

บทคัดย่อ

เชื้อ *P. insidiosum* เป็นเชื้อในกลุ่ม oomycetes ที่สามารถก่อโรคติดเชื้อ pythiosis ในคนและในสัตว์ การวินิจฉัยทำได้ยาก การรักษายังเป็นปัญหาเนื่องจากไม่มียาชนิดใดใช้รักษาได้ผล ถึงแม้ว่าเชื้อ *P. insidiosum* จะมีลักษณะเป็นสาหร่าย แต่เชื้อชนิดนี้กลับมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุศาสตร์กับไดอะตอมและสาหร่ายมากกว่าเชื้อรา จากการศึกษาด้านชีวพันธุศาสตร์ สามารถแบ่งเชื้อ *P. insidiosum* ออกเป็น 3 กลุ่มตามพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ คือ Clade-I (ประเทศในทวีปอเมริกา), Clade-II (ประเทศในทวีปเอเชียและออสเตรเลีย), และ Clade-III (ประเทศไทย) ข้อมูลต่างๆเกี่ยวกับเชื้อ *P. insidiosum* ยังมีน้อยมาก ในบรรดาเชื้อก่อโรคชนิดอื่นจำนวนมาก จะปล่อยโปรตีนชนิด effectors ออกมา ซึ่งสามารถมีผลต่อระบบการตอบสนองของโฮสต์และส่งเสริมการติดเชื้อได้ โปรตีน elicitors เป็น effectors ชนิดหนึ่ง ที่พบเฉพาะในเชื้อกลุ่ม oomycetes ทั้งนี้ ในเชื้อ oomycetes ที่ก่อโรคในพืช พบว่า elicitors มีหน้าที่กระตุ้นระบบป้องกันตัวของพืช และตัวโปรตีนเองสามารถเกาะกับโมเลกุลกลุ่ม sterol ได้ เมื่อไม่นานมานี้ คณะผู้วิจัยสามารถค้นพบยีนจำนวนหนึ่งที่ถอดรหัสเป็น elicitors จากข้อมูลพันธุศาสตร์ของเชื้อ *P. insidiosum* โดยยังไม่ทราบหน้าที่ของยีนเหล่านี้ต่อการติดเชื้อในคน คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาและวิเคราะห์ยีน elicitin ทางด้านพันธุศาสตร์ ชีวเคมี และภูมิคุ้มกันวิทยา คณะผู้วิจัยสนใจยีน elicitin ยีนหนึ่งซึ่งมีการแสดงออกของยีนสูงที่อุณหภูมิร่างกาย และตั้งชื่อยีนนี้ว่า ELI025 จากการศึกษ พบว่า ELI025 ถอดรหัสเป็นโปรตีน ELI025 ซึ่งมีขนาดเล็ก มีองค์ประกอบเป็นไกลโคโปรตีน และถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ของเชื้อ โดยโปรตีนนี้สามารถหลบหลีกการจับของแอนติบอดีได้ นอกจากนี้ โปรตีน ELI025 จากเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม มีความแตกต่างกันทางชีวเคมีและภูมิคุ้มกันวิทยา เนื่องจาก ELI025 เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะใน *P. insidiosum* และไม่พบในเชื้อชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคในคน คณะผู้วิจัยจึงได้นำแอนติบอดีต่อโปรตีน ELI025 ที่สร้างได้จากกระต่าย มาใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจชนิด immunohistochemical assay (IHC) เพื่อวินิจฉัยโรค pythiosis ในเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ ชุดตรวจ IHC สามารถตรวจพบเชื้อ *P. insidiosum* จากเนื้อเยื่อในกลุ่มทดสอบทั้งหมด 38 ตัวอย่าง (ความไวของชุดตรวจ 100%) โดยไม่ย้อมติดเชื้ออื่นๆ ในเนื้อเยื่อกลุ่มควบคุมจำนวน 49 ตัวอย่าง (ความจำเพาะของชุดตรวจ 100%) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้นำ effectors ชนิดต่างๆ ที่รวมกันอยู่ในโปรตีนที่เรียกว่า culture filtrate antigens ซึ่งสกัดได้จากเชื้อ *P. insidiosum* มาใช้พัฒนาชุดตรวจชนิด protein A/G-based immunochromatographic test (ICT) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในซีรัมผู้ป่วยและสัตว์ที่ป่วยเป็นโรค pythiosis ในการประเมินชุดตรวจ ICT ใช้ซีรัมจากกลุ่มทดสอบจำนวน 85 ตัวอย่าง (จากคน 28 ราย, สุนัข 24 ตัว, ม้า 12 ตัว, กระต่าย 12 ตัว, และโค 9 ตัว) และใช้ซีรัมจากกลุ่มควบคุมจำนวน 143 ตัวอย่าง (จากคน 80 ราย และสัตว์ 63 ตัว ที่ปกติหรือป่วยเป็นโรคอื่น) พบว่า ICT เป็นชุดตรวจที่อ่านผลได้เร็ว ใช้งานง่าย และมีประสิทธิภาพ (ความจำเพาะ 100% และความไว 91%) ต่อการวินิจฉัยโรค pythiosis ในคนและสัตว์ โดยสรุป การศึกษาโปรตีน ELI025 อย่างละเอียดทำให้เข้าใจชีววิทยาและพยาธิกำเนิดของเชื้อ *P. insidiosum* มากขึ้น และนำมาซึ่งการใช้ประโยชน์จากโปรตีน ELI025 เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis

คำสำคัญ: *Pythium insidiosum*, Pythiosis, Effector, Pathogenesis, Evolution, Diagnosis

Abstract

Pythium insidiosum is a unique oomycete that can infect humans and animals, and causes a life-threatening infectious disease, called “pythiosis”. Diagnosis of pythiosis is difficult. Controlling an infection caused by *P. insidiosum* is problematic because effective antimicrobial drugs are not available. Although *P. insidiosum* shares hyphal morphology with fungi, this pathogen is more closely related to diatoms and algae. Phylogenetic analyses divide *P. insidiosum* into 3 groups, according to geographic origins: Clade-I (Americas), Clade-II (Asia and Australia), and Clade-III (Thailand). Basic biological information of *P. insidiosum* is very limited. Many pathogens secrete proteins, known as effectors, which can affect the host response and promote the infection process. Elicitins are effector proteins found only in the oomycetes. In plant-pathogenic oomycetes, elicetins function as pathogen-associated molecular pattern molecules, sterol carriers, and plant defense stimulators. Recently, we reported a number of elicetin-encoding genes from the *P. insidiosum* transcriptome. Function of elicetins during human infections is unknown. One of the *P. insidiosum* elicetin-encoding genes, *ELI025*, is highly expressed and up-regulated at body temperature. This study aims to characterize the genetic, biochemical, and immunological properties of *ELI025*. We found that *ELI025* is a small, abundant, secreted glycoprotein that can evade host antibody responses. We investigated geographic variation of *ELI025* in 24 *P. insidiosum* strains isolated from humans, animals, and the environment. *ELI025* was secreted by all *P. insidiosum* strains isolated from different hosts and geographic origins, but the protein had different biochemical and immunological characteristics. Since *ELI025* has been identified in *P. insidiosum*, but not other human pathogens including true fungi, this study also aims to develop an immunohistochemical assay (IHC), using rabbit anti-*ELI025* antibody (anti-ELI), for diagnosis of pythiosis. Thirty-eight *P. insidiosum* histological sections stained positive by the anti-ELI based IHC, to give 100% detection sensitivity. The IHC reported negative stains for all 49 negative control sections, to give 100% detection specificity. We also used the pool of effector proteins in culture filtrate antigens to develop a protein A/G-based immunochromatographic test (ICT), for detection of anti-*P. insidiosum* antibody in patient sera. Eighty-five serum samples from 28 patients, 24 dogs, 12 horses, 12 rabbits, and 9 cattle with pythiosis, and 143 serum samples from 80 human and 63 animal subjects in a healthy condition, with thalassemia, or with other fungal infections, were recruited for assay evaluation. Detection specificity and sensitivity of ICT were 100% and 91%, respectively. The ICT is a rapid, user-friendly, and efficient assay for serodiagnosis of pythiosis in humans and animals. In conclusion, comprehensive characterization of *ELI025* promoted better understanding on biology and pathogenesis of *P. insidiosum*. *ELI025* was an efficient target for development of the diagnostic assays (i.e., IHC and ICT) for pythiosis.

Keywords: *Pythium insidiosum*, Pythiosis, Effector, Pathogenesis, Evolution, Diagnosis