษาระดับโมเลกุลส่วนใหญ่เน้นการศึกษาในที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของเชื้อ ทำให้มีความเข้าใจกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อนี้มากขึ้น⁷ นอกจากนี้ยังมีความพยายามศึกษาปัจจัยภายในตัวเชื้อที่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงของโรค⁸⁻¹⁰ ซึ่งทำให้เข้าใจพื้นฐานของเชื้อและกลไกในการก่อโรค เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุม ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ *P. marneffei* ต่อไป

ประวัติความเป็นมาและการระบาดของ *Penicillium marneffei*

Penicillium marneffei แยกได้ครั้งแรกจากตับของอาน (Rhizomys sinensis) ในประเทศเวียดนาม¹¹ Dr. Gabnella Segretain เป็นผู้จำแนกชนิดของ *P. marneffei* โดยตั้งชื่อให้เป็นเกียรติแก่ Dr. Hubert Marneffe ผู้อำนวยการสถาบันปาสเตอร์แห่งอินโดจีน¹² และเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น โดยมีรายงานการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคฮอดจ์กินส์ซึ่งมีประวัติการเดินทางมายังประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้¹³ และเริ่มมีรายงานการติดเชื้อในผู้ป่วยเอดส์ครั้งแรกปี ค.ศ. 1988 ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมามีรายงานการติดเชื้อในผู้ป่วยเอดส์มากขึ้น ผู้ป่วยส่วนใหญ่มาจากประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไต้หวัน ตอนใต้ของปะเทศจีน และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย¹ สำหรับผู้ป่วยที่อยู่นอกเขตการระบาดของเชื้อนี้มักมีประวัติการเดินทางท่องเที่ยวในแหล่งระบาดมาก่อนและเกิดอาการป่วยขึ้นหลังจากเดินทางกลับประเทศของตน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีจะได้รับการรักษาดีขึ้น โอกาสการติดเชื้อฉวยโอกาสน้อยลง แต่ยังมีรายงานการติดเชื้อนี้ในผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวีมากขึ้น¹⁴⁻¹⁶ ดังนั้นจึงยังมีการศึกษาและติดตามการระบาดต่อไป สำหรับชื่อ *P. Marneffei* ได้มีการใช้มาจนถึงปัจจุบัน แต่ข้อมูลการเปรียบเทียบในระดับสารพันธุกรรมล่าสุดได้จัดให้ *P. marneffei* เป็น *Talaromyces marneffei*¹⁷

การติดเชื้อ *P. marneffei* มักพบจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นหรือลดลงควบคู่ไปกับรายงานผู้ป่วยเอดส์ทั้งในประเทศไทยและประเทศเวียดนาม^{6, 15, 18} แหล่งระบาดของเชื้อนี้พบในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮองกง ตอนใต้ของประเทศจีน และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย¹⁻⁴ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ยังไม่ทราบผู้ป่วยได้รับเชื้อด้วยวิธีใด แต่มีความเชื่อว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อผ่านทางหายใจ ซึ่งเป็นกลไกที่พบได้ในเชื้อราสองรูปอื่น เช่น *Histoplasma capsulatum* เป็นต้น^{8, 19} โดยคาดว่าเชื้อน่าจะปนเปื้อนอยู่ในดินที่ขึ้น ถึงแม้ว่าการแยกเชื้อจากดินจะสามารถแยกได้เพียง 1 ไอโซเลท²⁰ เชื้อที่แยกจากแหล่งธรรมชาติส่วนใหญ่แยกได้จากอวัยวะภายในของสัตว์ตระกูลอื่นดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสามารถแยกเชื้อได้จากอานที่มาจากประเทศที่เป็นแหล่งระบาดของเชื้อนี้ ประกอบด้วย ไทย จีน อินเดีย และเวียดนาม และแม้ว่าจะมีความพยายามแยกเชื้อจากดินบริเวณใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่ของอาน แต่รายงานส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกจากดินได้ ในการพบ *P. marneffei* ในอวัยวะภายในของอาน ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าอานเป็นแหล่งแพร่เชื้อมาสู่คน เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่เคยสัมผัสกับอานมาก่อน และแหล่งอาศัยของอานมักอยู่ในป่า ดังนั้นการพบเชื้อในอานอาจเกิดจากการติดเชื้อของอานตามธรรมชาติหรือ อานเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อตามธรรมชาติโดยที่ไม่ได้ก่อโรคกับอาน และอาจเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจปนเปื้อนออกมาจากดินและน้ำตามธรรมชาติ แต่การศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกเชื้อจากดินบริเวณที่อยู่ใกล้กับแหล่งที่อยู่ของอานทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการศึกษาส่วนใหญ่ทำขึ้นในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งทั้งสองฤดูนี้อาจจะมีเชื้อในดินน้อย รายงานจำนวนผู้ป่วยในประเทศไทยสอดคล้องกับรายงานจากประเทศเวียดนามว่ามีจำนวนผู้ป่วย *P. marneffei* มากขึ้นในช่วงฤดูฝน จึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อจากดินที่มีความชุ่มชื้น^{5, 6, 18}

รูปร่างและการเจริญของ *Penicillium marneffei*

รูปร่างของ *Penicillium marneffei* ในสภาวะ mold form (25 °C)

ในการเพาะเลี้ยง *P. marneffei* สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ไป เช่น Sabouraud's dextrose agar (SDA) Potato dextrose agar (PDA) และ Malt extract agar (MEA) แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน Mycosel agar ซึ่งเป็นอาหารที่ผสม cycloheximide เนื่องจาก cycloheximide มีผลยับยั้งการเจริญของ *P. marneffei* การเพาะเลี้ยง *P. marneffei* เพื่อให้เชื้อสร้างรูปร่างสภาวะราสายนิยมใช้ SDA ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล dextrose 2% ซึ่งเชื้อสามารถเจริญและสร้างคอนิเดียได้ดีเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน และอุณหภูมิห้องประมาณ 25-28 °C สำหรับอุณหภูมิที่จัดว่าเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อให้อยู่สภาวะราสายควรต่ำกว่า 30 °C¹

ตารางที่ 1 Prevalence of *Penicillium marneffei* in bamboo rats in endemic area.

Country	Species of rats	Number of rats positive/ Number of studied	Frequency (%)	Reference
Thailand	<i>Rhizomys pruinus</i>	6/8	75	20, 21
	<i>Rhizomys sumatrensis</i>	13/14	92.86	
	<i>Cannomys badius</i>	9/41	21.95	
China	<i>Rhizomys pruinus</i>	148/221	66.97	22, 23, 24, 25
India	<i>Cannomys badius</i>	10/110	9.09	26
Vietnam	<i>Rhizomys sinensis</i>	1/1	100	11

โคโลนีของเชื้อเมื่อเจริญในสภาวะราสาย (รูปที่ 1A) บนอาหาร SDA ในขณะที่ยังมีอายุน้อยประมาณ 1-2 วัน มีลักษณะเป็นสายราสี (hyaline) มีผนังกัน (septate) ผิวหน้าโคโลนีสีขาวในช่วงแรก จากนั้นจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนและสีเขียวจนถึงสีเขียวเข้มอันเนื่องมาจากสีของคอนิเดียที่สร้างขึ้นเมื่ออายุของโคโลนีมากขึ้น ระยะเวลาเจริญเติบโตเต็มที่ประมาณ 5-7 วัน¹ ลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งคือ เชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีแดงละลายในอาหารได้ โดยจะเริ่มเห็นการสร้างรงควัตถุสีแดงในวันที่ 2-3 หลังจากการเพาะเลี้ยง รงควัตถุสีแดงที่พบนี้แตกต่างจากที่พบใน *Trichophyton rubrum* โดยพบว่ารงควัตถุสีแดงที่ *P. marneffei* สร้างขึ้นสามารถละลายในน้ำได้ จึงมีการกระจายตัวของสีแดงไปในอาหาร เมื่อบ่มให้นานขึ้นประมาณ 4-5 วัน จะพบลักษณะอาหารมีสีแดงทั้งจานเพาะเลี้ยงหรือหลอด ในขณะที่โคโลนีของ *T. rubrum* จะพบลักษณะสีแดงเฉพาะใต้โคโลนีเท่านั้น ในการจำแนกชนิดของรงควัตถุสีแดงที่ *P. marneffei* สร้างขึ้นพบว่า เป็นสารที่มีความคล้ายคลึงกับ herquinone ที่พบในเชื้อ *P. herquei* กล่าวคือ การเรียงตัวเป็นแบบ phenalene²⁷ บทบาทและความสำคัญของรงควัตถุสีแดงต่อการก่อโรคของ *P. marneffei* ยังไม่เป็นที่แน่ชัด

เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมีการเจริญเป็นสายราสี มีผนังกัน (hyaline septate hyphae) เมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศชนิด phialoconidia โดยเริ่มต้นจากการสร้างก้านชูคอนิเดีย (conidiophore) จากนั้นสร้างส่วนของ metulae และงอกส่วนของ phialide หรือเรียกว่า sterigma ส่วนปลายของ phialide มีการสร้างคอนิเดียต่อกันเป็นเส้นสาย (รูปที่ 1C) คล้ายนิ้วมือ (finger-like structure) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปใน *Penicillium* spp. ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อนี้ออกจาก *Penicillium* spp. อื่นๆ ได้^{1, 28}

รูปร่างของ *Penicillium marneffei* ในสภาวะ yeast (37 °C)

การเพาะเลี้ยง *P. marneffei* ให้อยู่ในสภาวะยีสต์ อาจทำได้โดยใช้อาหารที่มีความสมบูรณ์ทั้งอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง ที่นิยมใช้คือ brain heart infusion agar (BHA) แต่อาหารชนิดนี้มักปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย จึงไม่นิยมใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง (ยกเว้นสิ่งส่งตรวจที่มาจากบริเวณที่ปราศจากเชื้อ) แต่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำเชื้อราสองรูปที่แยกได้จากสภาวะราสายแล้ว อนุกรมวิธาน

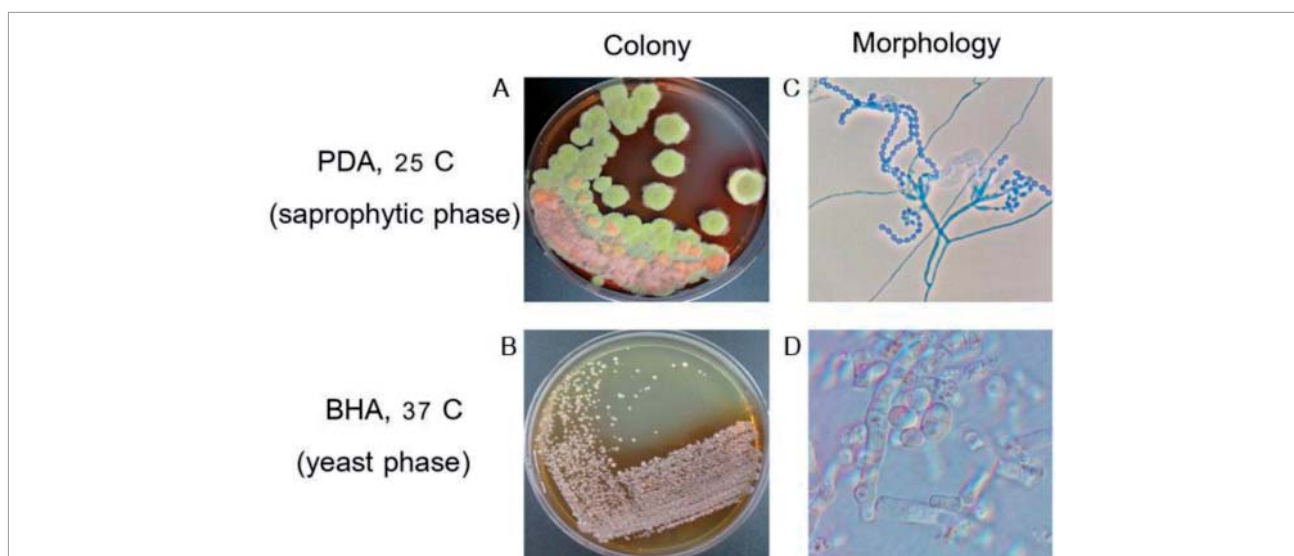


Figure 1 Colony appearance and microscopic morphology of *Penicillium marneffei*. *P. marneffei* was cultured on potato dextrose agar (PDA) for 5 days at 25°C (saprophytic phase; A) and brain heart infusion agar (BHA) at 37°C (parasitic phase; B). Microscopic morphology of mold (C) and yeast (D) of *P. marneffei* was observed under light microscope (magnification x400).

เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาวะยีสต์คือ 37 °C
เชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลกระจายลงในเนื้ออาหาร

ของเชื้อที่เจริญในสภาวะยีสต์ในอาหาร BHA (รูปที่ 1B) จะให้โคโลนีเป็นยีสต์สีขาวหรือสีครีมค่อนข้าง ดิดแน่นกับอาหาร การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 1D) จะพบลักษณะเป็นเส้นสายท่อนสั้นๆ มีผนังกันค่อนข้างถี่ ลักษณะคล้าย arthroconidia (arthroconidia-like) และสามารถพบยีสต์รูปร่างกลม หรือ สีเหลี่ยมที่มีการแบ่งภายในเป็นสอง (fission yeast)^{1, 28, 29}

ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของ

Penicillium marneffe

P. marneffe จัดเป็นราสองรูป เจริญได้ 2 สภาวะ ที่มีรูปร่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน ปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อนี้แบ่งเป็น 2 ปัจจัยหลักคือ ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ปัจจัยภายนอกที่พบว่าส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อ *P. marneffe* คือ อุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย *P. marneffe* จะมีการสร้างรูปร่างเป็นราสายในสภาวะอุณหภูมิห้อง (<30 °C) และอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสร้างรูปร่างเป็นยีสต์คืออุณหภูมิในร่างกายของมนุษย์ (37 °C) เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ นักวิทยาศาสตร์คาดว่าน่าจะเป็นการปรับตัวเพื่อหลบหลีกการทำลายจากภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ อาหารเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่ง เนื่องจากการเปลี่ยนรูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ต้องอาศัยสารประกอบไนโตรเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง L-glutamine สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ เช่น L-asparagine L-arginine และ NH₄SO₄ กลับมีผลต่อการเหนี่ยวนำรูปร่างยีสต์ของเชื้อได้น้อย³⁰ มีรายงานว่า 1% peptone เป็นอาหารที่ทำให้เชื้อมีการเปลี่ยนรูปเป็นยีสต์ได้ค่อนข้างสมบูรณ์มีลักษณะรูปร่างของเชื้อใกล้เคียงกับเชื้อที่อยู่ภายในแมคโครฟาจ³¹ นอกจากอุณหภูมิและอาหารแล้ว ปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ อาจมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของ *P. marneffe* เนื่องจากลักษณะรูปร่างของเชื้อที่พบภายในแมคโครฟาจมักเป็นรูปยีสต์แบ่งตัวแบบแบ่งครึ่ง(fission yeast) ในขณะที่เมื่ออยู่นอกแมคโครฟาจจะมีลักษณะคล้าย arthroconidia แสดงว่าสภาวะแวดล้อมภายในแมคโครฟาจมีผลต่อการสร้างรูปร่างเป็นยีสต์แบบแบ่งครึ่ง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่า สารชนิดใดในเซลล์แมคโครฟาจที่มีผลต่อการสร้างรูปร่างยีสต์ของเชื้อ เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจต่อกระบวนการสร้างรูปร่างของ *P. marneffe* อย่างถ่องแท้ต่อไป สำหรับปัจจัยภายในที่มีผลต่อรูปร่างของเชื้อคือ ยีนต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของ *P. marneffe* ในการศึกษาที่ผ่านมาเน้นยีนที่กำหนดการสร้าง transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นๆ⁷ โดยยีนส่วนใหญ่ที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของเชื้อมักเป็นยีนที่มีความเหมือนกับยีนที่เคยมีการศึกษามาก่อนแล้วในเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น *Aspergillus nidulans* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อโดยการทำให้

เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มเกิดด้วยวิธี *Agrobacterium-mediated transformation* (AMT)^{32, 33} ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีรูปร่างผิดปกติไปจากเชื้อในธรรมชาติ ตัวอย่างการศึกษาที่มีผลต่อรูปร่างของเชื้อ เช่น *sadA* ของ *P. marneffe*³⁴ ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีน S-adenosylmethionine decarboxylase ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างสารโพลีเอมีนส์ เช่น spermidine เป็นต้น ในเชื้อกลายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของยีน *sadA* พบว่าเชื้อไม่สามารถสร้างรูปร่างเป็นคอนิเดียได้ แต่เมื่อเติมสาร spermidine ลงไปจะทำให้เชื้อสามารถสร้างคอนิเดียได้ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปร่างจากราสายไปเป็นยีสต์ของ *Histoplasma capsulatum*^{35,36} ด้วยเทคนิค AMT สามารถแยกเชื้อกลายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่างเป็นยีสต์ได้ ยีนกลุ่มนี้กำหนดการสร้างโปรตีน *Ryp1 Ryp2* และ *Ryp3* (required for yeast phase growth) ซึ่งมีบทบาทการเปลี่ยนรูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจศึกษาโปรตีน *Ryp* ในเชื้อ *P. marneffe* ด้วยเช่นกันเพื่อให้เข้าใจกลไกการเปลี่ยนรูปร่างที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

ปัจจัยต่อความรุนแรงของโรคของ *P. marneffe*

นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสภาวะยีสต์ของเชื้อเป็นสภาวะที่ก่อโรค ดังนั้นจึงมีความพยายามหายีนหรือโปรตีนที่มีการแสดงออกมากในขณะที่ยีสต์อยู่ในสภาวะยีสต์^{10, 37-40} การค้นหายีนที่มีการแสดงออกมากในสภาวะยีสต์เป็นเพียงก้าวแรกของการศึกษาที่มีบทบาทในการก่อโรค และคาดว่าน่าจะมียีนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคในสัตว์ทดลอง ยังให้ผลไม่ชัดเจนเนื่องจากขาดรูปแบบการทดลองที่เหมาะสม คือหนูทดลองที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเช่น การใช้หนูนอนพยาธิอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในอนาคตเพื่อทดแทนหนูทดลอง และการศึกษาบทบาทของยีนที่แน่ชัดต้องอาศัยการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ในส่วนของยีนนั้น และทดสอบความสามารถในการก่อโรคในหนูนอนพยาธิหรือในสัตว์ทดลองที่เหมาะสม ต่อไป

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการรายงานโปรตีนที่คาดว่าน่าจะมีบทบาทในการก่อโรคที่สำคัญมีหลายชนิด ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะที่สำคัญดังนี้

Adhesins

กลไกแรกของการติดเชื้อและก่อโรคของจุลชีพที่อาศัยและแบ่งตัวอยู่ในเซลล์คือ การเกาะติดกับเซลล์เป้าหมาย โปรตีนที่ทำหน้าที่เกาะติดชื่อ adhesin โดยเกาะติดกับตัวรับ (receptor) ของเซลล์เป้าหมาย การศึกษา adhesin ใน *P. marneffe* ยังมีน้อย และยังไม่มีการศึกษาเชื้อกลายพันธุ์ที่สูญเสียคุณสมบัติการเกาะติดกับเซลล์เป้าหมาย แต่มีรายงานการศึกษารายการของยีนกำหนดการสร้าง glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ใน *P. marneffe* พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกมากในช่วงที่เชื้ออยู่ในสภาวะ

คอนิเดียหรือราสาย แต่การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ลดลงในสภาวะที่เป็นยีสต์⁴¹ ในขณะที่การแสดงออกในระดับ โปรตีนเท่ากันในทั้งสองสภาวะ³⁹ และต่อมาได้มีการใช้ แอนติบอดีต่อ GAPDH เพื่อทดสอบการเกาะติดของคอนิเดีย กับแมคโครฟาจ พบว่าในสภาวะที่มีแอนติบอดีต่อ GAPDH จะเกิดการยับยั้งการเกาะติดของคอนิเดียของ *P. marneffei* กับแมคโครฟาจ¹⁰ แสดงให้เห็นว่า GAPDH มีบทบาทต่อการ เกาะติดเซลล์เป้าหมายของ *P. marneffei* และเช่นเดียวกับที่ พบใน *Paracoccidioides brasiliensis*⁴²

เมื่อ *P. marneffei* เจริญและแบ่งตัวในแมคโครฟาจแล้ว จะสามารถทำลายแมคโครฟาจได้ในที่สุด และแพร่กระจายติด เชื้อในแมคโครฟาจอื่นต่อไป แต่การติดเชื้อในครั้งที่สองนี้น่า จะใช้ adhesin ต่างชนิด สำหรับ *Pneumocystis carinii* (jiroveci) ใช้ major surface glycoprotein type II (MSG) เกาะ ติดกับ fibronectin หรือ แมคโครฟาจ⁴³ จะยังไม่มีการศึกษา หน้าทีของโปรตีนชนิดนี้ใน *P. marneffei* แต่จากการศึกษาการ แสดงออกของยีนในสภาวะต่างๆ พบว่าโคลน Y674 ซึ่งมีความ เหมือนกับ MSG ของ *P. carinii* 46% ที่มีการแสดงออกของ ยีนในสภาวะที่เป็นยีสต์มากกว่าในสภาวะที่เป็นราสายถึง 364 เท่า³⁷ อาจเป็นไปได้ว่า MSG ของ *P. marneffei* อาจมีบทบาท เป็น adhesin ในขณะที่เชื้อมีรูปร่างเป็นยีสต์ อย่างไรก็ตาม ยัง ต้องมีการศึกษาบทบาทและหน้าที่ที่แท้จริงของโคลน Y674 ต่อไป

Dimorphic switching factors

การเปลี่ยนรูปร่างราสายเป็นยีสต์เป็นกลไกที่สำคัญอีก อย่างหนึ่งของการก่อโรคในกลุ่มเชื้อราสองรูป เช่น *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* และ *P. marneffei*^{1, 8, 44} เชื้อราเหล่านี้สามารถ อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยได้โดยการเปลี่ยนรูปร่างจากรา สายยีสต์ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง คือ อุณหภูมิของร่างกาย แม้จะทราบว่ามีปัจจัยภายนอก ที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิและอาหาร เป็นต้น^{8, 30, 31} นักวิทยาศาสตร์ยังไม่ทราบกลไกภายในตัวเชื้อที่ทำให้เกิดการ เปลี่ยนรูป จากรายงานต่างๆ พบว่ายีนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน รูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ใน *P. marneffei* ประกอบด้วยยีน *abaA* การหายไปของยีนทำให้เชื้อเปลี่ยนรูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ได้ไม่ สมบูรณ์⁴⁵ และยีน *pakB* ซึ่งพบที่มีความจำเป็นในการเปลี่ยน รูปร่างเป็นยีสต์เมื่ออยู่ในแมคโครฟาจ แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนรูป ในหลอดทดลอง⁴⁶ แม้จะทราบว่ามีหลายยีนเกี่ยวข้องในการ เปลี่ยนรูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ แต่ด้วยเหตุผลที่ยังไม่สามารถ นำเชื้อกลายพันธุ์ไปทดสอบความรุนแรงในการก่อโรค จึงไม่ สามารถสรุปได้ว่ายีนใดที่เป็นปัจจัยก่อความรุนแรง หาก สามารถพิสูจน์ได้ว่ายีนใดที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปและ ก่อโรค จะสามารถชี้ยีนนั้นเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคติด เชื้อรา *P. marneffei* โดยอาจออกแบบยาต้านเชื้อราที่มีผลต่อ โปรตีนที่กำหนดการสร้างโดยยีนที่น่าสนใจเหล่านั้นได้

นอกจากนี้ ยังอาจจะมียีนอื่น อีกมากที่ยังไม่มีการศึกษา บทบาทในการควบคุมการเปลี่ยนรูปร่างจากราสายเป็นยีสต์ ใน *H. capsulatum* พบว่ายีน *ryp1 ryp2* และ *ryp3* เป็นยีนสำคัญ ที่มีบทบาทในการทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างจากราสายไปเป็น ยีสต์^{35, 36} ซึ่งน่าสนใจที่จะศึกษายีนที่มีความคล้ายคลึงกับยีนดัง กล่าวใน *P. marneffei* ต่อไป

Stress response and adaptation proteins

สภาวะเครียดจากสารออกซิแดนท์ (oxidative stress) เป็นกลไกพื้นฐานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์ โมโนไซต์ แมคโครฟาจและโพลิมอร์โฟนิวเคลียร์ เพื่อกำจัดเชื้อ ที่เข้ามาอาศัยอยู่ภายในเซลล์ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้สามารถ กำจัดเชื้อได้โดยการผลิต reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีพิษต่อจุลชีพโดยทำลาย DNA ไขมัน และโปรตีนต่างๆ⁴⁷ เชื้อจุลชีพจึงสร้างเอนไซม์ต่างๆ เพื่อลดความเป็นพิษเหล่านั้น เช่น superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเปลี่ยน O_2^- ไปเป็น H_2O_2 และ O_2 และ catalase หรือ catalase peroxidase เพื่อ เปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็นน้ำและก๊าซออกซิเจน⁴⁸ สำหรับใน *P. marneffei* ยังไม่มีการศึกษาเชื้อกลายพันธุ์ที่กำหนด การสร้าง SOD หรือ catalase แม้จะมีรายงานการจำแนกยีน ที่กำหนดการสร้าง SOD คือ *sodA*⁴⁹ ซึ่งพบการแสดงออกมาก ในสภาวะที่เชื้อกำลังเปลี่ยนรูปเป็นยีสต์ และสภาวะที่เชื้อถูก กินโดยแมคโครฟาจ ส่วนยีนที่กำหนดการสร้าง catalase peroxidase (*cpeA*) พบมีการแสดงออกมากในสภาวะที่เชื้อ เป็นยีสต์สมบูรณ์และเชื้อที่ถูกกินโดยแมคโครฟาจ ดังนั้นทั้ง สองยีนนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการปกป้องอันตรายจาก สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน⁸

ความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงเป็นปัจจัย สำคัญในการก่อโรคของเชื้อเช่นกันโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้อง กับการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไปคือ heat shock proteins เพิ่มปริมาณได้มากในขณะที่มีการติดเชื้อเพื่อ ป้องกันความผิดปกติของโปรตีนอื่น ๆ⁵⁰ มีการศึกษายีนที่ กำหนดการสร้างโปรตีน Hsp70 พบว่ายีนนี้ตอบสนองต่อ สภาวะอุณหภูมิที่สูงขึ้นจาก 25 ไปเป็น 37 °C^{39, 51} และอุณหภูมิ ที่สูงในระดับไข้ 39 °C⁵¹ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Hsp70 ตอบ สสนองต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อปกป้องโปรตีนอื่น ๆ ของ *P. marneffei* ในขณะที่สิ่งแวดล้อมเปลี่ยน ไปหรือกำลังเข้าไป อยู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจ โปรตีนนี้อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้เช่นกัน⁸

มีความเชื่อว่ที่เกี่ยวข้องกับ glycoxylate cycle เกี่ยวข้อง กับกลไกการก่อโรคของเชื้อราก่อโรค⁵² glyoxylate cycle ประกอบด้วย 2 กระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ isocitrate lyase และ malate synthase เป็นกระบวนการลด ทอนขั้นตอนการเอคาร์บอนออกของ TCA cycle โดยมัก เกิดขึ้นในสภาวะที่ขาดกลูโคส เช่น สภาวะที่เชื้ออยู่ภายใน แมคโครฟาจ⁵³ ตัวอย่างการศึกษาใน *Candida albicans*

พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ isocitrate lyase มีการแสดงออกมากขึ้นในขณะที่เชื้อเจริญอยู่ในแมคโครฟาจ และเชื้อกลายพันธุ์ที่ขาด ยีนนี้ลดความรุนแรงในการก่อโรคในหนูได้⁵² สำหรับใน *P. marneffei* พบว่ากำหนดการสร้าง isocitrate lyase (*acuD*) มีการแสดงออกมากในสภาวะยีสต์^{29, 38} และในขณะที่มีการติดเชื้อในแมคโครฟาจ⁴¹ ต่อมา มีการทดสอบเชื้อที่ได้ knockdown ยีน *acuD* โดยอาศัยหลักการของ RNAi พบว่าเชื้อลดความสามารถในการทำลายและลดการสะสมเชื้อในหนูทดลอง บ่งชี้ว่ายีนดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการก่อความรุนแรงของโรค⁵⁴

Secreted enzymes

ในขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา เชื้อก่อโรคเหล่านั้นมักสร้างเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อทำลายโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน หรือ ลดความเป็นพิษของสารที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสร้างขึ้น การศึกษาเอนไซม์ใน *P. marneffei* ยังมีไม่มากนัก ในสภาวะเป็นยีสต์พบการสร้าง acid phosphatase⁵⁵ ซึ่งเชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่ช่วยลดการสร้าง superoxide anion และลดการเกิด ROS ของนิวโทรฟิลเหมือนใน *Francisella tularensis*⁵⁶ ส่งผลให้เชื้อสามารถอยู่รอดในเซลล์มากขึ้น ดังนั้นเอนไซม์นี้อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคเหมือนกับพบในเชื้อ *Coxiella burnetii*⁵⁷

เอนไซม์ที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งคือ proteinases ซึ่งถูกจัดให้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคดังเช่นที่พบใน *Candida albicans*⁵⁸ และ *Aspergillus fumigatus*⁵⁹ สำหรับการศึกษาใน *P. marneffei*⁶⁰ พบ serine protease ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถย่อยสลาย elastin fibronectin และ fibrinogen ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีบทบาทที่สำคัญในการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วยซึ่งอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อนี้

Melanins

เมลานินเป็นสารที่มีสีดำหรือสีเข้มพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายประเภททั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ ในเชื้อรา เมลานินมีส่วนช่วยให้เชื้ออยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมโดยเฉพาะภายในเซลล์เป้าหมายและสามารถลดความไวของเชื้อต่อยาด้านเชื้อราได้อีกด้วย⁶¹ การศึกษาใน *P. marneffei* พบว่าเชื้อสามารถสร้างเมลานินได้ทั้งที่อยู่ในรูปคอนิเดียและ ยีสต์ และเชื้อที่อยู่ในเนื้อเยื่อของผู้ป่วย⁶² เมื่อศึกษาในระดับเซลล์พบว่าเมลานินฝังตัวอยู่ในผนังชั้นในสุดของเซลล์ขนาด 100 nm และจากความรู้ที่ว่า Kojic acid สามารถยับยั้งการสร้างเมลานินของ *P. marneffei* ได้ จึงสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีและไม่มีเมลานินได้ จากนั้นนำไปทดสอบการกินโดยแมคโครฟาจ พบว่ายีสต์ที่มีเมลานินสามารถลดการถูกจับกินโดยแมคโครฟาจและทนต่อการถูกทำลายภายในเซลล์⁹ จากผลการศึกษา นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าเมลานินเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค

พยาธิสภาพและการตรวจวินิจฉัย

นักวิทยาศาสตร์คาดว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อทางหายใจ จากนั้นเข้าไปอาศัยอยู่ในแมคโครฟาจในปอด ในคนปกติจะสามารถกำจัดเชื้อได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว แต่ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อจะไม่ถูกกำจัดและสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์แมคโครฟาจของผู้ป่วยลักษณะของ *P. marneffei* ในแมคโครฟาจมีขนาดเล็กประมาณ 2-3 x 2-7 μ m คล้ายกับ *H. capsulatum* ทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดเป็นโรค histoplasmosis⁸ แต่สามารถแยกจากกันได้โดยความแตกต่างของการแบ่งเซลล์ *P. marneffei* แบ่งเซลล์แบบ fission ส่วน *H. capsulatum* แบ่งแบบ budding นอกจากการพบเชื้อในแมคโครฟาจแล้วยังสามารถพบเชื้อในรูปยีสต์ภายในเซลล์อื่นที่ไม่ใช่ phagocyte เช่น epithelium ได้ด้วย⁶³ เมื่อผู้ป่วยติดเชื้อที่ปอดจะแสดงอาการของโรคปอด และเมื่อเชื้อแบ่งตัวมากขึ้นจะมีการแพร่กระจายจากปอดไปยังอวัยวะอื่นที่สำคัญอื่นๆ เช่น ตับ ม้าม ไต สมอง รวมถึงบริเวณที่ผิวหนัง ดังนั้นสิ่งส่งตรวจที่นิยมส่งตรวจจึงมีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับลักษณะอาการของผู้ป่วยนั้นๆ สิ่งส่งตรวจที่นิยมใช้ได้แก่ ไขกระดูก น้ำไขสันหลัง เลือด ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลืองหรือผิวหนังหรือปอดหรือตับ ขูดจากผิวหนัง เสมหะ น้ำจากช่องท้อง อุจจาระ ปัสสาวะ³ ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* คือ มีไข้ ชีต น้ำหนักลด ต่อมน้ำเหลืองโต มีตุ่มบริเวณผิวหนัง ตับและม้ามโต อาการเหล่านี้ไม่สามารถแยกจากโรคติดเชื้อราชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะ histoplasmosis⁶⁴ จึงต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อทั้งแบบเบื้องต้น และการใช้เทคนิคขั้นสูงดังต่อไปนี้

การย้อมสี

ไขกระดูก หรือ สิ่งส่งตรวจที่มาจากปายบริเวณผิวหนังหรือชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลืองสามารถนำมาย้อมด้วยสี Wright's หรือ Giemsa ตรวจหาลักษณะของ binary fission yeast จัดว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูง สะดวก ราคาประหยัด เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป⁶⁵ นอกจากนี้ยังสามารถย้อมด้วยสีย้อมขึ้นเนื้อเช่น Grocott methenamine silver หรือ periodic-acid-Schiff ส่วนการย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin อาจทำให้ดูคล้ายเชื้อสร้างแคปซูล⁶⁶ เชื้อที่อยู่ในเซลล์มีรูปร่างรีหรือกลม มีและขนาดใกล้เคียงกัน ในขณะที่เชื้อนอกเซลล์มีลักษณะยาวกว่า¹⁹ แม้ว่าการย้อมสีอาจเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะต่ำกว่าวิธีอื่น มีประโยชน์มากหากผู้ปฏิบัติงานมีความเชี่ยวชาญในการดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ เพราะสามารถตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นได้รวดเร็วและมีราคาประหยัด และจะเป็นประโยชน์มากหากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ผลเป็นลบ แต่ผู้ป่วยติดเชื้อนี้จริง⁶³

การเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อจัดเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffei* ความไวในการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่ง

ตรวจ ไช้กระดูก ขึ้นเนื่องจากผิวหนัง และเลือด พบเป็นร้อยละ 100 90 และ 76 ตามลำดับ³ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำจากไขสันหลัง เสมหะ ของเหลวจากปอด และชิ้นเนื้อตับ⁶⁷ ห้องปฏิบัติการประจำวันจะสามารถแยกเชื้อได้จากเลือดมากที่สุด¹⁵ โดยเฉพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25-30 °C บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA โคโลนีของเชื้อจะเหมือนกับเชื้อ *Penicillium* spp. แต่พบการสร้างรงควัตถุสีแดงเข้มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้ออาศัยรูปร่างของเชื้อเป็นลักษณะสำคัญ ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่างเป็นยีสต์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHA ลักษณะของยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนี้มักพบขนาดยืดยาวกว่าเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ ยีสต์อาจยืดยาวมีผนังกันจนเห็นเป็นลักษณะคล้าย arthroconidia เรียกว่า arthroconidia-like ไม่นิยมทดสอบทางชีวเคมีเนื่องจากไม่มีความจำเพาะเพียงพอสำหรับการวินิจฉัย การทดสอบทางชีวเคมีพบว่า *P. marneffei* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส มอลโทส และเซลลูโลส สว่านเอนไซม์ยูรีเอสได้⁶⁸

การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาและการตรวจด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ปัจจุบันการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาและด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว แต่ส่วนใหญ่ยังจำกัดอยู่ในระดับการวิจัย ยังไม่มีการพัฒนาเป็นการตรวจชุดตรวจอย่างง่าย การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาอาศัยหลักการหลากหลายมีทั้งการตรวจหาแอนติบอดีและการตรวจหาแอนติเจน เช่น immunodiffusion^{69, 70} Indirect fluorescent⁷¹ Latex agglutination^{70, 72} Western blot⁷³⁻⁷⁵ ELISA^{72, 76-79} การพัฒนาการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาส่วนมากเน้นการตรวจหาแอนติเจนมากกว่าแอนติบอดี เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง จึงสร้างแอนติบอดีได้ไม่ดี

การตรวจด้วยเทคนิคทางโมเลกุลนิยมใช้หลักการ polymerase chain reaction (PCR) โดยมี เป้าหมายอยู่ที่บริเวณส่วนของยีนที่กำหนดการสร้าง rRNA 5.8S rRNA⁸⁰ และ 18S rRNA⁸¹⁻⁸³ และพัฒนาความสะดวกและความไวด้วยเทคนิค nested PCR⁸² และ one-tube seminested PCR⁸³ ได้อีกด้วย นอกจากนี้ มีการพัฒนาวิธีทางโมเลกุลอื่นๆ ที่อาศัยหลักการแตกต่างกันออกไป เช่น rolling circle amplification⁸⁴ multiplex ligation-dependent probe amplification⁸⁵ oligonucleotide array hybridization⁸⁶ และ TaqMan real-time PCR⁸⁷ การตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีววิทยานิยมใช้สำหรับการวิจัย เนื่องจากมีราคาแพง วิธีทางอณูชีววิทยามีความสำคัญในกรณีที่ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลลบ⁶³ หรือในกรณีที่แหล่งระบาดเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีความคุ้มค่าที่จะพัฒนาวิธีเหล่านี้ให้กับผู้ป่วยในจำนวนมากเพื่อให้ได้รับการวินิจฉัยได้รวดเร็วและให้การรักษาได้ทัน่วงที

การรักษา

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ในผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี หรือ ไม่ติดเชื้อเอชไอวีไม่แตกต่างกัน คือ ใช้ยาฉีด Amphotericin B deoxycholate 0.6 มก./กก./วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นให้ยากิน itraconazole ขนาด 400 มก./วัน เป็นเวลา 8-10 สัปดาห์^{15, 88} หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับยาครบถ้วนแล้วในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีจะได้รับยา itraconazole 200 มก./วัน เพิ่มขึ้นเพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อซ้ำอีก^{15, 89} ดังนั้น จึงมีข้อแนะนำในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีที่มีระดับเซลล์ CD4+ lymphocyte ต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อลบ.มม. ควรได้รับยา itraconazole เพื่อป้องกันการติดเชื้อ *P. marneffei*

สรุป

การติดเชื้อ *P. marneffei* ยังคงเป็นโรคฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องทั้งกลุ่มผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยอื่นๆ ที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวี จัดว่าเป็นปัญหาที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และภูมิภาคใกล้เคียง รวมทั้งประเทศไทย ข้อมูลการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเชื้อมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วทำให้เข้าใจพื้นฐานทางชีววิทยาของเชื้อมากขึ้น โดยเฉพาะการสร้างรูปร่าง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคยังมีข้อจำกัดเนื่องจากยังขาดรูปแบบการทดลองที่เหมาะสม นอกจากนี้ ยังมีความจำกัดด้านข้อมูลแหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อในธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของผู้ป่วยเนื่องจากการขาดวิธีการแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงควรศึกษารูปแบบการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคและการแยกเชื้อจากธรรมชาติ เช่น จากดิน เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.นงนุช วนิตย์ธนาคม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการเขียนบทความ และ ขอขอบคุณ อ.ดร.ชยพล ศรีพินนาม คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ช่วยให้ข้อคิดเห็นและตรวจทานต้นฉบับ

1. Vanittanakom N, Cooper CR, Jr., Fisher MC, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 95-110.
2. Deng Z, Ribas JL, Gibson DW, Connor DH. Infections caused by *Penicillium marneffei* in China and Southeast Asia: review of eighteen published cases and report of four more Chinese cases. Rev Infect Dis 1988; 10(3): 640-52.
3. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in southeast Asia. Lancet 1994; 344(8915): 110-3.
4. Hu Y, Zhang J, Li X, Yang Y, Zhang Y, Ma J, et al. *Penicillium marneffei* infection: an emerging disease in mainland China. Mycopathologia 2013; 175(1-2): 57-67.
5. Vanittanakom N, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Curr Top Med Mycol 1997; 8(1-2): 35-42.
6. Bulterys PL, Le T, Quang VM, Nelson KE, Lloyd-Smith JO. Environmental predictors and incubation period of AIDS-associated *Penicillium marneffei* infection in Ho Chi Minh City, Vietnam. Clin Infect Dis 2013; 56(9): 1273-9.
7. Boyce KJ, Andrianopoulos A. Morphogenetic circuitry regulating growth and development in the dimorphic pathogen *Penicillium marneffei*. Eukaryot Cell 2013; 12(2): 154-60.
8. Cooper CR, Vanittanakom N. Insights into the pathogenicity of *Penicillium marneffei*. Future Microbiol 2008; 3(1): 43-55.
9. Liu D, Wei L, Guo T, Tan W. Detection of DOPA-Melanin in the Dimorphic Fungal Pathogen *Penicillium marneffei* and Its Effect on Macrophage Phagocytosis In Vitro. PLoS One 2014; 9(3): e92610.
10. Lau SK, Tse H, Chan JS, Zhou AC, Curreem SO, Lau CC, et al. Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment. FEBS J 2013; 280(24): 6613-26.
11. Capponi M, Segretain G, Sureau P. [Penicilliosis from *Rhizomys sinensis*]. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1956; 49(3): 418-21.
12. Segretain G. [*Penicillium marneffei* n.sp., agent of a mycosis of the reticuloendothelial system]. Mycopathologia 1959; 11: 327-53.
13. Piehl MR, Kaplan RL, Haber MH. Disseminated penicilliosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med 1988; 112(12): 1262-4.
14. Wong SY, Wong KF. *Penicillium marneffei* Infection in AIDS. Patholog Res Int 2011: 764293.
15. Kawila R, Chaiwarith R, Supparatpinyo K. Clinical and laboratory characteristics of penicilliosis marneffei among patients with and without HIV infection in Northern Thailand: a retrospective study. BMC Infect Dis 2013; 13: 464.
16. Zhang JQ, Yang ML, Zhong XN, He ZY, Liu GN, Deng JM, et al. [A comparative analysis of the clinical and laboratory characteristics in disseminated penicilliosis marneffei in patients with and without human immunodeficiency virus infection]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 2008; 31(10): 740-6.
17. Samson RA, Yilmaz N, Houbroken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. Stud Mycol 2011; 70(1): 159-83.
18. Le T, Wolbers M, Chi NH, Quang VM, Chinh NT, Lan NP, et al. Epidemiology, seasonality, and predictors of outcome of AIDS-associated *Penicillium marneffei* infection in Ho Chi Minh City, Viet Nam. Clin Infect Dis 2011; 52(7): 945-52.
19. Cooper CR, Jr., McGinnis MR. Pathology of *Penicillium marneffei*. An emerging acquired immunodeficiency syndrome-related pathogen. Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8): 798-804.

20. Chariyalertsak S, Vanittanakom P, Nelson KE, Sirisanthana T, Vanittanakom N. *Rhizomys sumatrensis* and *Cannomys badius*, new natural animal hosts of *Penicillium marneffei*. J Med Vet Mycol 1996; 34(2): 105-10.
21. Ajello L, Padhye AA, Sukroongreung S, Nilakul CH, Tantimavanic S. Occurrence of *Penicillium marneffei* infections among wild bamboo rats in Thailand. Mycopathologia 1995; 131(1): 1-8.
22. Li JC, Pan LQ, Wu SX. Mycologic investigation on *Rhizomys pruinosus* senex in Guangxi as natural carrier with *Penicillium marneffei*. Chin Med J (Engl) 1989; 102(6): 477-85.
23. Deng ZL, Yun M, Ajello L. Human penicilliosis marneffei and its relation to the bamboo rat (*Rhizomys pruinosus*). J Med Vet Mycol 1986; 24(5): 383-9.
24. Wei XG, Ling YM, Li C, Zhang FS. Study of 179 bamboo rats carrying *Penicillium marneffei* (in chinese). China J Zoonoses 1987; 3: 34-5.
25. Li X, Yang Y, Zhang X, Zhou X, Lu S, Ma L, et al. Isolation of *Penicillium marneffei* from soil and wild rodents in Guangdong, SE China. Mycopathologia 2011; 172(6): 447-51.
26. Gugnani H, Fisher MC, Paliwal-Johsi A, Vanittanakom N, Singh I, Yadav PS. Role of *Cannomys badius* as a natural animal host of *Penicillium marneffei* in India. J Clin Microbiol 2004; 42(11): 5070-5.
27. Bhardwaj S, Shukla A, Mukherjee S, Sharma S, Guptasarma P, Chakraborti AK, et al. Putative structure and characteristics of a red water-soluble pigment secreted by *Penicillium marneffei*. Med Mycol 2007; 45(5): 419-27.
28. Andrianopoulos A. Control of morphogenesis in the human fungal pathogen *Penicillium marneffei*. Int J Med Microbiol 2002; 292(5-6): 331-47.
29. Cooper CR, Jr., Haycocks NG. *Penicillium marneffei*: an insurgent species among the penicillia. J Eukaryot Microbiol 2000; 47(1): 24-8.
30. Sriburee P. Factors affecting dimorphism of *Penicillium marneffei*. PhD [Dissertation]; Chiang Mai University, 1998.
31. Pongsunk S. Functional analysis of a *Penicillium marneffei* gene involved in the fungal development. PhD [Dissertation]; Mahidol University, 2004.
32. Zhang P, Xu B, Wang Y, Li Y, Qian Z, Tang S, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffei*. Mycol Res 2008; 112(Pt 8): 943-9.
33. Kummasook A, Cooper CR, Jr., Vanittanakom N. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation system for the functional genetic analysis of *Penicillium marneffei*. Med Mycol 2010; 48(8): 1066-74.
34. Kummasook A, Cooper CR, Jr., Sakamoto A, Terui Y, Kashiwagi K, Vanittanakom N. Spermidine is required for morphogenesis in the human pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. Fungal Genet Biol 2013; 58-59: 25-32.
35. Nguyen VQ, Sil A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(12): 4880-5.
36. Webster RH, Sil A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(38): 14573-8.
37. Liu H, Xi L, Zhang J, Li X, Liu X, Lu C, et al. Identifying differentially expressed genes in the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* by suppression subtractive hybridization. FEMS Microbiol Lett 2007; 270(1): 97-103.
38. Xi L, Xu X, Liu W, Li X, Liu Y, Li M, et al. Differentially expressed proteins of pathogenic *Penicillium marneffei* in yeast and mycelial phases. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 3): 298-304.
39. Chandler JM, Treece ER, Trenary HR, Brennenman JL, Flickner TJ, Frommelt JL, et al. Protein profiling of the dimorphic, pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. Proteome Sci 2008; 6: 17.
40. Lin X, Ran Y, Gou L, He F, Zhang R, Wang P, et al. Comprehensive transcription analysis of human pathogenic fungus *Penicillium marneffei* in mycelial and yeast cells. Med Mycol 2012; 50(8): 835-42.

41. Thirach S, Cooper CR, Jr., Vanittanakom N. Molecular analysis of the *Penicillium marneffei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene (gpdA) and differential expression of gpdA and the isocitrate lyase-encoding gene (acuD) upon internalization by murine macrophages. J Med Microbiol 2008; 57 (Pt 11): 1322-8.
42. Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. Infect Immun 2006; 74(1): 382-9.
43. Wada M, Nakamura Y. Type-II major-surface-glycoprotein family of *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol 1999; 46(5): 125S-6S.
44. Rappleye CA, Goldman WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. Annu Rev Microbiol 2006; 60: 281-303.
45. Borneman AR, Hynes MJ, Andrianopoulos A. The abaA homologue of *Penicillium marneffei* participates in two developmental programmes: conidiation and dimorphic growth. Mol Microbiol 2000; 38(5): 1034-47.
46. Boyce KJ, Schreider L, Andrianopoulos A. In vivo yeast cell morphogenesis is regulated by a p21-activated kinase in the human pathogen *Penicillium marneffei*. PLoS Pathog 2009; 5(11): e1000678.
47. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. J Exp Biol 1998; 201(Pt 8): 1203-9.
48. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. Clin Microbiol Rev 1997 Jan; 10(1): 1-18.
49. Thirach S, Cooper CR, Jr., Vanittanakom P, Vanittanakom N. The copper, zinc superoxide dismutase gene of *Penicillium marneffei*: cloning, characterization, and differential expression during phase transition and macrophage infection. Med Mycol 2007; 45(5): 409-17.
50. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 1988; 22: 631-77.
51. Kummasook A, Pongpom P, Vanittanakom N. Cloning, characterization and differential expression of an hsp 70 gene from the pathogenic dimorphic fungus, *Penicillium marneffei*. DNA Seq 2007; 18(5): 385-94.
52. Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature 2001; 412(6842): 83-6.
53. Lorenz MC, Fink GR. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. Eukaryot Cell 2002; 1(5): 657-62.
54. Sun J, Li X, Feng P, Zhang J, Xie Z, Song E, et al. RNAi-mediated silencing of fungal acuD gene attenuates the virulence of *Penicillium marneffei*. Med Mycol 2014; 52(2): 167-78.
55. Youngchim S, Vanittanakom N, Hamilton AJ. Analysis of the enzymatic activity of mycelial and yeast phases of *Penicillium marneffei*. Med Mycol 1999; 37(6): 445-50.
56. Reilly TJ, Baron GS, Nano FE, Kuhlenschmidt MS. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. J Biol Chem 1996; 271(18): 10973-83.
57. Baca OG, Roman MJ, Glew RH, Christner RF, Buhler JE, Aragon AS. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. Infect Immun 1993; 61(10): 4232-9.
58. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(3): 400-28.
59. Viglio S, Annovazzi L, Luisetti M, Stolk J, Casado B, Iadarola P. Progress in the methodological strategies for the detection in real samples of desmosine and isodesmosine, two biological markers of elastin degradation. J Sep Sci 2007; 30(2): 202-13.
60. Moon JL, Shaw LN, Mayo JA, Potempa J, Travis J. Isolation and properties of extracellular proteinases of *Penicillium marneffei*. Biol Chem 2006; 387(7): 985-93.
61. Taborda CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia 2008; 165(4-5): 331-9.

62. Youngchim S, Hay RJ, Hamilton AJ. Melanization of *Penicillium marneffe* in vitro and in vivo. Microbiology 2005; 151(Pt 1): 291-9.
63. Sripa C, Mitchai J, Thongsri W, Sripa B. Diagnostic cytology and morphometry of *Penicillium marneffe* in the sputum of a hypogammaglobulinemia with hyper-IgM patient. J Med Assoc Thai 2010; 93 Suppl 3: S69-72.
64. Mootsikapun P, Srikulbutr S. Histoplasmosis and penicilliosis: comparison of clinical features, laboratory findings and outcome. Int J Infect Dis 2006; 10(1): 66-71.
65. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthammachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. *Penicillium marneffe* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992; 14(4): 871-4.
66. Nelson KE KL, Cooper CR, Merz WG. *Penicillium marneffe*: An AIDS-related illness from Southeast Asia. Infect Med 1999; 16: 118-21, 28.
67. Chiewchanvit S, Mahanupab P, Hirunsri P, Vanittanakom N. Cutaneous manifestations of disseminated *Penicillium marneffe* mycosis in five HIV-infected patients. Mycoses 1991; 34(5-6): 245-9.
68. Wong SS, Ho TY, Ngan AH, Woo PC, Que TL, Yuen KY. Biotyping of *Penicillium marneffe* reveals concentration-dependent growth inhibition by galactose. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1416-21.
69. Viviani MA, Tortorano AM, Rizzardini G, Quirino T, Kaufman L, Padhye AA, et al. Treatment and serological studies of an Italian case of penicilliosis marneffe contracted in Thailand by a drug addict infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Epidemiol 1993; 9(1): 79-85.
70. Kaufman L, Standard PG, Jalbert M, Kantipong P, Limpakarnjanarat K, Mastro TD. Diagnostic antigenemia tests for penicilliosis marneffe. J Clin Microbiol 1996; 34(10): 2503-5.
71. Yuen KY, Wong SS, Tsang DN, Chau PY. Serodiagnosis of *Penicillium marneffe* infection. Lancet 1994 13; 344(8920): 444-5.
72. Desakorn V, Simpson AJ, Wuthiekanun V, Sahassananda D, Rajanuwong A, Pitisuttithum P, et al. Development and evaluation of rapid urinary antigen detection tests for diagnosis of penicilliosis marneffe. J Clin Microbiol 2002; 40(9): 3179-83.
73. Chongtrakool P, Chaiyaroj SC, Vithayasai V, Trawatcharegon S, Teanpaisan R, Kalnawakul S, et al. Immunoreactivity of a 38-kilodalton *Penicillium marneffe* antigen with human immunodeficiency virus-positive sera. J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2220-3.
74. Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sittisombut N, Supparatpinyo K, Kanjanasthiti P, Nelson KE, et al. Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicillium marneffe*. J Med Vet Mycol 1997; 35(2): 123-31.
75. Jeavons L, Hamilton AJ, Vanittanakom N, Ungpakorn R, Evans EG, Sirisanthana T, et al. Identification and purification of specific *Penicillium marneffe* antigens and their recognition by human immune sera. J Clin Microbiol 1998; 36(4): 949-54.
76. Desakorn V, Smith MD, Walsh AL, Simpson AJ, Sahassananda D, Rajanuwong A, et al. Diagnosis of *Penicillium marneffe* infection by quantitation of urinary antigen by using an enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1999; 37(1): 117-21.
77. Chaiyaroj SC, Chawengkirtikul R, Sirisinha S, Watkins P, Srinoulprasert Y. Antigen detection assay for identification of *Penicillium marneffe* infection. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 432-4.
78. Cao L, Chan KM, Chen D, Vanittanakom N, Lee C, Chan CM, et al. Detection of cell wall mannoprotein Mp1p in culture supernatants of *Penicillium marneffe* and in sera of penicilliosis patients. J Clin Microbiol 1999; 37(4): 981-6.
79. Cao L, Chen DL, Lee C, Chan CM, Chan KM, Vanittanakom N, et al. Detection of specific antibodies to an antigenic mannoprotein for diagnosis of *Penicillium marneffe* penicilliosis. J Clin Microbiol 1998; 36(10): 3028-31.
80. LoBuglio KF, Taylor JW. Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus *Penicillium marneffe*. J Clin Microbiol 1995; 33(1): 85-9.

81. Vanittanakom N, Merz WG, Sittisombut N, Khamwan C, Nelson KE, Sirisanthana T. Specific identification of *Penicillium marneffei* by a polymerase chain reaction/hybridization technique. *Med Mycol* 1998; 36(3): 169-75.
82. Vanittanakom N, Vanittanakom P, Hay RJ. Rapid identification of *Penicillium marneffei* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1739-42.
83. Prariyachatigul C, Chaiprasert A, Geenkajorn K, Kappe R, Chuchottaworn C, Termsetjaroen S, et al. Development and evaluation of a one-tube seminested PCR assay for the detection and identification of *Penicillium marneffei*. *Mycoses* 2003; 46(11-12): 447-54.
84. Sun J, Najafzadeh MJ, Zhang J, Vicente VA, Xi L, de Hoog GS. Molecular identification of *Penicillium marneffei* using rolling circle amplification. *Mycoses* 2011; 54(6): e751-9.
85. Zhang JM, Sun JF, Feng PY, Li XQ, Lu CM, Lu S, et al. Rapid identification and characterization of *Penicillium marneffei* using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in paraffin-embedded tissue samples. *J Microbiol Methods* 2011; 85(1): 33-9.
86. Hsiue HC, Huang YT, Kuo YL, Liao CH, Chang TC, Hsueh PR. Rapid identification of fungal pathogens in positive blood cultures using oligonucleotide array hybridization. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(5): 493-500.
87. Pornprasert S, Praparattanapan J, Khamwan C, Pawichai S, Pimsarn P, Samleerat T, et al. Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection and identification of *Penicillium marneffei*. *Mycoses* 2009; 52(6): 487-92.
88. Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Perriens J, Nelson KE. Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *Penicillium marneffei* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998; 26(5): 1107-10.
89. Supparatpinyo K, Perriens J, Nelson KE, Sirisanthana T. A controlled trial of itraconazole to prevent relapse of *Penicillium marneffei* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1998; 339(24): 1739-43.