

นิพนธ์ต้นฉบับ

การทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ์ ของกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่

ลดาวลย์ สาริยา*, รสสุคนธ์ กลิ่นหอม*, ธาวิณี ไชยวงศ์*, ศาคร พรประเสริฐ**

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ์ ในซีรัมคนปกติที่อาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ โดยเปรียบเทียบกับซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นโรคเพนนิซิลิโอซิส มาเนฟฟิไอ์

วิธีการ : ใช้เทคนิค Indirect ELISA ตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อราเพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ์ ทั้งในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ และรูปที่เชื้อปล่อยออกมา โดยนำซีรัมคนปกติ 103 ราย และซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นโรคเพนนิซิลิโอซิส มาเนฟฟิไอ์ 9 ราย มาเจือจางด้วย 0.05% PBS-Tween ในอัตราส่วน 1:1,000 ก่อนทำปฏิกิริยากับแอนติเจนทั้งสองรูปที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ผลการศึกษา : จากซีรัมคนปกติทั้งหมด 103 รายพบว่า 41 ราย (39.81%) มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าค่า cut-off ($A > 0.60$) ขณะที่ 73 ราย (70.88%) มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา และจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 9 ราย พบว่า 3 ราย (33.33%) และ 5 ราย (55.55%) มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ์ ทั้งในรูปที่ได้จากการแตกเชื้อและรูปที่เชื้อปล่อยออกมา ตามลำดับ

สรุป : ในกลุ่มประชากรคนปกติที่อาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่มีจำนวนคนที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ์ ทั้งในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ และรูปที่เชื้อปล่อยออกมา ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันกับจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวี และเป็นเพนนิซิลิโอซิส มาเนฟฟิไอ์ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543:

33: 172-81.

คำรหัส : เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ์, เพนนิซิลิโอซิส

* นักศึกษาชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2543-2544.

** ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Detection of Antibodies Against *Penicillium marneffe* Antigens in Chiang Mai Healthy Population

Sariya L*, Klinhom R*, Chaiwong T*, Pornprasert S**

Abstract

Object : To determine the antibodies against *P. marneffe* antigens in serum of Chiang Mai healthy population compared to HIV positive patients with penicilliosis marneffe.

Method : Antibodies to secreted and sonicated form of *P. marneffe* antigens were determined by indirect ELISA technique. 103 Normal healthy sera and 9 HIV-positive patients with penicilliosis marneffe sera that diluted into 1:1,000 with 0.05% PBS Tween were incubated with both forms of each 0.25 µg/mL antigens. Then absorbance of the reaction was measured by spectrophotometer at wavelength of 490 nm.

Results : The results demonstrated that 41 of 103 normal healthy sera (39.81%) were positive to sonicated form of *P. marneffe* antigen ($A > 0.60$) and 73 of 103 (70.88%) were positive to the secreted form. Three (33.33%) and five (55.55%) of HIV positive patients with penicilliosis marneffe were positive to sonicated and secreted form of this fungi antigen, respectively.

Conclusion : The number of normal individuals having positive antibodies to both form of *P. marneffe* antigens in Chiang Mai population was not different from the HIV positive patients with penicilliosis marneffe. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2000; 33: 172-81.

Key words : *Penicillium marneffe* , Penicilliosis

* 4th Year Students, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University (2000-2001).

** Department of Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

การทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา
เพนนิซิลเลียม มานอฟฟิไอ ของกลุ่มประชากรคน
ปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่

เชื้อรา *Penicillium marneffe* เป็นเชื้อราที่มี
รูปร่าง 2 แบบ (Dimorphic fungus) ที่ก่อโรค Peni-
cilliosis ได้ทั้งในคนและสัตว์ พบเชื้อครั้งแรก เมื่อปี
ค.ศ. 1956 โดยแยกเชื้อได้จากตับของอ้น (Bamboo

rat: *Rhizomys sinensis*) ที่จับได้จากประเทศ
เวียดนาม¹ มีรายงานการติดเชื้อจากธรรมชาติเป็น
ครั้งแรกในคนอเมริกัน ซึ่งป่วยเป็นโรค Hodgkin's
disease และผู้ป่วยรายนี้เคยเดินทางมาแถบ
เอเชียตะวันออกเฉียงใต้² หลังจากนั้นมีการ
รายงานการติดเชื้อเพิ่มขึ้นโดยในปีค.ศ. 1984 พบชาว
อเมริกันติดเชื้อรา *P. marneffe* อีก 1 ราย³

ระหว่างปี ค.ศ. 1964 - 1983 พบผู้ติดเชื้อที่อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีนจำนวน 8 ราย⁴ และ ค.ศ.1985 ที่ฮ่องกงพบผู้ติดเชื้อจำนวน 6 ราย⁵ และนับตั้งแต่ปีค.ศ. 1984 เป็นต้นมา ภายหลังที่มีการระบาดของเชื้อเอชไอวี (HIV, Human Immunodeficiency Virus) มีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น penicilliosis marneffeii เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางภาคใต้ของจีน ซึ่งเชื่อว่าเป็นแหล่งที่มีการระบาด (Endemic area) ของเชื้อราชนิดนี้ สำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะในเขตภาคเหนือ พบว่าก่อนมีการแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวี พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. marneffeii* จำนวน 5 รายที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่⁶ และภายหลังจากมีการระบาดของเชื้อ เอชไอวี พบว่าจำนวนผู้ป่วย Penicilliosis marneffeii เพิ่มขึ้น โดยในช่วงเดือนมิถุนายน ค.ศ.1990 ถึงสิงหาคม ค.ศ.1991 ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่พบผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffeii จำนวน 35 ราย⁷ เดือน มิถุนายน ค.ศ.1992 เพิ่มขึ้นเป็น 86 ราย⁸ เมื่อถึงปี ค.ศ. 1994 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 550 ราย⁹ และจนกระทั่งถึงปี ค.ศ. 1995 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัวกว่า โดยคิดเป็นจำนวนทั้งหมด 1,300 ราย¹⁰ จะเห็นได้ว่าในประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคเหนือการติดเชื้อรา *P. marneffeii* กำลังมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV การติดเชื้อฉวยโอกาสชนิด *P. marneffeii* จะพบได้มากเป็นอันดับสี่รองจากวัณโรค, Cryptococcal meningitis และ Pneumocystic carinii pneumonia¹¹ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วย penicilliosis marneffeii ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในเมืองและไม่เคยสัมผัสหรือบริโภคเนื้ออันมาก่อน ดังนั้นจึงมีการสันนิษฐานว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อ *P. marneffeii* โดยผ่านการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อที่มีอยู่ใน

อากาศเข้าไป ขณะเดียวกันคนปกติทั่วไปอาจเคยได้รับเชื้อราชนิดนี้ผ่านการหายใจเช่นกัน แต่ไม่แสดงอาการเพราะร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อทั้งทาง CMI และ HMI ส่วนในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกทำลายด้วยตัวเชื้อและผลิตภัณฑ์ของตัวเชื้อ HIV โดยเฉพาะการทำลาย T-cell และ B-cell ที่จดจำแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffeii* ดังนั้นจึงแสดงอาการของโรคได้¹²

การศึกษาวิธี Indirect ELISA technique ตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของ *P. marneffeii* ทั้งในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อและรูปที่เชื้อปล่อยออกมา โดยเปรียบเทียบระหว่างคนปกติกับผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffeii ซึ่งผลการทดลองจะช่วยให้มีความเข้าใจกลไกของร่างกายในการป้องกันการติดเชื้อราชนิดนี้ ตลอดจนช่วยให้มีการคิดค้นหาวิธีตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffeii* ที่รวดเร็วและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมซีรัม

1.1 ซีรัมคนปกติ

คนปกติที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 103 ราย โดยทุกรายอาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 ปีนับจากวันที่เจาะเก็บซีรัม นอกจากนี้ซีรัมทุกรายต้องให้ผลลบกับการตรวจหา Anti-HIV antibody ซึ่งตรวจด้วยวิธี ELISA (Vironostika HIV MIXT, Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland) และ Particle-agglutination test (Serodia-HIV, Fujirebio Inc, Tokyo) เก็บซีรัมรายละเอียด 1.5 มล. และรักษาไว้ที่ -20 °ซ จนกว่าจะทำการทดสอบ

1.2 ซีรัมผู้ป่วย

ซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น penicilliosis marneffeii จำนวน 9 ราย โดย 5 ราย

ได้รับจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ 4 รายได้รับจากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ผู้ป่วยทุกรายได้รับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV ด้วยวิธี ELISA (Vironostika HIV MIXT) และ particle-agglutination test (Serodia-HIV) และได้ตรวจการติดเชื้อ *P. marneffei* โดยการย้อมสเมียร์เลือด หรือน้ำไขสันหลัง ด้วยสี Wright-Giemsa stain ควบคู่กับการเพาะเลี้ยงหา Mycelium- และ Yeast-form ของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

2. การเตรียมแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei*

2.1 แอนติเจนในรูปที่ได้จากการแตกเชื้อ

(Sonicated form)

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H ซึ่งแยกได้จากเลือดผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ใน Brain Heart Infusion (BHI) agar slant ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 วันจนกระทั่งเชื้อในรูป Mycelium form เปลี่ยนเป็นรูป Yeast form เติมน้ำ Steriled 0.85% NaCl (Normal saline solution, NSS) 5 มล. ลงไปในแต่ละหลอดที่ใช้เพาะเชื้อ จากนั้นใช้ Loop ขูดเชื้อเบาๆ จนหลุดจากผิวหน้า Slant นำ Yeast cell suspension ที่ได้ไป Inoculate ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. ที่มี BHI broth บรรจุอยู่ 50 มล. แล้ว Incubate ใน Water bath shaker ที่ 37 °C โดยเขย่าตลอดเวลาด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 3 วัน แยกเก็บตัวเชื้อ (Yeast cell) และ Culture supernatant โดยนำไปปั่นที่ 1,500 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นล้างตัวเชื้อ ด้วย Steriled NSS 10 มล. ที่ความเร็ว 1500 g นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง ครั้งสุดท้าย ดูด NSS ที่ให้หมด แล้ว Resuspend yeast cell ด้วย Steriled NSS 5 มล. พร้อมทั้งนำไปแตกเชื้อด้วยเครื่อง Ultrasonicator 200 วัตต์ นาน 30 วินาที โดยทำซ้ำกัน 6 ครั้ง บน Ice-bath แล้วนำไปปั่นที่

1,500 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วน Supernatant มาเจือจางด้วย Steriled NSS ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นจึงนำไป Dialyse ด้วย NSS 1 ลิตร ที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน NSS ทุกๆ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ Supernatant มาวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method¹²

2.2 การเตรียม Antigen ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา (Secreted form)

นำ Culture supernatant ที่แยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นตกตะกอนโปรตีนใน Filtrated culture supernatant ด้วย 70% Ammonium sulfate¹³ พร้อมทั้งปั่นเก็บตะกอน โปรตีนที่ความเร็ว 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่เตรียมได้ด้วย steriled NSS 10 มล. นำไป Dialyse และวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method

3. การตรวจหา Anti -*P. marneffei* antibodies โดยวิธี Indirect ELISA technique

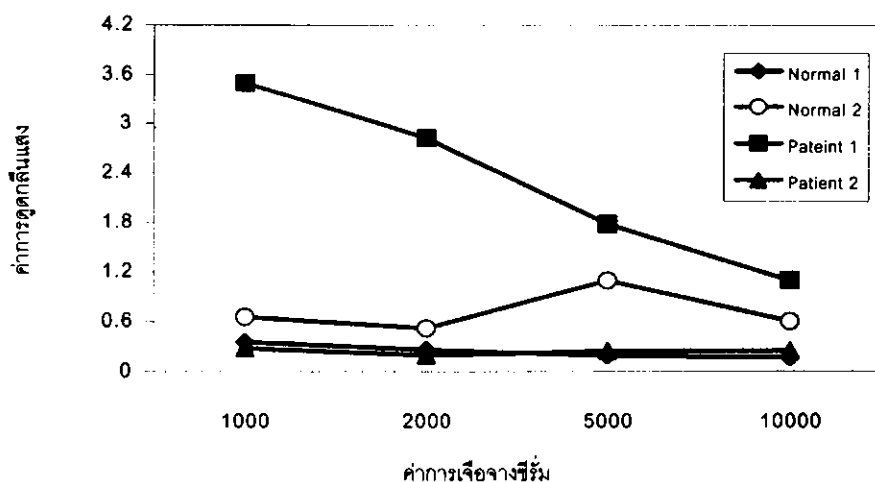
เติม 100 μ L ของซีรัมคนปกติหรือของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น Penicilliosis marneffei ที่ถูกเจือจางด้วย 0.05% PBS-Tween ในอัตราส่วน 1:1000 (ได้จากการทำ Titration curve) ลงใน 96-Well flat-bottomed microplate (Costar®, USA) ที่เคลือบด้วย 0.25 μ g/mL Antigen ของเชื้อ *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated หรือ Secreted form จากนั้น Incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้าง Plate ด้วย 0.05% PBS-Tween จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม 100 μ L ของ Rabbit antihuman immunoglobulin conjugated peroxidase (Sigma, USA) ที่เจือจางด้วย 0.05% PBS-Tween ในอัตราส่วน 1:2,000 Incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ภายหลังจากล้าง Unbound conjugate ออกจนหมด จึงเติม 100 μ L ของ OPD

(o-Phenylene diamine) substrate รอจนครบเวลา 30 นาทีจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 N H_2SO_4 และวัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ 490 nm.

ผลการทดลอง

จากการทดสอบหา Dilution ที่เหมาะสมของซีรัมคนปกติและผู้ป่วย *Penicilliosis marneffei* พบว่า Dilution ที่ 1:1000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้

ตลอดการทดลองนี้เพราะสามารถแยกความแรงของปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติและผู้ป่วยได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 1) ขณะเดียวกันที่ Dilution นี้ซีรัมของทั้งคนปกติและของผู้ป่วยต่างให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจาก non-specific binding ที่มีค่าต่ำโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.42 (SD=0.018) และในการทดลองนี้ได้กำหนดค่า cut-off โดยการคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ



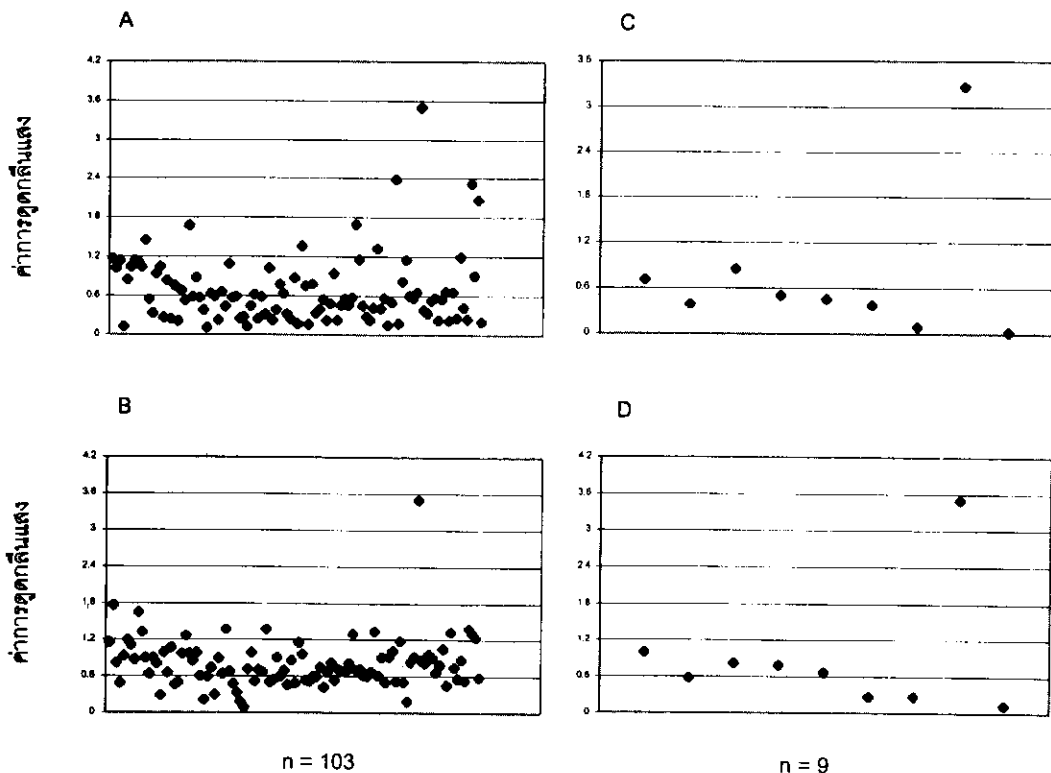
รูปที่ 1 Dilution ของซีรัมคนปกติ และผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตลอดการทดลอง

Non-specific binding + 10SD ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ 0.60 เมื่อใช้ซีรัม Dilution 1:1,000 มาทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated form และ Secreted form พบว่าในกลุ่มคนปกติจำนวน 103 ราย มี 62 ราย (60.19%), 19 ราย (18.45%) และ 22 ราย (21.36%) ที่ให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนในรูป Sonicated form โดยมีการดูดกลืนแสง ≤ 0.6 , 0.61–0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 2A) ขณะที่ซีรัมเหล่านี้ 30 ราย (29.13%), 52 ราย (50.49%) และ 21 ราย (20.39%) ให้ปฏิกิริยาต่อแอนติเจนในรูป Secreted form โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ ≤ 0.6 ,

0.61–0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 2B) เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งต่อแอนติเจนในรูป Sonicated form และ Secreted form พบว่าในซีรัมคนปกติทั้งหมด 103 ราย มี 51 ราย (49.51%) ที่ให้ค่าปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงต่อแอนติเจนทั้งสองรูปที่อยู่ในช่วงเดียวกัน กล่าวคือมี 24 ราย (47.06%), 11 ราย (21.57%) และ 16 ราย (31.37%) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ ≤ 0.6 , 0.61–0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ และเมื่อใช้ซีรัมผู้ป่วย *Penicilliosis* ที่ Dilution 1:1,000 มาทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้งสองรูปดังกล่าวพบว่ามีจำนวนซีรัมผู้ป่วยทั้งหมด 9 ราย มี

6 ราย (66.67%), 2 ราย (22.22%) และ 1 ราย (11.11%) ที่ให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนในรูป Sonicated form โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ ≤ 0.6 , 0.61–0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 2C) ขณะที่ทำการทดสอบกับแอนติเจนที่อยู่ในรูป Secreted form พบว่า 4 ราย (44.44%), 3 ราย (33.33%) และ 2 ราย (22.22%) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง

≤ 0.6 , 0.61–0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 2D) นอกจากนี้พบว่ามีซีรัมผู้ป่วยจำนวน 6 ราย (66.67%) เกิดปฏิกิริยาต่อแอนติเจนทั้งสองรูปโดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงเดียวกัน กล่าวคือ 4 ราย (66.67%), 1 ราย (16.67%) และ 1 ราย (16.67%) ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง ≤ 0.6 , 0.61–0.99 และ ≥ 1.0 ตามลำดับ



รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติและผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น penicilliosis marneffei ต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ และรูปที่เชื้อปล่อยออกมา โดยรูป A: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ B: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมคนปกติ กับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา, C: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ, D: แสดงปฏิกิริยาระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา

บทวิจารณ์

การใช้เทคนิค Indirect ELISA ตรวจหาแอนติบอดี ต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated และ Secreted form เปรียบเทียบระหว่างซีรัมคนปกติที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ กับซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* จากผลการศึกษาพบว่าในจำนวนซีรัมคนปกติทั้งหมด 103 ราย มี 41 ราย (39.81%) และ 73 ราย (70.88%) ที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในรูป Sonicated และ Secreted form ตามลำดับ โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามากกว่าค่า Cut-off (0.60) ส่วนซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* 9 ราย พบ 3 ราย (33.33%) และ 5 ราย (55.55%) ที่มีแอนติบอดีต่อที่อยู่ในรูป Sonicated และ Secreted form ตามลำดับ จะเห็นว่าจำนวนคนปกติและผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้งสองรูปของเชื้อรา *P. marneffei* มีจำนวนไม่ต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนซีรัมผู้ป่วยที่นำมาทดสอบมีจำนวนน้อยรายจึงทำให้ข้อมูลที่ได้มีความแตกต่างที่ไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่าซีรัมรายเดียวกันไม่ว่าจะเป็นของคนปกติหรือของผู้ป่วย ต่างให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนทั้งสองรูปในระดับที่ใกล้เคียงกันโดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันไม่เกิน 0.5 แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนทั้งสองรูปอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือมีส่วนของ Antigenic determinant ที่คล้ายคลึงกัน แต่หากพิจารณาให้ละเอียดยิ่งขึ้นจะพบว่าจำนวน ซีรัมของทั้งคนปกติและผู้ป่วยต่างให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนที่อยู่ในรูป Secreted form เป็นจำนวนที่มากกว่าแอนติเจนในรูป Sonicated form ดังนั้นการเป็น Antigenic determinant ของแอนติเจนในรูป Secreted form จึงน่าจะมีมากกว่าแอนติเจนที่อยู่ในรูป Sonicated form

การที่คนปกติมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* แสดงให้เห็นว่าคนปกติเหล่านี้ อาจเคยสัมผัสกับเชื้อรา *P. marneffei* มาก่อน และร่างกายมีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันทั้งทาง HMI และ CMI ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนั้นจึงไม่แสดงอาการของโรค *Penicilliosis marneffei* ส่วนในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ระบบภูมิคุ้มกันทั้ง CMI และ HMI ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ถูกทำลายได้ด้วยเชื้อหรือผลิตภัณฑ์ของตัวเชื้อ HIV ดังนั้นเมื่อได้รับเชื้อ *P. marneffei* อีกครั้งจึงแสดงอาการของโรคขึ้นมาได้ การทดลองในครั้งนี้ให้ผลที่ขัดแย้งกับการทดลองของ Cao และคณะ¹⁴ ที่พบว่าซีรัมของคนปกติที่อาศัยอยู่ในประเทศฮ่องกงจำนวน 90 ราย ให้ผลลบกับการทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ชนิด Purified Mp1 protein โดยมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาดำกว่าค่า Cut-off (0.5) ขณะที่ซีรัมของผู้ติดเชื้อ HIV และเป็นโรค *Penicilliosis marneffei* จำนวน 14 รายใน 17 ราย (82.35%) ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดนี้ ขณะที่ซีรัมผู้ป่วย *Penicilliosis marneffei* ที่ไม่ติดเชื้อ HIV ให้ผลบวกกับแอนติเจนชนิดนี้โดยให้ปฏิกิริยาที่แรงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV และเป็นโรค *Penicilliosis marneffei*¹⁴ จากผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องมาจากซีรัมที่ใช้ตรวจได้จากกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ต่างกัน ดังนั้นโอกาสในการสัมผัสเชื้อรา *P. marneffei* จึงมีได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้แอนติเจนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็น Crude protein antigens ดังนั้นแอนติบอดีที่ตรวจได้อาจเป็นแอนติบอดีที่เกิดจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reaction) กับแอนติเจนของเชื้อราชนิดอื่นเช่น *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* และ *Aspergillus* sp. ได้ เพราะ

จากการศึกษาของ Estrada และคณะพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อราทุกชนิดจะประกอบด้วย Polysaccharide เป็นส่วนใหญ่ และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันมักมีส่วนประกอบบางอย่างคล้ายคลึงกัน สำหรับเชื้อ *P. marneffei* จะมีส่วนประกอบของผนังเซลล์เป็น สารจำพวก Galactomannan และมี Epitope บางส่วนที่คล้ายกับผนังเซลล์เชื้อ *A. fumigatus*¹⁵ และจากการศึกษาของ Yuen ที่ได้ทำการตรวจหา แอนติบอดี ต่อเชื้อ *P. marneffei* ในซีรัมผู้ป่วย ติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* ด้วยวิธี Indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) โดยใช้ Germinating conidia และ Yeast cell ของเชื้อ *P. marneffei* เป็นแอนติเจน พบว่าซีรัมผู้ป่วยจำนวน 8 รายใน 103 ราย (7.77%) มีแอนติบอดี ชนิด IgG ต่อแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ใน Titer ที่สูงกว่า 160 ขณะที่ซีรัมของคนปกติและผู้ป่วยโรค อื่นๆ (Tuberculosis, typhoid fever, melioidosis, disseminated cryptococcosis, candidaemia, intraabdominal sepsis, autoimmune disease และ lymphoreticular cancer) มี Titer ที่ 10–40¹⁶ Vanittanakom และคณะ ได้ใช้ Crude extracellular protein ที่ปล่อยออกมาจากเชื้อรา *P. marneffei* ที่อยู่ในรูปยีสต์ มาตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* โดยวิธี Immunoblot assay พบว่า 45% ของซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* มีแอนติบอดีชนิด IgG ที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับ โปรตีนแอนติเจนทั้งขนาด 54 และ 50 กิโลดัลตัน อย่างไรก็ตามซีรัมของคนปกติและของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่ไม่เป็น *Penicilliosis marneffei* บางรายสามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับโปรตีน แอนติเจนทั้งสองขนาดนี้¹⁷ ถึงแม้ว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบอาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม แต่แอนติบอดีนี้อาจมีบทบาทที่จะช่วย

ทำลายเชื้อ *P. marneffei* ที่เข้าสู่ร่างกายได้ โดยจะทำหน้าที่เป็น Opsonin ซึ่งสามารถช่วยให้ Neutrophil และ Macrophage จับกินเชื้อได้ดียิ่งขึ้น เพราะจากการศึกษาของ Kudken พบว่า Neutrophil และ Macrophage มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อรา ชนิดนี้ โดยกลไกการทำลายเชื้อจะต้องมีการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างตัวเชื้อกับ Neutrophil หรือ Macrophage¹⁸⁻¹⁹ จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei* ส่วนใหญ่จะมีแอนติบอดีที่ไปปฏิกิริยาต่อแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูป Sonicated และ Secreted form ที่มีความแรงน้อยกว่าในกลุ่มคนปกติ ซึ่งแอนติบอดีที่อยู่ในระดับนี้อาจไม่สามารถทำลายเชื้อให้หมดไปจากร่างกายได้ ดังนั้นจึงแสดงอาการของโรค *Penicilliosis marneffei* ขึ้นมา จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้อาจมีส่วนช่วยให้มีความเข้าใจถึงกลไกของร่างกายในการป้องกันการติดเชื้อรา *P. marneffei* ได้เพิ่มขึ้น ตลอดจนช่วยให้มีการคิดค้นหาวิธีตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffei* ที่ให้ผลรวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ประครอง วิทยาศัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้าน การเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei*

ขอขอบคุณ คุณศิริชัย ลิทธิประเสริฐ กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการจัดเก็บซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น *Penicilliosis marneffei*

ขอขอบคุณ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้อนุญาตให้ใช้เครื่อง ELISA Washer และ ELISA Reader

เอกสารอ้างอิง

1. Capponi M, Sureau P, Segretain G. Penicilliose de *Rhizomys sinensis*. Bull Soc Pathol Exot 1956; 49: 418-21.
2. Di Salvo AF, Fickling AM, Ajello L. Infection caused by *Penicillium marneffe*: description of first natural infection in man. Am J Clin Pathol 1973; 60: 259-63.
3. Pautler Kb, Pathye AA, Ajello L. Import penicilliosis marneffe in the United States: report of a second human infection. Sabouraudia. J Med Vet Mycol 1984; 29: 433-8.
4. Deng ZL, Yun M, Ajello L. Human penicilliosis marneffe and its relation to the bamboo rat (*Rhizomys pruinosus*). J Med Vet Mycol 1986; 24: 383-9.
5. So SY, Chau PY, Jones BM, et al. A case of invasive penicilliosis in Hong Kong with immunologic evaluation. Am Rev Respir Dis 1985; 131: 662-5.
6. 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: 871-4.
7. Vithayasai P, Vithayasai V. HIV infection in clinical practice. Bangkok: Support The Children Foundation, 1992: 1-7.
8. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffe* infection in Southeast Asia. Lancet 1994; 344: 110-3.
9. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Nelson KE. Seasonal variation of disseminated *Penicillium marneffe* infections in Northern Thailand. Clin Infect Dis 1996; 173: 1490-3.
10. Phillips P. *Penicillium marneffe* part of Southeast Asian AIDS. JAMA 1996; 276: 86-7.
11. Drouhet E. Penicilliosis due to *Penicillium marneffe*: a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia. J Mycol Med 1993; 4: 195-224.
12. Pornprasert S. Cell mediated immune response to *Penicillium marneffe* antigen and mitogen in AIDS patients [Thesis] - Chiang Mai: Chiang Mai University, 1997.
13. Mekaprateep M. Immunoblot analysis of extracellular proteins secreted from mold and yeast forms of *Penicillium marneffe* [Thesis] - Chiang Mai: Chiang Mai University, 1995.
14. Cao L, Chen DL, Lee C, et al. Detection of specific antibodies mannoprotein for diagnosis of *Pennicillium marreffe* penicilliosis. J Clin Microb 1998; 36: 3028-31.
15. Estrada JA, Stylen D, van Cusse J, Pierard FC, Pierard GE. Immunohistochemical

- identification of *Penicillium marneffe* by monoclonal antibody. Intern J Dermatol 1992; 31: 410-2
16. Yuen K, Wong SS, Tsang DN, Chan P. Serodiagnosis of *Penicillium marneffe* infection. Lancet 1994; 344: 444-5.
17. Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sittisombut N, *et al.* Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicillium marneffe*. J Med Vet Mycol 1997; 35: 123-31.
18. Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Different susceptibilities of yeasts and conidia of *Penicillium marneffe* to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activity of murine macrophages. Clin Exp Immunol 1998; 112: 287-93.
19. Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Mechanisms of the *in vitro* fungicidal effects of human neutrophil against *Penicillium marneffe* induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Clin Exp Immunol 2000;119: 472-8.