

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาวิธีการ Gelatin Particle Agglutination Test เพื่อการตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อ *Penicillium marneffe* และการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น

กนกกาญจน์ แก้วพรม*, ยุทธนา หมนันตี*, ประสิทธิ์ ชนะรัตน์*, ศาคร พรประเสริฐ**

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Penicillium marneffe* เป็นเชื้อราสองรูปที่ทำให้เกิดโรค penicilliosis marneffe ได้ทั้งในคนและสัตว์ จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญและพบได้มากในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา *P. marneffe* ทำได้ยาก เพราะอาการทางคลินิกมีความคล้ายคลึงกับ pneumocytosis, histoplasmosis วัณโรค และโรคติดเชื้อรา ชนิดอื่นๆ การตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถกระทำโดยการย้อมสีสเมียร์สิ่งส่งตรวจ ซึ่งแม้จะให้ผลไว แต่การวินิจฉัยอาจผิดพลาดได้เพราะยีสต์เซลล์ของเชื้อราชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกับยีสต์เซลล์ของเชื้อ *Histoplasma capsulatum* และ *Cryptococcus neoformans* การวินิจฉัยที่เป็นมาตรฐานจึงใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจอย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยคือใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงจึงทำให้การรักษาอย่างถูกต้องมีความล่าช้า การศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธี gelatin particle agglutination เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อรา *P. marneffe* โดยนำซีรัมหนู BALB/c ที่ถูกด้วยฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและการแตกเชื้อรา *P. marneffe*, *C. albicans* และ *C. neoformans* และซีรัมของผู้ป่วย penicilliosis marneffe มาทำปฏิกิริยากับเม็ด gelatin ที่เคลือบด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffe* พบว่าซีรัมที่เตรียมได้จากหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนของเชื้อ *C. albicans* และ *C. neoformans* เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ใน titer ที่ต่ำกว่า 160 อย่างไรก็ตามซีรัมคนปกติเพียง 1 ใน 11 ราย (9.09%) และซีรัมผู้ติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ 5 รายใน 20 ราย (25%) ขณะที่ซีรัมผู้ป่วยเอดส์ที่เป็น penicilliosis marneffe 2 ใน 5 ราย (40%) ให้ผลบวกกับการทดสอบ ดังนั้นอาจนำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย penicilliosis marneffe ร่วมกับการย้อมสเมียร์สิ่งส่งตรวจได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2547; 37: 159-167.

คำรหัส: *Penicillium marneffe*, gelatin particle agglutination

* นักศึกษาปี 4 สาขาเทคนิคการแพทย์

** ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Development of Gelatin Particle Agglutination Test for *Penicillium marneffei* Antibody Detection and Preliminary Assay Validation**Kanokkan Kaewprom^{*}, Yuttana Munde^{**}, Prasit Chanarat^{**}, Sakorn Pornprasert^{**}**

Penicillium marneffei is a dimorphic fungi causing penicilliosis in both human and animal. It is an important opportunistic fungal pathogen in HIV infected patients. The diagnosis of penicilliosis marneffei could be difficult because the clinical manifestation mimics those of pneumocytosis, histoplasmosis, and other mycotic infection. Although the staining of specimen is a rapid diagnostic method, the tissue form of *P. marneffei* can be confused with those of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. The culture of *P. marneffei* from a specimen is the standard diagnostic method. However, the major disadvantage of this method is that it requires long time culture and delays the initiation of the appropriate treatment, the disease is associated with a high mortality rate, both in normal and immunocompromised host. The study aimed to develop a gelatin particle agglutination test for the rapid diagnosis anti-*P. marneffei* antibody in penicilliosis patient's serum. The BALB/c mice were injected by secreted and sonicated form of *P. marneffei*, *C. albicans*, and *C. neoformans* antigens. Antibody against *P. marneffei*, *C. albicans* and *C. neoformans* antigens were detected by gelatin that was coated with the secreted form of *P. marneffei* antigens and it was used to detect antibody of *P. marneffei* in patient's serum. The result demonstrated that antibodies against these fungal antigens could cross-react each other in titer less than 160. One of 11 normal healthy sera (9.09%), 5 of 20 (25%) of asymptomatic HIV infected patients and 2 of 5 (40%) AIDS patients with penicilliosis marneffei were positive to the gelatin particle coated with secreted form of *P. marneffei* antigens. Thus, this gelatin particle maybe used to diagnose penicilliosis marneffei together with the smear staining. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2004; 37: 159-167.

Key words : *Penicillium marneffei*, gelatin particle agglutination

^{*} Fourth year student in Medical Technology Program,

^{**} Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 50200

บทนำ

Penicilliosis marneffei เป็นโรคที่พบในเขตประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนใต้ของประเทศจีน เป็นโรคติดเชื้อราที่เกิดขึ้นได้กับหลายอวัยวะของร่างกาย เช่น ต่อม้ำเหลือง ไชกระดูก ตับ ปอด กระดูก และผิวหนัง เป็นต้น โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีความบกพร่องทางด้านภูมิคุ้มกันของร่างกาย¹⁻⁵ อย่างไรก็ตามอาจพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้ได้ในคนที่มีร่างกายแข็งแรงปกติ⁶ เชื้อก่อโรคคือ *Penicillium marneffei* ซึ่งจัดเป็นราสองรูป (dimorphic fungus) เพียงชนิดเดียวในจำนวน *penicillium* หลายร้อย species ก่อนการแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวีในประเทศไทย ปี ค. ศ. 1984 พนิดา ชัยเนตร รายงานพบผู้ติดเชื้อรา *P. marneffei* ครั้งแรกจำนวน 5 ราย ที่โรงพยาบาลรามารับิด⁷ และในปีเดียวกันพบผู้ป่วยเพิ่มอีก 2 ราย⁸ ภายหลังมีการระบาดของเชื้อเอชไอวี อัตราการติดเชื้อราชนิดนี้ในผู้ป่วยเอดส์สูงขึ้น โดยในปี ค. ศ. 1994 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 550 ราย⁹ และจนกระทั่งถึงปี ค. ศ. 1995 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว โดยคิดเป็นจำนวนทั้งหมด 1,300 ราย¹⁰ จะเห็นได้ว่าในประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคเหนือการติดเชื้อราฉวยโอกาสชนิด *P. marneffei* ในผู้ป่วยเอดส์พบได้มากเป็นอันดับสี่รองจาก วัณโรค Cryptococcal meningitis และ Pneumocystic carinii pneumonia⁶ ขณะที่ผู้ป่วยมีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับยืนยันการติดเชื้อราชนิดนี้ยังต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจซึ่งวิธีนี้มีข้อด้อยคือต้องอาศัยเวลานานทำให้ไม่ทันต่อการรักษา^{11,12} นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธีย้อมสีย้อมสีจากสิ่งส่งตรวจแม้จะให้ผลไวแต่หากผู้ทำการตรวจไม่มีความชำนาญอาจเกิด

ความผิดพลาดได้ทั้งนี้เพราะลักษณะยีสต์เซลล์ของเชื้อ *P. marneffei* มีความคล้ายคลึงกับยีสต์เซลล์ของเชื้อ *Histoplasma capsulatum* หรือ *Cryptococcus neoformans*¹³ จึงได้ทำการพัฒนาวิธีตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาขึ้นมาโดยอาศัยเทคนิค gelatin particle agglutination เม็ด gelatin จะถูกเคลือบด้วย antigens ของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำเม็ด gelatin นี้ไปทำการตรวจหา antibody ในซีรัมของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* พบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยให้ผลบวกกับการทดสอบ ดังนั้นจึงอาจนำเทคนิคการตรวจด้วยวิธี gelatin particle agglutination ไปตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย Penicilliosis marneffei ร่วมกับการย้อมสีย้อมสีส่งตรวจ

วัสดุและวิธีการทดลอง

การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อรา

เชื้อ *P. marneffei*, *C. albicans* และ *C. neoformans* ที่เจริญบน Brian heart infusion (BHI) agar slant ในรูปยีสต์ จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงใน BHI broth (50 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 7 วัน โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นปั่นแยกเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ และตัวเชื้อที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที แล้วจึงตกตะกอนโปรตีนแอนติเจนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* ด้วย 70% ammoniumsulfate ส่วนโปรตีนแอนติเจนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* และ *C. neoformans* จะถูกตกตะกอนด้วย saturated ammoniumsulfate ขณะที่โปรตีนแอนติเจนที่อยู่ในตัวเชื้อจะถูกเก็บโดยการแตกเชื้อด้วยเครื่อง Ultrasonicator 120 โวลต์ 200-300 วัตต์ บน ice-bath ความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธีจะถูกวัดโดยวิธี Lowry's method

การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ฉีดโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และการแตกเชื้อราแต่ละชนิดทางช่องท้อง (Intra-peritoneum; IP) ของหนู BALB/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่ 28 µg/100 µl โดยทำการฉีดกระตุ้นทั้งหมดจำนวน 5 ครั้งและก่อนการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะเก็บซีรัม เรียกว่า preimmunized serum ส่วนซีรัมที่เก็บได้จากการฉีดกระตุ้นในครั้งที่ 5 จะนำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเม็ด gelatin ที่เคลือบด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei*

ซีรัมที่ใช้ในการศึกษา

ซีรัมที่ใช้ทดสอบทั้งหมดจำนวน 36 ราย แบ่งเป็นซีรัมคนปกติ 11 ราย (ชาย 6 ราย หญิง 5 ราย) อายุเฉลี่ย 24.48 ปี (ระหว่าง 20-37 ปี) ซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ 20 ราย (ชาย 10 ราย หญิง 10 ราย) อายุเฉลี่ย 31.15 ปี (ระหว่าง 26-37 ปี) ซีรัมผู้ป่วยเอดส์ ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* จำนวน 5 ราย (ชาย 3 ราย หญิง 2 ราย) อายุเฉลี่ย 30.30 ปี (ระหว่าง 20-43 ปี) โดยซีรัมคนปกติได้จากผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยและทุกรายมีสุขภาพ ดีขณะเจาะเก็บซีรัม สำหรับผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ทุกรายได้รับการตรวจการติดเชื้อ เอชไอวี โดยวิธี ELISA (Vironostika HIV MIXT, Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland) และวิธี Gelatin Particle agglutination (Serodia-HIV, Fujirebio Inc, Tokyo) และการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffei* จะทำโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือดและไขกระดูก พร้อมทั้งตรวจหา yeast cells ของเชื้อราชนิดนี้โดยการย้อมไขกระดูกและชิ้นเนื้อจากรอยโรคด้วยสี Wright หรือ Grocott-Gomori meth-

enamine-silver nitrate (GGMS) หรือ Periodic acid Schiff (PAS) ซีรัมทั้งหมดจะถูกเก็บที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

การเคลือบโปรตีนแอนติเจนของเชื้อราบนเม็ด gelatin

ก่อนเคลือบโปรตีนแอนติเจน จะทำการ treat เม็ด gelatin ปริมาณ 0.04 กรัมด้วย 25% glutaric dialdehyde ใน NSS pH 8.0 พร้อมทั้งปั่นที่ 4 °C นาน 25 ชั่วโมง แล้วปั่นล้างด้วย NSS ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงเคลือบผิว gelatin ด้วยโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* ความเข้มข้น 560 mg/ml ในสภาวะที่มี 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมงโดยเขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากปั่นล้างด้วย NSS 3 ครั้ง ความเร็ว 3,000 rpm 10 นาที เม็ด gelatin ซึ่งถูกเคลือบด้วยโปรตีนแอนติเจน จะนำมาละลายใน 3.5 ml PBS ที่มี 0.1% NaN₃ และ 0.1% BSA และเก็บที่ 4 °C ตลอดการใช้งาน

การตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี gelatin particle agglutination

ทำการ dilute serum แบบ two fold dilution โดยเริ่มตั้งแต่ 1:20 เป็นต้นไป สำหรับ negative และ positive control serum (ซีรัมกระต่ายก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* ตามลำดับ) ทดสอบที่ dilution 1:20 ขั้นตอนการทดสอบกระทำโดยเติม 25 µl ของซีรัมที่ dilute แล้วลงใน microplate "U" shape และเติม 25 µl ของเม็ด gelatin ที่ไม่ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนลงในหลุม unsensitize และเติม 25 µl ของเม็ด gelatin ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนลงในหลุม test,

positive และ negative control serum เขย่า plate และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง จึงอ่านผล ปฏิกริยาโดยอาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้ “-” หมายถึง เม็ด gelatin ตกอยู่ที่ก้นหลุมเป็น เม็ดกระดุมหรือเป็นวงแหวนขนาดเล็กขอบเรียบไม่เกิด ปฏิกริยา เกาะกลุ่ม (agglutination) ขณะที่ “+” หมายถึง เกิดปฏิกริยาเกาะกลุ่ม แผ่นเล็กน้อย (ประมาณ 2 ใน 3 ของก้นหลุม) และ “++” หมายถึงเกิดปฏิกริยา เกาะกลุ่ม แผ่นเต็มก้นหลุม

ผลการศึกษา

จากการทดสอบปฏิกริยาข้ามกลุ่มของแอนติบอดี ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนูจำนวน 5 ครั้งด้วย แอนติเจนของเชื้อ *C. albicans* และ *C. neoformans* ต่อเม็ด gelatin ที่เคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* พบว่าแอนติบอดีของหนูดังกล่าวเกิด ปฏิกริยาข้ามกลุ่มได้กับแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อใน titer

ที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 80 ขณะที่แอนติบอดีที่เตรียม ได้จากหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้ จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และจากการแตกเชื้อ *P. marneffei* ให้ผลบวกกับการทดสอบได้ถึง titer ที่ 160 และ 1,280 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และเมื่อนำเม็ด gelatin ดังกล่าวไปทดสอบกับซีรัมคนปกติจำนวน 11 ราย และ ซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดง อาการ จำนวน 20 ราย พบว่า 1 ราย (9.09 %) ของซีรัมคนปกติให้ปฏิกริยาที่อ่อน (+) กับการ ทดสอบใน titer ที่ 20 (ตารางที่ 2) ขณะที่ซีรัม ผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ 1 ราย (5 %) ให้ปฏิกริยาที่อ่อน (+) กับการทดสอบใน titer ที่ 20 และ 4 ราย (20 %) ให้ปฏิกริยาที่แรง (++) กับการทดสอบใน titer ที่ 40 (ตารางที่ 3) และเมื่อทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* พบว่า 2 ใน 5 ราย (40%) ให้ปฏิกริยา ที่แรง (++) กับการทดสอบใน titer ที่ 40 (ตาราง ที่ 4)

ตารางที่ 1 ปฏิกริยาของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนูจำนวน 5 ครั้งด้วยแอนติเจนของเชื้อ *C. albicans*, *C. neoformans* และ *P. marneffei* ต่อแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* ซึ่งเคลือบบนผิว gelatin bead (วิธี gelatin agglutination test)

แอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้น	Titer for unsensitized gelatin bead	Titer for sensitized gelatin bead							
	20	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560
น้ำเลี้ยงเชื้อ <i>P. marneffei</i>	-	++	++	++	+	-	-	-	-
แตกเชื้อ <i>P. marneffei</i>	-	++	++	++	++	++	++	+	-
น้ำเลี้ยงเชื้อ <i>C. albicans</i>	-	+	+	-	-	-	ND	ND	ND
แตกเชื้อ <i>C. albicans</i>	-	++	+	-	-	-	ND	ND	ND
น้ำเลี้ยงเชื้อ <i>C. neoformans</i>	-	+	-	-	-	-	ND	ND	ND
แตกเชื้อ <i>C. neoformans</i>	-	++	++	+	-	-	ND	ND	ND

ND = Not done

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ *P. marneffei* ในซีรัมคนปกติด้วยวิธี gelatin agglutination test

Sample No.	Titer for unsensitized gelatin bead	Titer for sensitized gelatin bead	
		20	40
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	+	-

- หมายถึง เม็ด gelatin ตกอยู่ที่ก้นหลอดเป็นเม็ดกระจุก ไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม

+ หมายถึง เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม แผลเล็กน้อย ประมาณ 2 ใน 3 ของก้นหลอด

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ *P. marneffei* ในซีรัมผู้ติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการด้วยวิธี gelatin agglutination test

Sample No.	Titer for unsensitized gelatin bead	Titer for sensitized gelatin bead	
		20	40
1	-	-	-
2	-	++	++
3	-	+	-
4	-	-	-
5	-	++	++
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	++	++
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	++	++
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-

- หมายถึง เม็ด gelatin ตกอยู่ที่ก้นหลอดเป็นเม็ดกระจุก ไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม

++ หมายถึง เม็ด gelatin เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม แผลเต็มก้นหลอด

ตารางที่ 4 ทดสอบหาแอนติบอดีต่อ *P. marneffei* ในซีรัมผู้ป่วยเอดส์ที่ป่วยด้วยโรค penicilliosis marneffei ด้วยวิธี gelatin agglutination test

Sample No.	Titer for unsensitized gelatin bead	Titer for sensitized gelatin bead	
		20	40
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	++	++
5	-	++	++

- หมายถึง เม็ด gelatin ตกอยู่ที่ก้นหลอดเป็นเม็ดกระตุ่ม ไม่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม

++ หมายถึง เม็ด gelatin เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม แผ่นเต็มก้นหลอด

วิจารณ์

จากการทดสอบโดยวิธี gelatin particle agglutination พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *C. albicans* และ *C. neoformans* สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) ได้กับแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Estrada และคณะ¹⁴ ที่พบว่าผนังเซลล์ของเชื้อราทุกชนิดประกอบด้วย polysaccharide เป็นส่วนใหญ่และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันมักมีส่วนประกอบบางอย่างคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะการศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมแอนติเจนจากราที่เพาะเลี้ยงในรูปยีสต์ทั้งหมด นอกจากนี้ เชื้อรา *C. neoformans* ยังจัดให้เป็นราสองรูปเช่นเดียวกับเชื้อ *P. marneffei* ดังนั้นจึงเป็นไปได้มากที่โปรตีนแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นหนูจะมี antigenic determinant บางส่วนคล้ายคลึงกัน และจากที่พบว่าซีรัมคนปกติและซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการบางรายให้ผลบวกกับการทดสอบทำให้สันนิษฐานได้ว่าคนปกติหรือผู้ติดเชื้อเอชไอวีเหล่านี้เคยสัมผัสกับเชื้อรา *P. marneffei* มาก่อน และร่างกายมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งทาง CMI และ HMI ดังนั้นจึงไม่แสดงอาการของโรคส่วนในผู้ป่วยเอดส์ที่แสดงอาการของโรค penicil-

liosis marneffei เป็นเพราะระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวถูกทำลายด้วยเชื้อหรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อเอชไอวี ดังนั้นเมื่อร่างกายสัมผัสกับเชื้อราชนิดนี้อีกครั้งจึงแสดงอาการของโรคขึ้นมาได้ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยได้ทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ในกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 103 ราย โดยวิธี Indirect ELISA พบว่า 41 ราย (39.81%) และ 73 ราย (70.88%) ให้ผลบวกการทดสอบที่ใช้โปรตีนที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อและที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* มาเป็นแอนติเจน ตามลำดับ¹⁵ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Vanittanakom และคณะโดยใช้แอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* ในรูปยีสต์มาทดสอบหาแอนติบอดีในผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นโรค penicilliosis marneffei โดยวิธี immunoblot assay พบว่า 45 % ของซีรัมผู้ป่วยเหล่านี้มีแอนติบอดีชนิด IgG ที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับโปรตีนแอนติเจนทั้งขนาด 54 และ 50 กิโลดัลตัน อย่างไรก็ตามซีรัมของคนปกติและของผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ป่วยด้วยโรค penicilliosis marneffei บางรายสามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับโปรตีนแอนติเจนทั้งสองขนาดนี้ได้¹⁶ การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้โปรตีนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อมา

ใช้เป็นแอนติเจนที่เคลือบเม็ด gelatin ทั้งนี้เพราะโปรตีนที่เตรียมได้น่าจะมีความจำเพาะมากกว่าโปรตีนที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ ซึ่งจะมีแอนติเจนตรงส่วนผนังเซลล์ที่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อราชนิดอื่นปนอยู่เป็นจำนวนมาก จากการทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นโรค penicilliosis marneffeii จำนวนเพียง 5 รายทำให้ข้อมูลที่ได้ไม่สามารถสรุปได้โดยชัดเจน นอกจากนี้โอกาสที่ผู้ป่วยดังกล่าวจะสร้าง แอนติบอดีต่อเชื้อ *P. marneffeii* ใน titer ที่สูงย่อม น้อยมาก ทั้งนี้เพราะระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่ถูกทำลายด้วยตัวเชื้อหรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อเอชไอวี ดังนั้นการศึกษาต่อไปจะได้ทำการทดสอบวิธีดังกล่าว กับจำนวนซีรัมผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffeii* ในจำนวนที่มากขึ้นพร้อมทั้งทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยเอดส์ ที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อฉวยโอกาสชนิดอื่น และซีรัม ผู้ป่วย penicilliosis marneffeii ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้พอที่จะสรุปได้ว่า อาจนำวิธี gelatin particle agglutination นี้ไปใช้ควบคู่กับการตรวจย้อม สเมียร์สิ่งส่งตรวจเพื่อการ วินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffe* ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง ELISA reader และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุญาตให้ใช้เครื่อง Ultrasonicator และขอขอบคุณ อาจารย์ จันทนา คำวรรณ หัวหน้าห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา งานปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ให้เชื้อรา *P. marneffeii*, *C. albicans* และ *C. neoformans*

เอกสารอ้างอิง

1. Li PC, Tsui MC, Ma KF. *Penicillium marneffeii*: indicator disease for AIDS in South East Asia. AIDS 1992; 6: 240-1.
2. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthammachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. *Penicillium marneffeii* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992; 14: 871-74.
3. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffeii* infection in southeast Asia. Lancet 1994; 344: 110-13.
4. Borradori L, Schmit JC, Stetzkowski M, Dussoix P, Saurat JH, Filthuth I. *Penicilliosis marneffeii* infection in AIDS. J Am Acad Dermatol 1994; 31: 843-46.
5. Deng Z, Ribas JL, Gibson DW, Connor DH. Infections caused by *Penicillium marneffeii* in China and Southeast Asia: review of eighteen published cases and report of four more Chinese cases. Rev Infect Dis 1988; 10: 640-52.
6. Drouhet E. Penicilliosis due to *Penicillium marneffeii*: a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia. J Mycol Med 1993; 4: 195-224.
7. Jayanetra P, Nitiyanant P, Ajello L, Padhye AA, Lolekha S, Atichartakarn V, et al. Penicilliosis marneffeii in Thailand: report of five human cases. Am J Trop Med Hyg 1984; 33: 637-44.

8. Tanphichitra D, Srimuang S. Cellular immunity (T-cell subset using monoclonal antibody) in tuberculosis, melioidosis, pasteurellosis, penicilliosis, and role of levamisole and isoprinosine (Intern. Symposium on monoclonal antibodies: standardization of their characterization and use. Paris, France, 1983). *Develop Biol Standard* 1984; 57: 117-23.
9. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Nelson KE. Seasonal variation of disseminated *Penicillium marneffe*i infections in Northern Thailand. *Clin Infect Dis* 1996; 173: 1490-93.
10. Phillips P. *Penicillium marneffe*i part of Southeast Asian AIDS. *JAMA* 1996; 276: 86-7.
11. Duong TA. Infection due to *Penicillium marneffe*i, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 125-30.
12. Imwidthaya P. Update of *Penicilliosis marneffe*i in Thailand. Review article. *Mycopathologia* 1994; 127: 135-37.
13. Trewatcharegon S, Chaiyaroj SC, Chongtrakool P, Sirisinha S. Production and characterization of monoclonal antibodies reactive with the mycelial and yeast phases of *Penicillium marneffe*i. *Med Mycol* 2000; 38: 91-6.
14. Estrada JA, Stylen D, Van Cussem J, Pierard Franchimont C, Pierard GE. Immunohistochemical identification of *Penicillium marneffe*i by monoclonal antibody. *Intern J Dermatol* 1992; 31: 410-12.
15. Sariya L, Klinhom R, Chaiwong T, Pornprasert S. Detection of antibodies against *Penicillium marneffe*i antigens in Chiang Mai healthy population. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2000; 33: 172-81.
16. Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sittisombut N, Supparatpinyo K, Kanjanasthiti P, Nelson KE, *et al.* Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicillium marneffe*i. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 123-31.