



รายการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของโรคติดเชื้อรา
โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

โดย ผศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรีชาติกุล และคณะ

กรกฎาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของโรคติดเชื้อรา
โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

คณะผู้วิจัย		สังกัด
1. ผศ.ดร.จุฬารัตน์	ปรียชาติกุล	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หัวหน้าโครงการ
2. น.ส.กนกพร	จินขจร	คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล
3. นางอนุรักษ์	มันศรีชุม	คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล
4. นายศิวันธ์	ชูเทียน	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5. นายสมภพ	สรรพะฐตา	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. นายวิโรจน์	หมื่นหาญ	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
7. นายโสภณัฐ	คุณอยู่	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
8. รศ.ดร. อังคณา	ฉายประเสริฐ	คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล นักวิจัยที่ปรึกษา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

กิติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือขององค์กรและบุคลากรหลายหน่วยงาน
ดังต่อไปนี้ ผู้เขียนจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว) ที่เล็งเห็นความสำคัญและ
เปิดโอกาสให้ทุนสนับสนุนแก่ผู้สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกได้ทำงานวิจัยและพัฒนาอย่าง
ต่อเนื่อง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ นักวิจัยที่ปรึกษาที่
ได้กรุณา ให้ข้อคิด คำแนะนำ กำลังใจ และช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ในการวิจัย
รวมทั้งเอื้อเพื่อ เชื้อ สารเคมี เครื่องมืออุปกรณ์บางส่วนที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะแพทยศาสตร์
ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลที่ได้เอื้อเพื่อสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณมยุรี ฮาดแสนเมือง ผู้จัดพิมพ์เอกสารตลอดระยะเวลา 3 ปีของ
โครงการวิจัย และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว) ที่ได้
อำนวยความสะดวกและประสานงานด้วยดีตลอดมา

ท้ายที่สุดขอขอบพระคุณ มารดา สามี และบุตร ที่ให้กำลังใจ และเข้าใจในภาระงานที่
กระทำ จนบางครั้งจึงอาจจะกินเวลาของครอบครัวไปบ้าง ตลอดจนขอขอบพระคุณ หัวหน้างาน
เพื่อนร่วมงานและผู้ช่วยเหลือทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี แม้
จะไม่ได้เอ่ยนามแต่ความประทับใจในความช่วยเหลือของท่านเหล่านั้นจะยังคงอยู่กับผู้เขียน
ตลอดไป

ผศ. ดร. จุฬารัตน์ ปรีชาติกุล

บทคัดย่อ

Project code :

PDF/73/2540

Project title การพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของโรคติดเชื้อราโดยอาศัยเทคนิคทาง
อณูชีววิทยา

investigator: ผศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น หัวหน้าโครงการ
รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิจัยที่ปรึกษา

E-mail address: chupra@kku1.kku.ac.th

project period : 3 ปี

objectives : 1. ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Penicillium marneffei* โดยวิธี PCR ให้สามารถ
ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่มีศักยภาพเพียงพอ

2. ต้องการเตรียมชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจหาเชื้อราที่ก่อโรคกับระบบ
อวัยวะภายในที่พบในประเทศไทยโดยวิธี PCR

Methodology: ใช้วิธี polymerase chain reaction โดยศึกษาลำดับเบสของ 18S rRNA gene
ของเชื้อ *P. marneffei* เปรียบเทียบกับการ sequence ที่ได้ทำมาแล้วเมื่อตอนทำปริญญาเอก
ทำ alignment กับเชื้อราอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีใน GenBank เพื่อหาส่วนที่เป็น species specific
ของเชื้อ *P. marneffei* แล้วสร้าง primer ที่คิดว่าจำเพาะ พร้อมกับหา condition ที่ต้องการ
สำหรับวิธี PCR แล้วจึงทดสอบ primer และ condition กับ purified DNA ของเชื้ออื่น ๆ เพื่อ
หา specificity และหา sensitivity ของการทดสอบ จากนั้นนำมาทดลองกับ clinical
specimens และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

Results: สามารถทำการ วินิจฉัยเชื้อ *P. marneffei* โดยวิธี

1. PCR โดยใช้ F3-PM เป็น primer ใช้ condition 95 °C 62 °C 72 °C อย่างละ 1 นาที ทั้งหมด
35 รอบ สามารถตรวจพบ PCR product จาก target DNA เริ่มต้น 100 pg ให้ sensitivity และ
specificity 100% โดยทดสอบกับเชื้อ 32 species (52 strains) และสิ่งส่งตรวจ 4 ตัวอย่าง

2. One tube seminested PCR โดยใช้ primer 3 ข้าง คือ CPL1 , F3, PM ใช้ condition 95 °C
62 °C 72 °C อย่างละ 1 นาที 20 รอบ และ 95 °C 54 °C 72 °C อย่างละ 1 นาที 30 รอบ สามารถ
ตรวจพบ PCR product จาก target DNA เริ่มต้น 10 pg ให้ sensitivity และ specificity 100%
โดยทดสอบกับเชื้อ 59 species (107 strains) และสิ่งส่งตรวจ 20 ตัวอย่าง

3. ทำชุดตรวจสอบของ one tube seminested PCR

Discussion Conclusion: งานวิจัยนี้สามารถใช้ได้กับสิ่งส่งตรวจซึ่งทำให้น้อยระยะเวลาในการ
วินิจฉัยโรคและจำแนกชนิดเชื้อ โดยเฉพาะในกรณีที่เชื้อให้ผลการเพาะเชื้อแบบไม่แน่นอน เช่น
การสร้าง pigment สีแดง หรือการเปลี่ยนให้เป็น yeast form ซ้ำ

Suggestion/Further Implication/ Implementation : เนื่องจากผู้วิจัยทำงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อก่อ
โรค systemic mycoses มาโดยตลอดตั้งแต่ปริญญาเอก งานนี้จึงเป็นการเสริมองค์ความรู้ใน
ด้านนี้ให้มากขึ้น งานที่อยากจะทำต่อไปคืองานเกี่ยวกับการหา ลำดับเบสของ 18S rRNA ของ
เชื้อ *Pythium insidiosum* ให้สมบูรณ์ทั้ง gene เพราะยังไม่มีข้อมูลในส่วนนี้เลย

Keyword : *Penicillium marneffei*, PCR, ชุดตรวจสอบ

Abstract

Project code : PDF/73/2540

Project title: Development of diagnostic kits for mycosis based on molecular biology techniques

Investigator: Assist. Prof. Dr. Chularut Prariyachatigul researcher

Assoc. Prof. Dr. Angkana Chaiprasert mentor

E-mail address: chupra@kku1.kku.ac.th

project period : 3 years

objectives :1. To develop a diagnosis for *Penicillium marneffe* by PCR system
2. To prepare a kit-set to diagnose systemic mycoses

Methodology: To set a Polymerase chain reaction by studying of 18S rRNA gene of *Penicillium marneffe* and comparing the obtained sequence with the others sequences that deposit in GenBank to get the specific primer of *P. marneffe*. Test the primer and condition with purified DNA of other organisms to find specificity and sensitivity of the test. Then try with clinical specimens and set up a kit-set.

Results: We can diagnose *P. marneffe* by

1.PCR using F3-PM as primers and the condition is 95 °C 62 °C 72 °C 1 min each, 35 cycles, lower limit of detection is 100 pg, sensitivity and specificity 100% by using 32 species of organisms(52 strains) and 4 clinical samples.

2.One tube seminested PCR using 3 primers as follow CPL1, F3, PM. The condition is 95°C 62°C 72°C 1 min each, 20 cycles and 95°C 54°C 72°C 1 min each, 30 cycles, lower limit of detection is 10 pg, sensitivity and specificity 100% by using 59 species of organisms (107 strains) and 20 clinical samples.

3.Make a kit-set of one tube seminested PCR.

Discussion /Conclusion:This research can be applied with clinical specimens and makes a shorter process. In the case of pleomorphic fungi that can not be identified by culture we can use this PCR method for species delineation.

Suggestion/Further Implication/ Implementation :Would like to do further research about 18s rRNA sequence of *Pythium insidiosum*, which is a unique problem of systemic mycoses in Thailand because there was no information available at present.

Keyword : *Penicillium marneffe*, PCR, kit-set

Executive Summary

ปัจจุบันนี้พบ incidence ของโรคติดเชื้อราเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มบุคคลเสี่ยงซึ่งได้แก่ ผู้ป่วย AIDS ผู้ได้รับสารกตภูมิต้านทาน ผู้เปลี่ยนถ่ายอวัยวะต่างๆ รวมถึงผู้ได้รับการรักษาด้วยสารบำบัดต่างๆ (1-9) ซึ่งบุคคลเหล่านี้มิได้มีโอกาสติดเชื้อเฉพาะเชื้อ true pathogenic fungi เท่านั้น เชื้อซึ่งโดยปกติเป็น opportunistic saprophyte ที่ไม่ก่อโรคในบุคคลธรรมดา ก็สามารถก่อโรคในบุคคลเสี่ยงเหล่านี้ได้ อัตราการเพิ่มจำนวนผู้ติดเชื้อราในประเทศไทยเพิ่มขึ้นเพราะปัจจุบันมีบุคคลเสี่ยงมากขึ้นและเพราะสภาวะแวดล้อมของประเทศไทยเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยที่ประเทศไทยอยู่ในดินแดนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็น endemic area โดยเฉพาะสำหรับเชื้อ *P. marneffei* (10) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ของคนไทยที่เป็น Thalassemia ซึ่งเป็นมูลเหตุประกอบอย่างหนึ่งของการติดเชื้อ *Pythium insidiosum* ก็มีมากขึ้น เช่นกัน เหล่านี้จึงเป็นเหตุให้พบการติดเชื้อราดังกล่าวในประเทศไทยมาก (11-13) ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อแบบ systemic ได้ภายในเวลาไม่นาน ดังนั้นการตรวจพบเชื้อได้เร็วเท่าไร ก็จะสามารถช่วยชีวิตผู้ติดเชื้อได้เร็วเท่านั้น ในปัจจุบันการตรวจหาเชื้อรามีหลายวิธีด้วยกัน เช่นวิธีทาง serology โดยมีทั้ง immunodiffusion, latex agglutination, enzyme link immunosorbent assay รวมถึงวิธีดั้งเดิมคือ เพาะหาเชื้อสาเหตุในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีทั้งหลายดังกล่าวมาแล้วนั้นต่างก็มีข้อจำกัดของแต่ละวิธี ทั้งในด้าน เวลา ความไว ความจำเพาะของการทดสอบ (14-15) วิธีทาง molecular ได้ถูกนำมาใช้กันมากมายในปัจจุบัน โดยเฉพาะวิธี polymerase chain reaction(PCR) เพื่อเพิ่มขยาย gene ส่วนจำเพาะที่ต้องการตรวจสอบ วิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุแม้ว่าจะมีปริมาณเพียงน้อยนิดซึ่งมีหน่วยเป็นเพียง picogram หรือ femtogram ได้ (16-20,37)

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ เป็นการสนับสนุนของ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) โดยทุนวิจัยหลังปริญญาเอกที่ได้รับนี้มีวัตถุประสงค์ให้ผู้รับทุนสามารถทำงานวิจัยอย่างต่อเนื่องจากปริญญาเอก ซึ่งวิทยานิพนธ์ปริญญาเอกที่หาไว้เกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อรากลุ่มโรค systemic ที่สำคัญในประเทศไทยโดยวิธี PCR พบว่าเชื้อราสาเหตุสำคัญดังกล่าวมี 6 ชนิด คือ *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffei* และ *Pythium insidiosum* ซึ่งได้ทำการวิจัยเสร็จแล้ว 4 เชื้อ เหลืออีก 2 เชื้อ คือ *Penicillium marneffei* และ *Pythium insidiosum* ที่ยังไม่ได้ทำ ทุนวิจัยที่ได้รับครั้งนี้จึงทำต่อโดยเน้นในส่วนของการเชื้อ *Penicillium marneffei* ซึ่งต้องการพัฒนาให้สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ต่อไป โดยเฉพาะเมื่อสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปได้ก็จะเพิ่มความสะดวกแก่ผู้ใช้อีกด้วย

การวิจัยทำเป็น semi-nested PCR เริ่มจากเตรียม design primer และ condition ที่จะใช้โดยหาข้อมูลจาก computer รวมทั้งลองทำการทดลองใน computer โดยให้ primer ที่ design นั้น วิ่งเข้าไปใน computer เพื่อดูว่ามีโอกาสจับกับ DNA template ของ gene อะไรและ organism ไດบ้าง วิเคราะห์ข้อมูลเหล่านั้น รวมทั้งตัดสินใจเลือก primer และ condition ที่

ต้องการเมื่อสังเคราะห์ primer แล้วจึงทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบ condition ที่ต้องการนั้นว่ามีความเป็นไปได้ในห้องปฏิบัติการหรือไม่และทำการปรับเปลี่ยน condition จนได้ตามต้องการคือ สามารถ amplify DNA template ของ *P. marneffei* ได้ ทดสอบ sensitivity และ specificity ของ primer และ condition ที่ได้นั้น เนื่องจาก *P. marneffei* เป็น dimorphic fungi จึงต้องทำการเปลี่ยน form ของ *P. marneffei* จาก mold form เป็น yeast form แล้วนำมาทดสอบตาม condition ที่เคยทำกับ mold form ที่เคยได้ผลมาแล้วว่าจะให้ผลเช่นไร หลังจากทดสอบ primer และ condition กับ purified DNA ของเชื้ออื่นๆ เพื่อหา specificity และหา sensitivity ของการทดสอบได้แล้วจึงมาทดลองกับ clinical specimens เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

Penicilliosis marneffei เป็นโรคที่พบเฉพาะในเขตประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางตอนใต้ของประเทศจีน เป็นโรคติดเชื้อราที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium marneffei* ซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อร่างกายหลายระบบ ผู้ป่วยมักมีความบกพร่องทางด้านภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่ก็อาจพบได้ในคนที่มีร่างกายแข็งแรงปกติ (21)

ประวัติ

ในปี ค.ศ.1956 พบโรคติดเชื้อจากราสองรูปใน genus *Penicillium* ซึ่งเกิดขึ้นกับ “อัน” (bamboo rat, *Rhizomys sinensis*) ในประเทศเวียดนาม(22) ต่อมา มีรายงานการติดเชื้อในคนโดยรายแรกเป็นนักวิทยาศาสตร์เกิดอุบัติเหตุในห้องทดลองถูกเข็มที่มีเชื้อราชนิดนี้แทงที่นิ้วมือ และอีกรายเป็นชายชาวอเมริกัน อายุ 61 ปี มีประวัติการป่วยเป็นโรค Hodgkin's disease และเคยเดินทางมาแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มาก่อน (23) ได้มีการขนานนามเชื้อ species นี้ว่า *Penicillium marneffei* ในปี 1959 เพื่อเป็นเกียรติแก่ Dr. Marneffe ผู้อำนวยการสถาบัน Pasteur ในขณะนั้น (24)

ในปี 1974-1982 พบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อรานี้ครั้งแรกในประเทศไทย ที่โรงพยาบาลรามารับติ กรุงเทพฯ จำนวน 5 ราย (25) หลังจากนั้น มีรายงานพบโรคนี้ในประเทศจีนฮ่องกง ตั้งแต่ปี 1988 เป็นต้นมาพบการติดเชื้อรา *P. marneffei* สูงขึ้นเรื่อย ในผู้ป่วยเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ (21)

ระบาดวิทยา

โรค *Penicilliosis marneffei* มีอุบัติการณ์การติดเชื้อสูงในผู้ป่วย AIDS เป็นอันดับ 3 รองจาก extrapulmonary tuberculosis และ Cryptococcal meningitis ในประเทศไทยและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (9,26,27) แหล่งที่พบว่ามีการระบาดสูงคือ ภาคเหนือของประเทศไทย และตอนใต้ของประเทศจีน โดยผู้ป่วยมักมีความบกพร่องทางด้านภูมิคุ้มกันของร่างกายอยู่ก่อนแล้ว หรืออาจพบได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันปกติ โดยมักพบร่วมกับผู้ติดเชื้อ HIV (1-9)

ในประเทศไทย จากการรายงาน พบว่าอุบัติการณ์การติดเชื้อนี้ในกรุงเทพฯ และภาคเหนือของไทย สูงขึ้นมาจาก 500 ราย ในปี 1994 เป็น 1,300 ราย ในปี 1995 (28)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานการติดเชื้อนี้ในหลายประเทศทางตะวันตก เช่น อิตาลี, อังกฤษ, แคนาดา, ฝรั่งเศส, เนเธอร์แลนด์, สวิสเซอร์แลนด์ และ อเมริกา โดยพบว่าผู้ป่วยทั้งหมดล้วนมีประวัติการมาท่องเที่ยวหรือพักอาศัยอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตอนใต้ของจีนทั้งสิ้น (27)

Penicilliosis marseffii เป็นโรคที่มีการติดเชื้อได้ง่ายและรวดเร็ว โดยผ่านทาง การหายใจเอาสปอร์หรือชิ้นส่วนของเชื้อเข้าไป การได้รับเชื้อโดยตรงทางบาดแผลที่ผิวหนัง และ ทางอาหาร(21,26,29,30) โดยเฉพาะรายงานจากประเทศจีนซึ่งพบมีผลในลำไส้ แหล่งของ เชื้อ *P. marseffii* ในธรรมชาติยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน เท่าที่ค้นพบคือแยกเชื้อได้จากอวัยวะ ภายในของอ้น หรือ bamboo rat ในเวียดนาม จีน และประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบเชื้อในมูล อ้น และดินที่บริเวณรังอ้น (21,31,32)

วิทยาเชื้อรา

P. marseffii เป็นเชื้อที่แยกเป็น species ใหม่ ลักษณะสำคัญของเชื้อนี้คือเป็น species เดียวเท่านั้น ใน genus *Penicillium* ที่เป็นราสองรูป (dimorphic fungi) ลักษณะโคโล นิมี 2 แบบ โดยที่ 25 °C โคโลนิจะมีสีขาวเทาภายใน 2 วัน จากนั้นจะเริ่มย่นคล้ายผ้ากำมะหยี่ และเปลี่ยนเป็นสีเหลือง-ส้ม, เหลืองเขียว, เทาหรือเขียวตรงกลาง ส่วนบริเวณรอบ ๆ โคโลนิจะมีสีขาว, เทา-ส้ม หรือม่วง-ส้ม และแผ่เป็นรัศมี ลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของเชื้อนี้คือจะ สร้างสารสีแดงซึ่งละลายน้ำได้ แพร่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้านหลังโคโลนิ (32,33) เชื้อนี้ มีอัตราการเจริญเร็วโดยภายใน 2 วัน โคโลนิของเชื้อจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm และ เจริญเป็น 40 mm ภายใน 2 สัปดาห์ (27, 36)

โคโลนิที่ 37 °C จะมีลักษณะแบบเนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม นูน สีขาว จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสี ชมพูในวันที่ 4 และสี tan ในวันที่ 12 ผิวจะเริ่มเหี่ยวไม่มีการสร้างสารสีแดงละลายในอาหาร เลี้ยงเชื้อหรืออาจสร้างได้ปริมาณน้อย อัตราการเจริญช้ากว่าที่ 25 °C โดยประมาณ 10 วัน จะมี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนิ 12 mm ในเนื้อเยื่อ yeast cell จะมีรูปร่างกลมหรือรี (2.5-4.5 μ m) เมื่ออยู่ใน macrophages หรืออาจยวรี (3-8 x 2 μ m) และเป็นเส้นโค้งเมื่ออยู่นอกเซลล์ (extracellular) (26,32)

การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิด light microscope จากโคโลนิที่ 25 °C จะ เห็นสายรามีผนังกัน มีกิ่งก้าน ก้านชู conidia มีทั้งที่ด้านข้างของสายรา และที่ปลายของสายรา ซึ่งจะมี phialides 3-7 อัน (3.2-8 x 0.7-3 μ m) หรือมากกว่านั้น conidia มีลักษณะเรียบรูป ellipsoidal หรือ "lemon - shaped" (1.3-4 x 0.7-5 μ m)

การตรวจที่ 37 °C โดยกล้อง transmission electron microscopy จะเห็นเซลล์ รูปร่างกลม หรือรี ขนาดประมาณ 33 μ m ไม่พบการแตกหน่อ แต่มีผนังแบ่งสองภายในเซลล์ (cross septa หรือ binary fission) นอกจากนั้นอาจพบมีสายราสั้น ๆ จำนวนเล็กน้อย (26)

การเกิดโรคและการแสดงที่สำคัญ

การติดเชื้อ *P. marseffii* จากธรรมชาติหรือติดจากสัตว์มาสู่คน เกิดได้อย่างไร ยังไม่ทราบ เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มีรอยโรคที่ปอดร่วมด้วย ผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อโดยการ หายใจเอาสปอร์หรือชิ้นส่วนของเชื้อเข้าไป การรับเชื้อทางผิวหนังโดยบาดแผลก็อาจทำให้เกิด

โรคได้ ส่วนการติดเชื้อทางการกินมีความเป็นไปได้ต่ำ แต่ก็ควรคำนึงถึงเนื่องจากเชื้อมีอยู่ในสัตว์ *Rhizomys species* ซึ่งมีผู้นิยมรับประทานเป็นอาหาร โดยมีการปรุงทั้งแบบสุกหรือแบบสุก ๆ ดิบ ๆ และในผู้ป่วยชาวจีนพบ 2 ราย มีรอยโรคในลำไส้ร่วมด้วย ผู้ที่ป่วยด้วยโรค *Penicilliosis mameffei* มักมีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหรือเป็นโรคอื่นอยู่ก่อนแล้ว ได้แก่ ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส AIDS, ผู้ป่วยวัณโรค, ผู้ป่วยโรค systemic lupus erythematosus (SLE) , ผู้ป่วย lymphoproliferative disorder, ผู้ป่วยมะเร็งปอด, ผู้ป่วยโรค Hodgkin's disease (21), ผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนไต (26) เป็นต้น ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชายพบได้ในคนหลายอาชีพ แต่พบค่อนข้างสูง ในคนที่มีอาชีพทำนาทำไร่ ทั้งเด็กและผู้ใหญ่ อายุตั้งแต่ 3 เดือน - 72 ปี (21,26,27)

อาการของผู้ป่วยด้วยโรค *Penicilliosis* มีความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นกับความต้านทานของร่างกายผู้ป่วยหรืออาจขึ้นกับทางที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย ปริมาณของเชื้อ หรือความรุนแรงในการก่อโรค ส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและรุนแรง อาการของ *Penicilliosis* ในผู้ป่วยโรคเอดส์ มีอาการร่วมที่สำคัญคือ เป็นการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย ผู้ป่วยมีไข้ ไอ น้ำหนักลด และมีภาวะโลหิตจางร่วมด้วย พบการติดเชื้อที่ต่อมน้ำเหลือง ในไขกระดูก ตับและม้ามโต ซีด เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวน และมีรอยโรคเป็นตุ่มที่ผิวหนังแบบแพร่กระจาย มีหลายรายที่มีลักษณะตุ่มแบบปุ่มตรงกลาง (umbilicated papules) ตรงกลางมักเป็นแผล necrosis โดยโรคที่ผิวหนังพบได้เกือบทุกราย (พบประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วย) พบได้ทั้งที่บริเวณหน้า แขน ขา และลำตัว นอกจากนี้อาจพบรอยโรคได้ที่ ไต กระดูก เยื่อหุ้มหัวใจ อวัยวะเพศ ผู้ป่วยที่มีรอยโรคแบบแพร่กระจายมีอาการรุนแรงถึงตายถ้าไม่ได้รับการรักษา การติดเชื้อแบบแพร่กระจายจนถึงแก่ชีวิตนั้นนอกจากพบในผู้ป่วยโรคเอดส์แล้วยังพบในผู้ป่วยวัณโรค (21) อาการที่พบได้บ่อยที่สุดคือ มีไข้ น้ำหนักลดและเกิด anemia (26,27,28)

การวินิจฉัย

1.การตรวจโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจพบเชื้อที่มีรูปร่างคล้ายยีสต์ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโดยตรงจะช่วยให้การวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างตรวจอาจเป็นเลือด สะเก็ดแผลที่ผิวหนัง ไขกระดูก ชิ้นเนื้อบริเวณตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง น้ำเจาะข้อ เสมหะหนองจากแผล โดยนำตัวอย่างตรวจมาสเมียร์บนแผ่นกระจก ย้อมสี Wright's, Giemsa, hematoxylin and eosin, Grocott - Gomori methenamine - silver nitrate (GMS) (36) และ periodic acid - Schiff stains (PAS) จะพบเชื้อเป็นเซลล์คล้ายยีสต์ รูปกลมรี มีผนังกันแบ่งสองภายในเซลล์ เชื้อมีขนาดประมาณ 3 ไมโครเมตร อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์แมคโคฟาจ เชื้อที่อยู่นอกเซลล์จะมีรูปร่างยาวรีคล้ายไส้กรอก ขนาดประมาณ 3x4 ไมโครเมตร แต่อาจยาวได้ถึง 8 ไมโครเมตร ปฏิกริยาการตอบสนองของเซลล์ร่างกายเป็นแบบ granulomatous inflammation

2. การเพาะเชื้อ เชื้อ *P. mameffei* ในตัวอย่างตรวจเจริญเร็วใน Sabouraud dextrose agar ที่อุณหภูมิ 28 °C ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เชื้อเป็น mold มีลักษณะโคโลนีที่พบได้บ่อย ๆ เป็น downy, velvet หรือ powdery บางสายพันธุ์เป็นชนิด glabrous ขณะที่เชื้ออื่นให้โคโลนีสีขาวอมเทาชมพู เมื่อเชื้อสร้างสปอร์ผิวหน้าโคโลนีมักมีสีเขียวอมเหลือง สร้างสารสีแดงละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแก่ขึ้นโคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นกลายเป็นสีแดงเข้มหรือสีน้ำตาลแดง และอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีแดงเข้มทั่วทั้งหลอด ลักษณะเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบสายราชนิดมีผนังกันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 3 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์มีลักษณะเป็น penicillus ซึ่งมักพบหลาย ๆ แบบในเชื้อสายพันธุ์เดียว penicillus ประกอบด้วยก้าน phialide คล้ายนิ้วมือมีจำนวนตั้งแต่ 3-7 หรืออาจพบได้มากกว่านี้ เรียงเป็นวง 1 ชั้น (monoverticillate) ที่เรียงเป็นวง 2 ชั้น มี 2 แบบ คือ symmetric biverticillate และ asymmetric biverticillate penicillus ส่วนปลายของ phialide มี conidia เรียงต่อเป็นสาย มีรูปร่างรีขนาด 2 x 2.5 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบก้านเดี่ยว (single phialide) ไม่มีการเรียง เป็น penicillus อาจสั้นหรือยาว conidia ต่อกันเป็นสายอาจพบดูลายเป็นกลุ่มที่ปลายก้าน

ที่อุณหภูมิ 37 °C บน brain heart infusion agar เชื้อเจริญให้โคโลนีคล้ายยีสต์ สีน้ำตาลอมแดง เซลล์รูปกลมรี มีผนังแบ่งสอง (binary fission) หรือ cross septation ภายใน ถ้าเพาะเชื้อมาจาก mold form สายราจะเกิดผนังกันคล้าย arthroconidia มีการหลุดจากกัน แต่ละเซลล์เป็นรูปรีหรือหดสั้นลงจนกลม และเจริญโดยการแบ่งสอง ขนาดของเชื้อประมาณ 3 x 4 ไมโครเมตร อาจยาวถึง 8-10 ไมโครเมตร (21, 36)

3. การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น การตรวจหา antibodies และ antigen โดยวิธี Immunodiffusion test, การตรวจหา antigenemia โดยวิธี latex agglutination test (28,34), การตรวจหา antigenuria (28), การตรวจทาง Immunohistochemical assay โดยใช้ monoclonal antibody (EB-A1) (26) และ specific fluorescent polyclonal antibody เพื่อตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อ (tissue) (28) การทดสอบ exoantigen (15,21,27,32), การตรวจหา titer ของ IgG โดยวิธี indirect immunofluorescent antibody test (27) การตรวจโดยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยาอาศัยหลักการของปฏิกิริยาของ antigen และ antibody แม้ว่าการทดสอบจะทำได้รวดเร็ว ไม่กินเวลานานเหมือนการเพาะเชื้อ แต่อาจเกิด cross reaction ของการ share epitopes กับเชื้ออื่นได้ โดยเฉพาะ yeast form ของ *Histoplasma capsulatum* (38)

4. การตรวจทางวิธีอื่น ๆ เช่น การทำ biopsy (32), การทดสอบการเจริญและความไวต่อ nitric oxide ของ *P. mameffei* (33) และที่สำคัญในปัจจุบันมีการศึกษาและประยุกต์ใช้ เทคนิคทาง Molecular มาช่วยในการวินิจฉัย *P. mameffei* ดังตัวอย่างเช่น การนำความรู้เรื่อง ตำแหน่ง Phylogenetic ของ *P. mameffei* ร่วมกับการใช้เทคนิค PCR มาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ที่จำเพาะของ *P. mameffei* (30), การใช้ Restriction Endonuclease ในการวิเคราะห์ *P. mameffei* (35) โดยการใช้เทคนิคทาง Molecular มาช่วย

ในการวินิจฉัย *P. marsefellet* ก็โดยมุ่งหวังว่าจะเป็นวิธีที่ให้ความเร็ว, ความไว และความจำเพาะ
ในการวินิจฉัย มากกว่าวิธีอื่น ๆ ดังที่ได้กล่าวมา

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1

ทำการวิเคราะห์ 18S rRNA gene sequence ของเชื้อ *P. marneffei* (ที่ได้ทำการ sequence มาแล้วเมื่อตอนทำปริญญาเอก) โดยเทียบ (alignment) กับเชื้อราอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีใน GenBank พบว่า ส่วนที่จะเป็น species specific สำหรับเชื้อตัวนี้ สามารถพอจะหาได้ จึงนำ specific sequence นี้มา design เป็น specific primer สำหรับ *P. marneffei* เรียก primer คู่นี้ว่า F3 - PM (F3 เป็น primer ข้างซ้าย PM เป็น primer ข้างขวา) หลังจากนั้นทำการทดสอบนำ primer คู่นี้วิ่งเข้าไปใน DNA database sequence ทั้งหมดที่มีในแผ่น Entrez โดยใช้ program Macvector ว่าสามารถ amplified กับ DNA template ของ organism ไดบ้าง วิเคราะห์ข้อมูลจากผลที่ได้จาก computer เมื่อทราบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะสำเร็จได้ จึงลองมาทำในห้องปฏิบัติการจริง โดยสังเคราะห์ primer คู่นี้ แล้วทำการ amplified กับ DNA template ของเชื้อ *P. marneffei* โดยใช้ condition ที่คำนวณจากการหา T_m ของ primer ทั้ง 2 ข้างว่า annealing temperature ควรจะเป็นเช่นไร ทดสอบ condition ที่ได้กับการทดลองจริงในห้องปฏิบัติการ มีการปรับเปลี่ยน condition เล็กน้อย จนเหมาะสมที่จะ amplified DNA template ของ *P. marneffei* ได้ แล้วจึงนำ DNA template ของ *P. marneffei* ทุก strain ที่มีทั้งหมดมาทำการ amplified เมื่อได้ผลเป็นที่พอใจ จึงทำการทดสอบหาปริมาณ DNA ต่ำสุดที่จะตรวจพบได้ sensitivity และ specificity ของการ amplified นี้ต่อไป ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง ดังแสดงในหน้าผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 2

หลังจากพบปัญหาในขั้นตอนที่ 1 คือมีงานของผู้อื่นทำคล้ายกันตีพิมพ์ผลงานออกมา (18) ดังได้รายงานไว้ในหน้าบทวิจารณ์ ผู้วิจัยจึงได้ดัดแปลงโดยเพิ่ม primer อีกหนึ่งข้างเพื่อทำเป็น seminested PCR ซึ่ง primer ข้างที่เพิ่มไปนี้ คือ CPL1 เป็น primer ข้างซ้าย (forward primer) เช่นเดียวกับ F3 แต่มีตำแหน่งอยู่ระหว่าง F3 และ PM โดยได้ทดลองทำการปรับเปลี่ยน condition หลายครั้ง เพราะต้องการทำเป็น one tube seminested PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity of detection limit และลดปัญหาอันอาจเกิดจาก carry contamination สิ่งที่ต้องทดลอง vary คือ ความเข้มข้นของ primer แต่ละข้าง ความเข้มข้นของ Mg^{++} อุณหภูมิของการ denature, annealing และ extension และเวลารวมทั้งจำนวนรอบในการ run จากนั้นจึงหา sensitivity และ specificity เนื่องจาก *P. marneffei* เป็น dimorphic fungi จึงต้องทำการเปลี่ยน form ของ *P. marneffei* จาก mold form เป็น yeast form แล้วนำมาทดสอบตาม condition ที่เคยทำกับ mold form ที่เคยได้ผลมาแล้วว่าจะให้ผลเช่นไรโดยสุ่มทำเพียงบาง strain เท่านั้น เนื่องจาก mold form และ yeast form ของ *P. marneffei* strain เดียวกันมีลำดับเบสของ 18S rRNA gene เหมือนกัน ดังนั้นผลของ yeast form ก็ควรจะเหมือนกับ mold form เพราะทำ PCR จากลำดับเบสเดียวกัน นอกจากนี้การที่ผู้วิจัยทำการเปลี่ยน form ของ *P. marneffei* จาก mold form เป็น yeast form ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการนำเชื้อที่เป็น yeast form ไปใช้ในการ

ทำการทดลองเลียนแบบสิ่งส่งตรวจโดยใส่เชื้อที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ดูว่า yeast form ปริมาณน้อยที่สุดเท่าใดที่การทดสอบยังสามารถตรวจพบได้ แล้วจึงทดลองใช้กับสิ่งส่งตรวจ เมื่อได้ผลแล้วจึงจัดทำเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

อนึ่งตามวัตถุประสงค์เดิมที่เขียนไว้ตอนขอทุนเดิมมี 3 ข้อ โดยวัตถุประสงค์ข้อที่ 2 จะพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Pythium insidiosum* โดยวิธี PCR ให้สามารถนำมาใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่มีศักยภาพเพียงพอ แต่ได้แจ้งขอเปลี่ยนแปลงในรายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 18 เดือนไปแล้วว่าจะไม่พัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยแต่จะ propose specific primer ที่อาจนำไปใช้สำหรับผู้สนใจจะนำไปวิจัยต่อ ซึ่งในเรื่องนี้ผู้วิจัยได้ amplified 18S rDNA template ของ *Pythium insidiosum* โดยใช้ universal primer ที่ใช้ได้กับเชื้อราทั่ว ๆ ไปที่ผู้วิจัยได้ design ขึ้นมาตอนทำงานภาคนิพนธ์ปริญญาเอก โดย product ที่ได้จะอยู่ในช่วงประมาณ 606 bp จากนั้นจึงหาลำดับเบสจาก PCR product ที่ได้นี้ แล้วจึงนำลำดับเบสที่ได้ มาเทียบทำ alignment กับเชื้ออื่น ๆ ที่มีข้อมูลอยู่หาว่ามีบริเวณใดในช่วง 606 bp นี้ใหม่ที่ specific เฉพาะกับ *Pythium insidiosum*

ผลการทดลอง
ผลจากขั้นตอนที่ 1

ได้ design primer คู่หนึ่ง ซึ่งใช้สำหรับเป็น species specific ต่อเชื้อ *P. marneffei* โดย primer คู่นี้ คือ F3-PM เป็นส่วนที่อยู่ใน 18S rRNA gene ที่เมื่อใช้ amplified แล้วจะมีขนาดของ product ประมาณ 333 bp. โดย

Forward primer (ข้างซ้าย) คือ F3 ประกอบด้วย 16 base มี Tm 52°C และมี sequence ดังนี้

5' ATTCCggAgAgggAgC 3'

Reverse primer (ข้างขวา) คือ PM ประกอบด้วย 25 base มี Tm 76°C และมี Sequence ดังนี้

5' ggATTCCCCAgAAAgAAAggCCCAT 3'

primer คู่นี้สามารถ amplified DNA template ของ *P. marneffei* ได้หลังจากที่ทดลอง condition ต่าง ๆ แล้วพบว่า condition ที่สามารถ Amplified เพื่อให้ได้ specific product คือ

denature temperature	95°C เป็นเวลา 1 นาที
annealing temperature	62°C เป็นเวลา 1 นาที
extension temperature	72°C เป็นเวลา 1 นาที

โดยใช้จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ

หลังจากได้ condition นี้แล้ว ได้ลองนำไป amplified กับ *P. marneffei* DNA เพื่อหาปริมาณต่ำสุดของ DNA ที่จะตรวจพบ ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 100 pg

สามารถหา sensitivity และ specificity ของการทดสอบนี้ได้ 100% โดย primer คู่นี้ไม่สามารถ amplify DNA template ของ organism อื่น ๆ ได้เลย นอกจาก DNA template ของ *P. marneffei* เท่านั้น (ใช้ *P. marneffei* ในการทดสอบ 21 strains) organism อื่น ๆ ที่นำมาใช้ในการทดสอบมี 31 species (31 strains) ดังนี้

Mold form of fungi

1. *Absidia* sp.
2. *Apergillus flavus*
3. *Aspergillus fumigatus*
4. *Aspergillus niger*
5. *Aspergillus terreus*
6. *Basidiobolus ranarum*
7. *Cladosporium carrionii*
8. *Conidiobolus incongruus*
9. *Epidermophyton floccosum*

10. *Exophiala jeanselmei*
11. *Fonseceae compactum*
12. *Fonseceae pedrosoi*
13. *Histoplasma capsulatum*
14. *Mucor* sp.
15. *Paecilomyces varioii*
16. *Pheoannellomyces werneckii*
17. *Penicillium chrysogenum*
18. *Phialophora verrucosa*
19. *Pythium insidiosum*
20. *Rhizopus* sp.
21. *Scedosporium apiospermum*
22. *Trichophyton mentagrophytes*
23. *Trichosporon* sp.

Yeast form of fungi

1. *Candida albicans*
2. *Candida krusei*
3. *Candida parapsilosis*
4. *Candida tropicalis*
5. *Cryptococcus neoformans*
6. *Rhodotorula* sp.

Others

1. human DNA
2. *Nocardia asteroides*

ได้ทำการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจ 4 ตัวอย่างจากผู้ป่วยเอดส์คนเดียวกันโดยเป็น sputum 3 ตัวอย่าง และ peritoneal lymphnode 1 ตัวอย่าง ให้ผล PCR บวกทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยที่ sputum 3 ตัวอย่าง culture ไม่ขึ้น แต่ตรวจจากกล้องโดยย้อม calcofluor white stain พบลักษณะของ yeast cell ที่มี cross walls ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของ *P. marneffei* ส่วน peritoneal lymphnode 1 ตัวอย่าง ให้ผลการเพาะเชื้อขึ้น สอดคล้องกับผลของ PCR ส่วนรายละเอียดของผู้ป่วยรายนี้ดูได้จากภาคผนวก

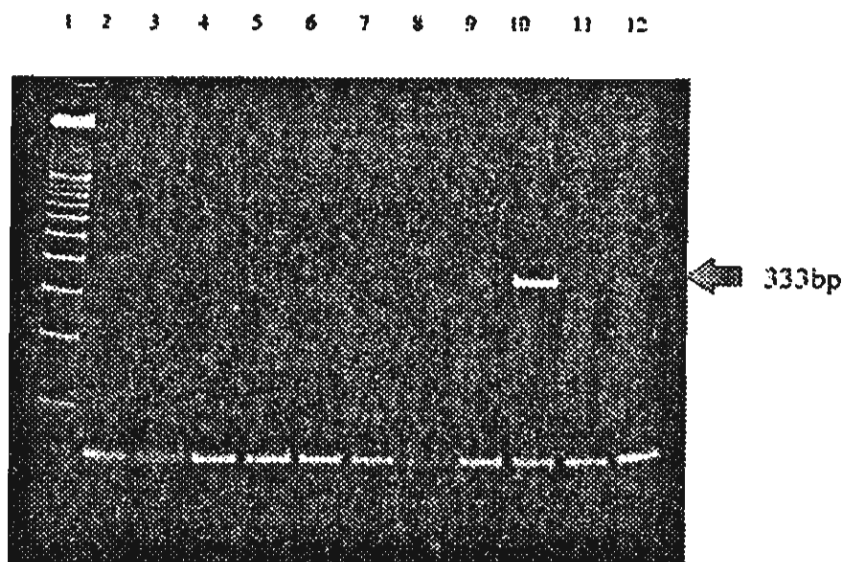


Figure 1. Amplificaion pattern of ten representative fungal species and controls using F3-PM primers.

- (Lane 1): 100 bp ladder,
- (Lane 2): *Candida albicans*,
- (Lane 3): *Candida tropicalis*,
- (Lane 4): *Candida parapsilosis*,
- (Lane 5): *Candida krusei*,
- (Lane 6): *Aspergillus fumigatus*,
- (Lane 7): *Aspergillus terreus*,
- (Lane 8): *Trichophyton mentagrophytes*,
- (Lane 9): *Paecilomyces variolii*,
- (Lane 10): *Penicillium marneffeii*,
- (Lane 11): *Penicillium chrysogenum*,
- (Lane 12): Negative control

ผลจากขั้นตอนที่ 2

Primer F3 และ PM คงเหมือนเดิม (ดูรายละเอียดของ sequence จากผลในขั้นตอนที่ 1) Primer ข้างซ้าย ที่เพิ่มขึ้นมาคือ CPL1 ประกอบด้วย 20 base มี Tm 54°C และ มี sequence ดังนี้

5' ggAggTAgTgACAATAAATA 3'

โดย primer คู่ CPL1-PM เป็นส่วนที่อยู่ใน 18S rRNA gene ที่เมื่อใช้ amplified แล้วจะได้ product ขนาดประมาณ 253 bp. ส่วน primer คู่ F3-PM เป็นส่วนที่อยู่ใน 18S rRNA gene เช่นกันที่เมื่อใช้ amplified แล้วจะได้ product ขนาดประมาณ 333 bp. จากการใส่ primer 3 ข้างนี้ทำให้เกิดการแย่งกันจับของ primer โดยที่ F3 เป็น primer ข้างซ้าย PM เป็น primer ข้างขวา CPL1 เป็น primer ข้างซ้ายเช่นเดียวกับ F3 แต่มีตำแหน่งอยู่ระหว่าง F3 และ PM ดังนั้นจึงต้องมีการ titrate ปริมาณของ primer ผลการวิจัยพบว่า ปริมาณ primer ที่สมควรใช้ในแต่ละข้างคือ

F3	5 pmole/ Rx	
PM	25 pmole/ Rx	Rx หมายถึง reaction
CPL1	25 pmole/ Rx	

หลังจากที่ทดลอง condition ต่าง ๆ แล้วพบว่า condition ที่สามารถ amplified เพื่อวินิจฉัย *P. marsefelii* มี 2 profile ดังนี้

	denature	annealing	extension	จำนวนรอบ
profile ที่ 1	95°C 1 นาที	62°C 1 นาที	72°C 1 นาที	20 รอบ
profile ที่ 2	95°C 1 นาที	54°C 1 นาที	72°C 1 นาที	30 รอบ

ได้มีการ vary ปริมาณ Mg^{++} ตั้งแต่ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 , 3.5 mM พบว่า ปริมาณ Mg^{++} ที่ 2.0mM -3.0 mM จะเกิด reaction ดีที่สุด

sensitivity of detection limit คือ 10 pg โดยใช้ purified DNA (mold form) นอกจากนี้ยังได้ทำการหา sensitivity of detection limit (yeast form) โดยการใส่ yeast form ของเชื้อเข้าไปที่ dilution ต่างๆ พบว่า cell ปริมาณน้อยสุดที่ยังสามารถตรวจพบโดยวิธีนี้คือ 10^2 cell/ml การที่ทำวิธีนี้เพื่อเป็นการเลียนแบบสิ่งส่งตรวจ เพราะในสิ่งส่งตรวจเชื้อจะมีลักษณะเป็น yeast form ดังนั้นจึงต้องการรู้ว่าถ้าเป็นสิ่งส่งตรวจแล้วจำนวน cell ที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบได้จะเป็นเท่าใด

sensitivity และ specificity 100 % โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *P. marsefelii* 59 strains และเชื้ออื่นอีก 58 species (58 strains) ซึ่งคือเชื้อในรายชื่อที่เขียนไว้ในหน้า 10-11 และมีเพิ่มเติมจากเดิมเป็น bacteria ต่างๆ อีก 17 species (17 strains) ดังนี้

- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1. <i>Bacillus</i> sp. | 2. <i>Burkholderia cepacia</i> |
| 3. <i>Citrobacter freundii</i> | 4. <i>Enterobacter cloacae</i> |
| 5. <i>Haemophilus influenzae</i> | 6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| 7. <i>Mycobacterium bovis</i> | 8. <i>Mycobacterium gordonae</i> |
| 9. <i>Mycobacterium intracellulare</i> | 10. <i>Mycobacterium phlei</i> |
| 11. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 12. <i>Neisseria meningitidis</i> |
| 13. <i>Plesiomonas shigelloides</i> | 14. <i>Proteus vulgaris</i> |
| 15. <i>Salmonella typhimurium</i> | 16. <i>Serratia marcescens</i> |
| 17. <i>Staphylococcus aureus</i> | |

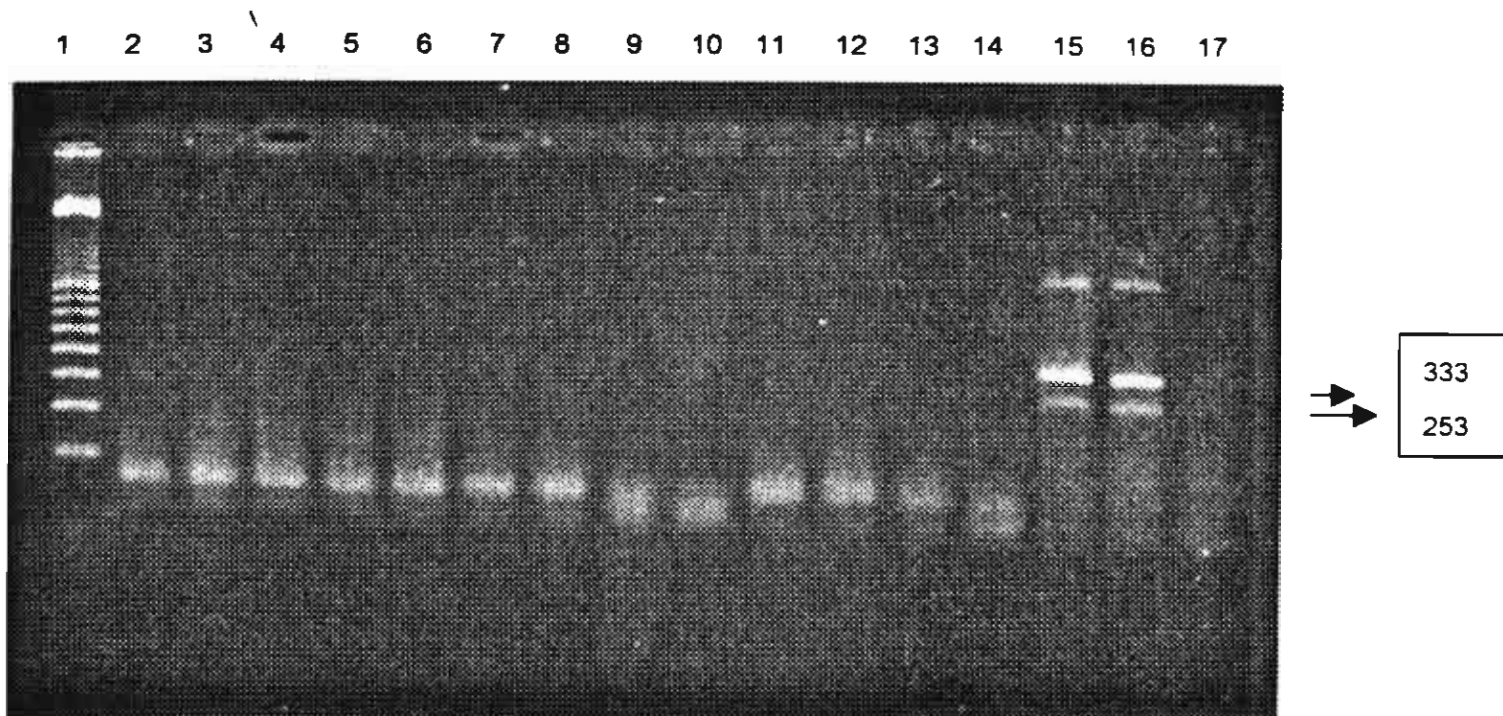


Figure 2. Amplification pattern of 13 representative fungal species and controls using CPL1, F3 and PM as primers in one tube seminested PCR.

(Lane 1): 100 bp ladder,

(Lane 2): *Apergillus flavus*

(Lane 3): *Epidermophyton floccosum*

(Lane 4): *Candida albicans*

(Lane 5): *Cryptococcus neoformans*

(Lane 6): *Aspergillus fumigatus*,

(Lane 7): *Aspergillus terreus*,

(Lane 8): *Trichophyton mentagrophytes*,

(Lane 9): *Paecilomyces variolii*,

(Lane 10): *Histoplasma capsulatum*

(Lane 11): *Pheoannellomyces werneckii*

(Lane 12): *Phialophora verrucosa*

(Lane 13): *Pythium insidiosum*

(Lane 14): *Cladosporium carrionii*

(Lane 15): *Penicillium mameeffei*, yeast form

(Lane 16): *Penicillium mameeffei* mold form

(Lane 17): Negative control

ผลการทดลองใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเชื้อของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อต่างๆรวมทั้งเชื้อ *Penicillium mameeffei* ด้วยจำนวน 20 ราย พบว่าให้ผลถูกต้อง 100 % โดยในขณะทำการ

ทดสอบใช้วิธี blind คือไม่ให้ผู้ทำรู้ผล culture ที่ได้ก่อนว่าเชื้อเหเหล่านั้นติดเชื้ออะไรบ้างเพื่อไม่ให้ผู้ที่ทำเกิด bias ผลก็คือจะพบ specific band เฉพาะกับผู้ที่ติดเชื้อ *Penicillium marneffei* เท่านั้น ซึ่งเป็นตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า one tube seminested PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูงน่าจะใช้ตรวจหาเชื้อ *Penicillium marneffei* จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง เช่น จากเลือดได้เป็นต้น ผู้วิจัยจึงได้เตรียมเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับใช้ได้กับ 50 tests (ดูรายละเอียดของชุดทดสอบได้จากภาคผนวก) ในชุดดังกล่าวประกอบด้วยชุดเตรียมดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ ชุดสำหรับทำ one tube seminested PCR และชุดสำหรับทำ gel electrophoresis ชุดการทดสอบนี้สามารถจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆได้โดยขณะจัดส่งควรจะมี reaction mixture, DNA control, DNA marker ไว้ในกระติกน้ำแข็ง

สำหรับผลการหาลำดับเบสของ *Pythium insidiosum* พบว่า sequence ที่ได้นี้มีความคล้ายคลึงกับ *Achlya bisexualis* และ *Phytophthora megasperma* มากโดยมี homology ถึงกว่า 90 % ซึ่งเชื้อเหล่านี้เดิมจัดอยู่ในกลุ่มราน้ำ แต่ปัจจุบันถูกแยกไปอยู่ใน Kingdom Chromista สำหรับ partial sequence ของ 18S rRNA เชื้อ *Pythium insidiosum* มี ลำดับเบสดังนี้

TTTGAGGTAG GACCATAATA ACAATGTTTG GCTCTTCGAG TCGGGCAATT
GGAATGAGAA CAATTTAAAT CCCTTATCGA GGATCAATTG GAGGGCAAGT
CTGGTNCCAC CACCCGCGTT AATTCCAGTT CCAATNGNGT ATATTAAAG
TTGTTGCAGT TAAAAAGTTT GTAGTTGGAT TTCTGTTTTG AGCGTCCGGC
CCGNTCTTTG AGTGTGTTGN TAGGATGTTT GAGACATTTT TTGTGAGGAT
GTCCTTCTGC CATTAAGTTG GTGGTTGGAT AGACTTGCAT CGTTTACTGT
GAAAAAATTA GAGTGTTTAA AGCAGGCGTT TGCTCATTGA ATACATTAGC
ATGGAATAAT AAGATACGAC CTTGGTGGTC TATTTTGTTG GTTTGCACAC
CAGGGTAATG ATTAATAGGG ACAGTTGGGG GTATTCATAT TCCAGCGTCA
GAGGTGAAAT TCTTGGATCG CTGGAAGATG AGCTTAGGCG AAAGCATTTA
CCAAGGATGT TTTCATTAAT CAAGAACGAA AGTTAGGGGA TCGAAGATGA
TTAGATACCA TCGTAGTCTT AACCATAAAC TATGCCGAC

บริเวณที่เป็นตัวหนาคือลำดับเบสที่แนะนำว่าควรนำมาใช้เป็น specific primer เพราะได้ทำ alingment ดูใน GenBank เทียบกับที่มีทั้งหมดพบว่าไม่ซ้ำกับเชื้อใดๆ

บทวิจารณ์ ปัญหาอุปสรรค และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเมื่อได้ผลงานของขั้นตอนที่ 1 แล้วนั้น ผู้วิจัยได้นำผลงานบางส่วนเสนอต่อการประชุมนานาชาติ (ดังแสดงไว้ในหน้า output) ขณะที่กำลังเตรียมเขียนต้นฉบับเพื่อทยอยลงตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาตินั้นเนื่องจากผู้วิจัยรู้สึกว่าการเขียนต้นฉบับที่จะตีพิมพ์วารสารนานาชาติเป็นเรื่องที่กว่าจะลงมือทำได้ ต้องใช้ความพยายามอย่างมากเพราะไม่มั่นใจในภาษาที่ใช้ จึงทำให้ทั้งเวลาไปจนกระทั่งมีงานของผู้อื่นทำคล้ายกันตีพิมพ์ผลงานออกมา(18) ถึงแม้ primer และวิธีการจะไม่เหมือนกันทีเดียวนัก แต่ตำแหน่งของ primer อยู่ใกล้เคียงกันมาก ทำให้ผู้วิจัยต้องดัดแปลงวิธีดังต่อไปนี้ในขั้นตอนที่ 2 หน้าวิธีการทดลอง หนึ่งงานที่ผู้วิจัยทำในขั้นตอนที่ 1 ซึ่งเป็นงานที่ผู้วิจัยได้ทำในส่วนของการ design primer และหา condition ก็สะดวกดีและใช้ได้ผลในทางปฏิบัติได้จริงโดยใช้กับสิ่งส่งตรวจหลายๆชนิดของผู้ป่วยเอชส์คนเดียวกัน ดังแสดงไว้ในภาคผนวก (*Penicillium marnieffei* mesenteric lymphitis in an HIV-infected female from Thailand in Germany) โดยที่ sputum culture ในครั้งแรก 3 ตัวอย่าง ไม่มีเชื้อขึ้นแต่ตรวจพบเชื้อ yeast form ได้จากกล้อง (ย้อม calcofluor white stain) และเมื่อทำ PCR (ใช้ F3-PM primer) ก็ให้ผลบวก ส่วน sputum ที่เก็บในเวลาถัดมาอีกอีก 3 สัปดาห์ภายหลังจากที่ได้รับยาแล้ว ทำ PCR โดยใช้ F3-PM primer ไม่สามารถ amplified ได้ คงเป็นเพราะเชื้อถูกทำลายไปบ้างแล้วและสิ่งส่งตรวจนั้นมี DNA น้อยกว่า 100 pg งานวิจัยในขั้นตอนที่ 2 ผู้วิจัยก็ได้ทดลองใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดของผู้ป่วยเอชส์ที่ติดเชื้อต่างๆรวมทั้งติดเชื้อ *Penicillium marnieffei* ด้วย โดยในขณะทำการทดสอบใช้วิธี blind คือไม่ให้ผู้ทำรู้ผล culture ที่ได้ก่อนว่าเลือดเหล่านั้นติดเชื้ออะไรบ้างเพื่อไม่ให้ผู้ที่ทำเกิด bias ผลก็จะพบ specific band เฉพาะกับผู้ติดเชื้อ *Penicillium marnieffei* เท่านั้น ผู้วิจัยจึงได้เสนอต้นแบบชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหา *Penicillium marnieffei* ในสิ่งส่งตรวจโดยตรง จำนวน 50 tests ต่อชุด (ดูรายละเอียดของชุดทดสอบได้จากภาคผนวก) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ วิธีนี้จำแนก species *Penicillium marnieffei* ที่เจริญช้าหรือสร้าง water soluble red pigment ได้น้อยกว่าปกติหรือไม่สร้างเลยจนต้องพิสูจน์ species ด้วยการ turn yeast form ซึ่งจะเสียเวลาเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน แต่โดยวิธีนี้จะทราบผลภายใน 1 วัน

ตามวัตถุประสงค์เดิมที่เขียนไว้ตอนขอทุนเดิมมี 3 ข้อ โดยวัตถุประสงค์ข้อที่ 2 จะพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Pythium insidiosum* โดยวิธี PCR ให้สามารถนำมาใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่มีศักยภาพเพียงพอ แต่ได้แจ้งขอเปลี่ยนแปลงในรายงานความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 18 เดือนไปแล้วเนื่องจากโรคนี้พบค่อนข้างน้อยแต่รุนแรงและเป็นเฉพาะในคนไทยจึงควรศึกษาละเอียดลงไปในแง่วิทยาศาสตร์พื้นฐานจึงได้เสนอว่าน่าจะศึกษาลำดับเบสของ 18S rRNA gene และ propose specific primer ที่ควรจะนำไปใช้เพื่อผู้ที่สนใจจะนำไปใช้วิจัยต่อเท่านั้นซึ่งผลงานอันนี้ได้ output ดังแสดงในข้อ 8 หน้า output แม้ว่าจะเป็น การค้นพบ sequence ใหม่ที่ยังไม่มีใครทำมาก่อน แต่เนื่องจากในปัจจุบันนี้แม้ว่าจะได้ sequence ใหม่แต่ไม่ได้ทำการทดลองอะไรเพิ่มก็ตีพิมพ์ไม่ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเพียงแต่ นำ sequence ไป deposit ไว้ใน

GenBank เท่านั้น ซึ่งงานอันนี้ผู้วิจัยก็อยากจะทำการ sequence ต่อให้เสร็จทั้ง gene เมื่อจะมีข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อไปเพราะ complete 18S rRNA gene sequence ของเขื่อนี้ยังไม่มีข้อมูลใน GenBank เลยคงมี เฉพาะที่ผู้วิจัย deposit ไว้ ซึ่งเป็นแค่ partial sequence ของ 18S rRNA นี้เท่านั้นผู้วิจัยจึงได้เขียนไว้ในหน้าบทคัดย่อหัวข้อ further implication ว่าผู้วิจัยอยากทำเรื่องนี้โดยไม่ของบประมาณเพิ่มเพราะช่วงที่เริ่มทำวิจัยใหม่ ๆ เป็นช่วงเริ่มของเศรษฐกิจตกต่ำในประเทศไทยค่าเงินผันผวนมาก และสารเคมีหลายชนิดต้องสั่งจากต่างประเทศและขึ้นราคามาก ผู้วิจัยจึงยังไม่กล้าสั่งซื้อของ ประกอบกับ นักวิเคราะห์ทางการเงินหลายท่านในขณะนั้นพูดว่า หลังเดือนกุมภาพันธ์ 2541 ไปแล้ว ค่าเงินบาทอาจลงมาอยู่ในสถานะภาพที่ควรจะเป็นจริง ซึ่งก็รออยู่แต่ในทางปฏิบัติสามารถกระทำได้โดยขอยืมสารเคมีหลาย ๆ อย่างจากผู้ทำวิจัยโครงการอื่น ๆ ซึ่งใช้สารเคมีคล้าย ๆ กันมาใช้ก่อน โดยเฉพาะจากนักวิจัยที่ปรึกษาเมื่อคิดว่าสถานการณ์เงินบาทค่อนข้างคงตัวก็จะสืบราคาใหม่อีกทีเพื่อจัดซื้อและคืนแก่ผู้ทำวิจัยโครงการอื่นที่ได้ขอยืมสารเคมีมาแต่ปรากฏว่าค่าเงินบาทก็ยังคงอ่อนตัวลงทุกวัน ๆ สารเคมีก็มีแต่จะแพงขึ้นกว่าเดิมอีก แต่กลับได้รับน้ำใจ และความช่วยเหลือ เอื้อเฟื้อเพิ่มขึ้นอย่างดีมากจากเพื่อน ๆ นักวิจัย โครงการอื่น ๆ และนักวิจัยที่ปรึกษาเพราะท่านเหล่านั้นบอกว่าไม่ต้องซื้อมาคืน ซึ่งถ้าคิดเป็นมูลค่าแล้วเงินวิจัยคงจะไม่พอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เงินน้อยมาก เพราะไปเอาสารเคมีของคนอื่นมาใช้แล้วไม่ต้องซื้อคืน เงินวิจัยจึงเหลือกินสกว. ผู้วิจัยเคยพบว่านักวิจัยบางท่านบอกรว่าอย่าให้เงินเหลือให้รีบ ๆ ใช้ให้หมดซื้ออะไรไปก่อน ผู้วิจัยรู้สึกว่ถ้าไม่จำเป็นทำไมจะต้องไปปรับใช้เงินภาษีของเราเอง แต่ผู้วิจัยยังอยากทำงานวิจัยต่อตั้งได้กล่าวในตอนต้น ถ้าทางสกว. เห็นว่าสมควรทำต่อผู้วิจัยจะได้ไม่ต้องคืนเงินแต่ถ้าเห็นว่างานที่ทำไม่เกิดประโยชน์พอผู้วิจัยคงต้องไปเขียนขอทุนที่อื่นกว่าจะประกาศทุนกว่าจะได้ทำงานวิจัยต่อคงจะไม่ต่อเนื่อง ผู้วิจัยอยากให้สกว.เห็นประโยชน์ของการให้การสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง

หนังสืออ้างอิง

- (1) Imwidthaya P. Systemic fungal infections in Thailand. J Med Vet Mycol 1994; 32: 395-399
- (2) Parichatikanon P, Manonukul J, Chantarakul N. Systemic fungal infections from autopsy finding. Siriraj Hospital Gazette 1983; 35: 867-872
- (3) Denning DW. Epidemiology and pathogenesis of Systemic fungal infections in the immunocompromised host. J of Antimicrobial Chemotherapy 1991; 28 (suppl. B): 1-16
- (4) Perfect JR, Schell WA, Rinaldi MG. Uncommon invasive fungal pathogens in the acquired immunodeficiency syndrome. J Med Vet Mycol 1993; 31: 175-179
- (5) Patamasucon P. AIDS in Thailand. J Inf Dis Antimicrob Agent 1992; 9: 35-39
- (6) Chiewchanvit S, Mahanupab P, Hirunsri P, Vanittanakorn N. Cutaneous manifestations of disseminated *Penicillium marneffei* mycosis in five HIV-infected patients. Mycoses 1991; 31: 245-9
- (7) Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthammachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection in patients infected with HIV. Clin Inf Dis 1992; 14: 871-874
- (8) Supparatpinyo K, Uthammachai C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Clinical and microbiological features of *Penicillium marneffei* infections in AIDS patients in Thailand. In: Abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1993: Abstract 556
- (9) จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล, เกษแก้ว เพียรทวีชัย, อรุณลักษณ์ ลุฬิตานนท์, สุกัญญา ศรีกุลบุตร Incidence of systemic mycoses in Srinagarind Hospital, Khon-Kaen University (1992-1995) เสนอผลงานวิจัยด้วยวาจาในการประชุมวิชาการเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 20 โดยสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย 7-9 พฤษภาคม 2539 ณ โรงแรมกะรนวิลล่า ภูเก็ต มีส่วนร่วมในงานวิจัย 25%
- (10) Deng ZL, 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: 640-652
- (11) Wanachiwanawin W, Thianprasit M, Fucharoen S, Chaiprasert A, Sudasna Na Ayudhya N, Sirithanaratkul N, Piankijagum A. Fatal arteritis due

- to *Pythium insidiosum* infection in patients with thalassemia. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 296-298.
- (12) Chetchotisakd P, Pairojkul C, *et al.* Human pythiosis in Srinagarind hospital. One year's experience. J Med Assoc Thai 1992; 75(4): 248-254.
 - (13) Sathapatayavongs O, Leelachaikul P, *et al.* Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. J Infect Dis. 1989; 159: 274-280.
 - (14) Buckley HR, Richardson MD, Evans EGV, Wheat LJ. Immunodiagnosis of invasive fungal infection. J Med Vet Mycol 1992;30: Suppl 1:249-260.
 - (15) Sekyhorn AS, Li JSK, Garg AK. *Penicilliosis marneffei* : Serological and exoantigen studies. Mycopathologia 1982 ; 77: 51-57.
 - (16) LoBuglio KF, Taglor JW. Phylogeny and PCR identification of human pathogen fungus *Penicillium marneffei*. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 85-89.
 - (17) Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. J Med Vet Mycol 1995 ; 33 : 319-325.
 - (18) Vanittanakom N, Merz WG, Sittisombut N, Khamwan C, Nelson KE, Sirisanthana T. Specific identification of *Penicillium marneffei* by a polymerase chain reaction/hybridization technique. Medical Mycology 1998 ; 36 : 169-175.
 - (19) Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Cascio GL, Fadda G. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-Restriction Enzyme Analysis J of Clin Microbiol 1997 ; 35 : 667-672.
 - (20) Bowman BH. A model PCR/Probe system for the identification of fungal pathogens. In : Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds) Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications. Washington DC : American Society for Microbiology 1993 : 432-435.
 - (21) นงนุช วณิตยชนากม. โรคติดเชื้อราฉวยโอกาส. ใน : วิทยาเชื้อราการแพทย์. เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2540 หน้า 107-114.
 - (22) Capponi M, Segretain G. *Penicillium* de *Rhizomys sinensis*. Bull Soc Pathol Exot 1956; 49:418-421.
 - (23) Disalvo AF, Fickling AM, Ajello L. Infection caused by *Penicillium marneffei*: Description of first natural infection in man. Am J Clin Pathol 1973;60:259-263.

- (24) Segretain G, *Penicillium marneffei* N. sp., Agent d'une mycose du systeme reticulo-endothelial. *Mycopathologia Mycologia Applicata*.1959;11 : 327-353.
- (25) Jayanetra P, Nitiyanant P, Ajello L, Padhye AA, Lolekha A, Atichartakarn V, Vathesatogit P, Sathaphatayarongs B, Prajaktam R. *Penicillosis marneffei* in Thailand: report of five human cases. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 637-644.
- (26) Worthman PD. Infection with *Penicillium marneffei*. *Int J Dermatol* 1996 ; 35 : 393-399.
- (27) Duong TA. Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen : review of 155 reported cases. *Clin Infect Dis* 1996 ; 23 : 125-130.
- (28) Ungpakorn R. *Penicillium marneffei* part of sountheast asian AIDS. *JAMA* 1996; 276 : 86-87.
- (29) Hilmarsdottir I. Disseminated *Penicillium marneffei* infection associated with human immunodeficiency virus : a report of two cases and a review of 35 published cases. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993 ; 6 : 466-471.
- (30) Lobuglio FK , Taylor WJ. Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus *Penicillium marneffei*. *J Clin Microbiol* 1995 ; 3 : 85-89.
- (31) Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sriburee P, Vanittanakom P, Khanjanasthit P. Efficiency of the floatation method in the isolation of *Penicillium marneffei* from seeded soil. *J Med Vet Mycol* 1995 ; 33 : 271-273.
- (32) สมณีย์ ศุภรุ่งเรือง. เชื้อราก่อโรคและโรคเชื้อรา. กรุงเทพฯ : สารมวลชน, 2529 หน้า 182-199.
- (33) Massimo C, Roverselli A, Boclaert JR, et al. Development of an in vitro macrophage system to assess *Penicillium marneffei* growth and susceptibility to nitric oxide. *Infect Immune* 1997 ; 65 : 279-284.
- (34) Kaufman L, Standard PG, Jalibert M, et al. Diagnostic antigenemia test for *Penicillium marneffei*. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 : 2503-2505.
- (35) Vanittanakom N, Cooper CR, Chariyalertsak S, Youngchim S, Nelson KE, Sirisanthana T. Restriction Endonuclease Analysis of *Penicillium marneffei*. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 : 1834-6.
- (36) Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Lea and Febiger. Pennsylvania. 1992.

- (37) Prariyachatigul C, Chaiprasert A, Meevootisom V, Pattanakitsakul S. Assessment of a PCR technique for the detection and identification of *Cryptococcus neoformans* .J Med Vet Mycol 1996 ; 34 : 251-8
- (38) Kaufman L, Standard PG, Anderson SA, Talbert M, Swisher BL. Development of specific fluorescent-antibody test for tissue form of *P. marneffe*. J Clin Microbiol. 1995;33:2136-2168.

output

1. International Journal ที่ได้รับการตีพิมพ์

Rimek D, Zimmermann T, Hartmann M, Prariyachatigul C, Kappe R.
Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in
Germany. *Mycoses* 1999;42(Suppl. 2) 25-28 .

Prariyachatigul C , Chaiprasert A, Jeankajon K, Srimuang S, KappeR,
Hamal P. One tube seminested PCR identification of human pathogenic fungus
Penicillium marneffei . *J Med Vet Mycol* In publication process.

2. วารสารวิชาการในประเทศ

จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล, เกษแก้ว เพียรทวีชัย, ศรีวิไล วโรภาสตระกูล, ธวัช
ชัย แจ่มนาค, วิเชษฐ์ รัตนพงศ์เสน, ผลการตรวจ India ink ด้วยกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ
Cryptococcus neoformans ที่ได้รับยา Amphotericin B ในหลอดทดลอง วารสารเทคนิคการ
แพทย์และกายภาพบำบัด 2541;10(1):21-27

(งานวิจัยนี้แม้ไม่ได้เกี่ยวข้องกับที่เขียนขอทุนแต่ในทางปฏิบัติผู้วิจัยไม่ได้ขอทุน
วิจัยที่ใดเลยแต่มีนศ.ระดับปริญญาตรีที่ต้องทำภาคนิพนธ์กับผู้วิจัยเพราะที่คณะต้นสังกัดของผู้
วิจัยมีนศ. ระดับปริญญาตรีมากดังนั้นอาจารย์ทุกคนต้องรับนศ. ทำภาคนิพนธ์ด้วยแต่มีงบ
ประมาณให้เพียงเรื่องละ 1500 บาทเท่านั้น ผู้วิจัยซึ่งทำงานทางด้านเชื้อก่อโรค systemic
mycoses มาโดยตลอดจึงได้เจียดเงินบางส่วนมาใช้ในการงานของนศ.บ้าง)

3. การเสนอผลงานด้วย poster ในการประชุมระหว่างประเทศ

. Pariyachatigul C, Hamal P, Kappe R. Specific primer for detection of
Penicillium marneffei Poster presentation at the 1st Czecho-Slovak Interdisciplinary
Conference on Medical Mycology. Pardubice, Czech Republic. 30th of October 1997 to
1st of November 1997

4. การเสนอผลงานด้วย poster ในการประชุมภายในประเทศ

วิโรจน์ หมั่นหาญ, โสภณัฐ คุณอยู่, จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล, เกษแก้ว เพียร
ทวีชัย, อรุณลักษณ์ ลุติตานนท์ , อังคณา ฉายประเสริฐ การเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอของ
เชื้อ *Penicillium marneffei* ในงานสัปดาห์นิทรรศการผลงานวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น เนื่องในวันสถาปนาคณะเทคนิคการแพทย์ครบรอบ 22 ปี วันที่ 19-25
กรกฎาคม 2543 ณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

Prariyachatigul C, Jeankajohn K , Chaiprasert A, Chutean S, Sanpechuda S, Sribenjalux P. Specific detection of *Penicillium marneffe* by PCR technique ในงานสัปดาห์นิทรรศการผลงานวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เนื่องในวันสถาปนาคณะเทคนิคการแพทย์ครบรอบ 22 ปี วันที่ 19-25 กรกฎาคม 2543 ณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

7. การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่ทำการวิจัย

ได้ติดต่อกับ Pro. Dr. H-G Sonntag, Pro. Dr. Rhinhard Kappe แห่ง Hygiene Institute เมือง Heidelberg ประเทศเยอรมัน และ Dr. Petr Hamal แห่ง Palacky University เมือง Olomouce ประเทศสาธารณรัฐเชค เกี่ยวกับความร่วมมือกันในงานที่จะทำต่อไป ซึ่งท่านทั้ง 3 นี้ทำงานเกี่ยวกับ medical fungi และยินดีให้ความร่วมมือทางด้านวิชาการ

8. deposit sequence ไว้ใน GenBank

จากการที่ได้ sequence ของ 18S rRNA แล้วนั้นจึงนำไป deposit ไว้ใน Gen Bank ซึ่งมี accession No. คือ AF 221847 ซึ่งได้ copy จาก internet นำมาแสดงให้ทราบในภาคผนวก ในปัจจุบัน 18S rRNA sequence ของ *Pythium insidiosum* มีเพียง sequence ของผู้วิจัยเท่านั้นนับเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่มีใคร ศึกษาและรายงาน มาก่อน

ภาคผนวก

LOCUS AF221847 589 bp DNA PLN 14-FEB-2000

DEFINITION *Pythium insidiosum* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AF221847

VERSION AF221847.1 GI:6970071

KEYWORDS .

SOURCE *Pythium insidiosum*.

ORGANISM *Pythium insidiosum*
Eukaryota; stramenopiles; Oomycetes; Pythiales; Pythiaceae;
Pythium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 589)

AUTHORS Prariyachatigul,C., Chaiprasert,A. and Pattanakitsakul,S.

TITLE 18S rRNA gene of *Pythium insidiosum*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 589)

AUTHORS Prariyachatigul,C., Chaiprasert,A. and Pattanakitsakul,S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-JAN-2000) Microbiology, Khon Kaen University,
Meetapab, KhonKaen, 043 40002, Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..589
/organism="*Pythium insidiosum*"
/strain="MCC-10201"
/db_xref="taxon:114742"
/map="between v3 and v5"

rRNA <1..>589
/product="18S ribosomal RNA"

BASE COUNT 161 a 89 c 148 g 186 t 5 others

ORIGIN

1 ttgaggttag gaccataata acaatgtttg gctcttcgag tcgggcaatt ggaatgagaa
61 caatttaa at cccttatcga ggatcaattg gagggcaagt ctggtgccac caccgcgtt
121 aattccagtt ccaatngngt atattaaaag ttgtgcagt taaaaagttt gtagttggat
181 ttctgttttg agcgtccggc ccgntctttg agtgtgtlgn taggatgttt gagacatttt
241 ttgtgaggat gtccctctgc cattaagttg gtggttggat agacttgcac cgtttactgt

301 gaaaaaatta gagtgtttaa agcaggcgtt tgctcattga atacattagc atggaataat
361 aagatacgac ctgggtggtc tatttgttg gttgcacac cagggtaatg attaataagg
421 acagttgggg gtattcatat tccagcgtca gaggtgaaat tctggatcg ctggaagatg
481 agcttaggcg aaagcattta ccaaggatgt ttcatlaat caagaacgaa agttagggga
541 tcgaagatga ttagatacca tcgtagtctt aaccataaac tatgccgac



Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany

Disseminierte *Penicillium marneffei*-Infektion bei einer HIV-infizierten Thailänderin in Deutschland

Dagmar Rimek¹, T. Zimmermann², M. Hartmann³, C. Prariyachatigul³ and R. Kappe¹

Key words. *Penicillium marneffei*, HIV, mesenteric lymphadenitis, PCR, Thai.

Schlüsselwörter. *Penicillium marneffei*, HIV, Lymphadenitis, Mesenteriallymphadenitis, PCR, Thai.

Summary. We report the case of a 33 year old Thai female, who was married in Germany for eight years and used to travel to Thailand every year for several weeks. She presented with abdominal and back pain, prolonged fever, generalized lymphadenopathy, and a recent history of oral thrush. She was diagnosed HIV positive with initial CD4 counts of 18/ μ l and an HI virus load of 59,000 copies/ml. Antiviral therapy was installed with zidovudin, lamivudin, and efavirenz. Abdominal CT scans revealed greatly enlarged abdominal lymphnodes. Fine needle aspirates of cervical and retroperitoneal lymphnodes, sputum samples, blood samples, and a bone marrow biopsy were microscopically positive for *Penicillium marneffei* and grew *P. marneffei*. The isolates were sensitive to amphotericin B, flucytosine, itraconazole, and fluconazole. Both universal and specific fungal polymerase chain reaction assays were positive in various samples. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen, which is known to crossreact with *P. marneffei*, was elevated and subsequently used for monitoring of therapy. With antifungal treatment (intravenous amphotericin B 0.6 mg/kg/d for two weeks, oral itraconazole 400 mg/d for 10 weeks and 200 mg/d as maintenance therapy), the fever declined in 6 days, the size of the enlarged lymphnodes gradually decreased in the CT scans, and the initial abdominal and back pain vanished.

Zusammenfassung. Es wird über eine 33jährige Thailänderin berichtet, seit 8 Jahren in Deutschland verheiratet, die jedes Jahr mehrere Wochen nach Thailand reiste. Sie stellte sich vor mit Unterleibs- und Rückenschmerzen, Dauerfieber, generalisierter Lymphadenopathie und vor kurzem aufgetretenem Mundsoor. Sie erwies sich als HIV-positiv mit initialen CD4-Werten von 18/ μ l und einer HI-Virus-Belastung von 59 000 Kopien/ml. Eine antivirale Therapie mit Zidovudin, Lamivudin und Efavirenz wurde eingeleitet. Abdominal-CTs zeigten erheblich vergrößerte abdominale Lymphknoten. Feinnadelaspirate zervikaler und retroperitonealer Lymphknoten, Sputumproben, Blutproben und ein Knochenmarkbiopsat waren mikroskopisch und kulturell positiv für *Penicillium marneffei*. Die Isolate waren empfindlich für Amphotericin B, Flucytosin, Itraconazol und Fluconazol. Sowohl universelle wie pilzspezifische PCRs waren in verschiedenen Proben positiv. *Aspergillus*-Galaktomannan-Antigen, das bekanntlich mit *P. marneffei* kreuzreagiert, war im Serum erhöht und wurde für das Therapiemonitoring benutzt. Unter antimykotischer Therapie (Amphotericin B 0,6 mg/kg/d intravenös zwei Wochen, orales Itraconazol 400 mg/d 10 Wochen und 20 mg/d als Erhaltungstherapie) klang das Fieber innerhalb von sechs Tagen ab, normalisierten sich schrittweise die vergrößerten Lymphknoten in den CTs und verschwanden die Unterleibs- und Rückenschmerzen.

¹ Hygiene-Institut and

² Hautklinik der Universität, Heidelberg, Germany, and

³ Department of Microbiology, Khon Kaen University, Thailand.

Correspondence: Dr. Dagmar Rimek, Hygiene-Institut, Im Neuenheimer Feld 324, D-69120 Heidelberg, Germany.

Phone: +49-6221-567816. Fax: +49-6221-564343.

E-mail: dagmar_rimek@med.uni-heidelberg.de

Background

Disseminated *Penicillium marneffei* infection is one of the common opportunistic infections seen in HIV-infected patients from Southeast Asia. *P. marneffei* is a facultatively intracellular pathogen and the only dimorphic species of the genus *Penicillium* [1, 2]. It occurs in bamboo rats

throughout Southeast Asia [3–5]. The incidence of this fungal infection has increased markedly during the past few years, paralleling the incidence of HIV infection [6–10]. Several imported cases of systemic penicilliosis have been observed in Europe in HIV patients during the past 10 years [11–13].

Case report

We report the case of a 33 year old Thai female, who was married in Germany for eight years and used to travel to Thailand every year for several weeks, the last time in February 1998.

In September 1998 she presented with abdominal and back pain, prolonged fever, night sweat, generalized lymphadenopathy, and a recent history of oral thrush. She was diagnosed HIV positive. The patient's initial CD4 counts were $18/\mu\text{l}$, with an HI virus load of 59,000 copies/ml blood. Abdominal CT scans revealed greatly enlarged abdominal lymphnodes (Fig. 1).

Laboratory findings

The cytological examination of Giemsa and PAS stained smears, which were prepared from a fine needle aspirate of a cervical lymphnode, revealed masses of small intra- and extracellular yeast like organisms, some of which were sausage-shaped and showed prominent cross walls. Three initial sputum samples were microscopically positive with calcofluorwhite stain for *P. marneffei* (Fig. 2). Two blood samples, a bone marrow biopsy, a fine needle aspirate of a retroperitoneal lymphnode, and a sputum sample collected 3 weeks later, all grew *P. marneffei* in pure culture (Fig. 3). The isolate was sensitive in vitro to amphotericin B, flucytosine, itraconazole and fluconazole (agar diffusion tests and Etests, respectively). Serum *Aspergillus* galactomannan antigen, which is known



Figure 1. Abdominal CT scan revealing greatly enlarged abdominal lymphnodes.

to crossreact with *P. marneffei*, was elevated, scoring 3.8 to 5.7 (normal score < 1.0 , Platelia® *Aspergillus* Ag enzyme immuno assay, Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg i. Br., Germany). This test was subsequently used for monitoring of therapy.

Polymerase chain reaction assays

A universal fungal polymerase chain reaction assay [14] was positive in 4 sputum samples, in the aspirate from the retroperitoneal lymphnode, and in a blood sample. Another self-designed specific PCR assay for *P. marneffei* [15] was positive in the first 3 sputum samples and in the retroperitoneal lymphnode (Fig. 4).

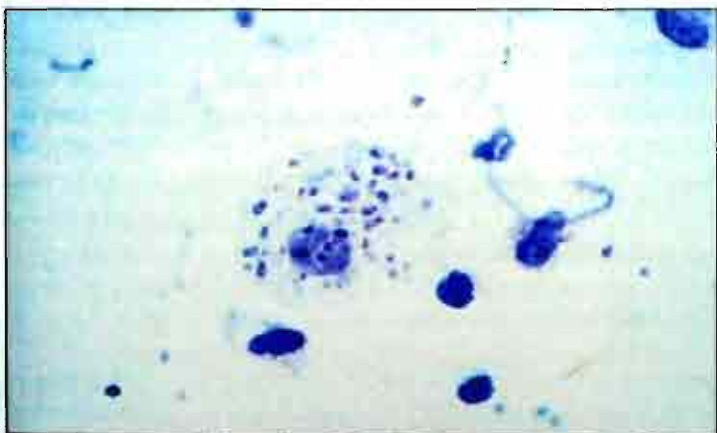
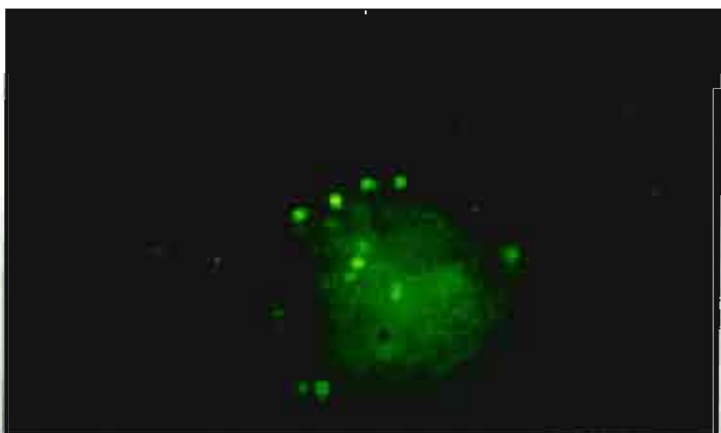


Figure 2. Giemsa (A) and calcofluor white (B) stained smears, which were prepared from a fine needle aspirate of a cervical lymphnode and a sputum sample respectively, reveal masses of small intra- and extracellular yeast-like organisms, some of which are sausage-shaped and show prominent cross walls. Note the intracellular location of the yeast like organisms in the Giemsa stain (A).



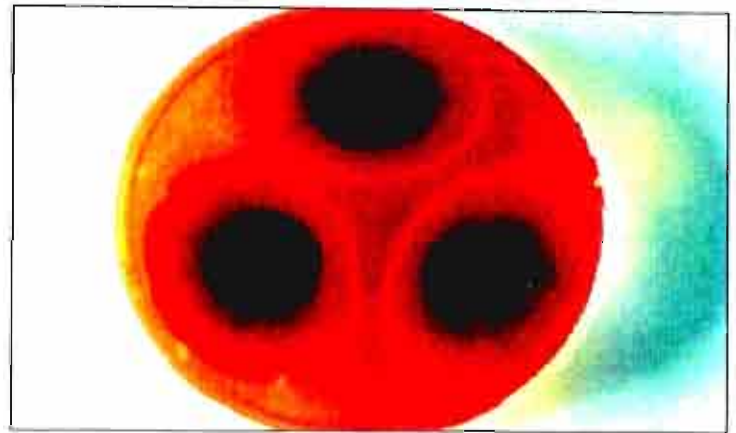
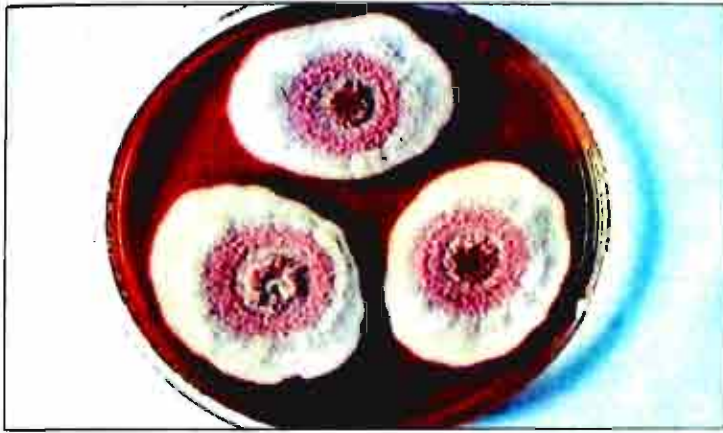


Figure 3. Surface (A) and reverse (B) of a subculture of *Penicillium marneffei* on Sabouraud glucose (2%) agar in a 90 mm petri dish after 29 days at 28 °C. The colonies are flat, sparse, mostly submerged, with white aerial mycelium, and a distinct red exudate. A wet mount prepared from the margin of a colony (C) reveals the characteristic micro-morphology of *P. marneffei*: Smooth conidiophores bear terminal verticils of 3 to 5 metulae, and each metula produces 4 to 7 ampulliform phialides, which bear smooth-walled ellipsoidal conidia in short, disordered chains.

10 weeks. The patient received a secondary prophylaxis with oral itraconazole (200 mg/d) as maintenance therapy to prevent relapse of this opportunistic infection [16, 17]. With the antifungal treatment, the fever declined in 6 days, the size of the enlarged lymphnodes gradually decreased in the CT scans, and the initial abdominal and back pain vanished. Circulating fungal antigen decreased below the normal score 2 months after starting antifungal therapy. Ten months after the initial infection, there was constantly no detectable HI virus load, no relapse of penicilliosis, and the patient continued to feel well.

Discussion and conclusions

P. marneffei is predominantly an Asian pathogen, but as a result of international travel, there is a worldwide need for an increased awareness of penicilliosis. Acute mesenteric lymphadenitis can be one of the less common manifestations caused by *P. marneffei* in HIV-infected patients. Therefore, mesenteric lymphadenitis should be considered in HIV-infected persons, who present with prolonged fever and abdominal pain. This is the first reported case of a disseminated *P. marneffei* infection with a manifestation of a mesenteric lymphadenitis in Germany.

Acknowledgements

C. P. was supported by the Thailand Research Fund (TRF) for a fellowship at the Hygiene Institute of the University of Heidelberg in 1997. We thank Sabine Zäuner and Heike Haag for their excellent help with the PCR assays.

Treatment and outcome

The diagnostic measures taken and the therapeutic monitoring are summarized in Fig. 5.

Antiviral therapy was installed with zidovudin, lamivudin and efavirenz. After 2 months of therapy the HI virus load fell constantly below the detection limit of 50 copies/ml blood. The CD4 count, however, remained below 50 cells/ μ l.

Antifungal treatment was started with intravenous amphotericin B (0.6 mg/kg/day) for two weeks, followed by 400 mg/d dosage of oral itraconazole for another

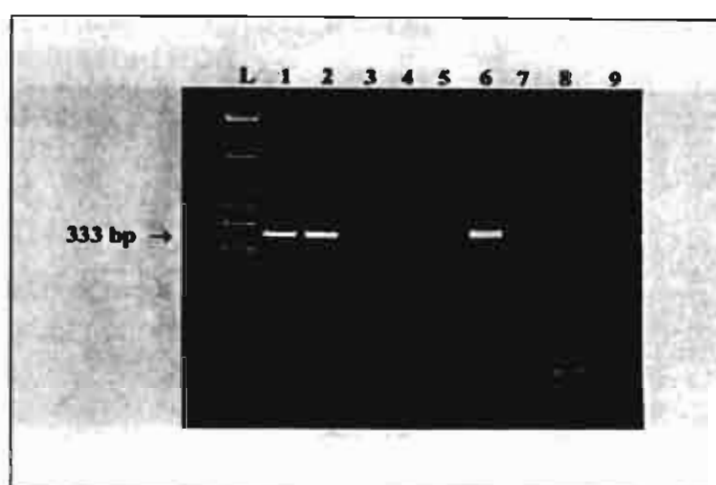
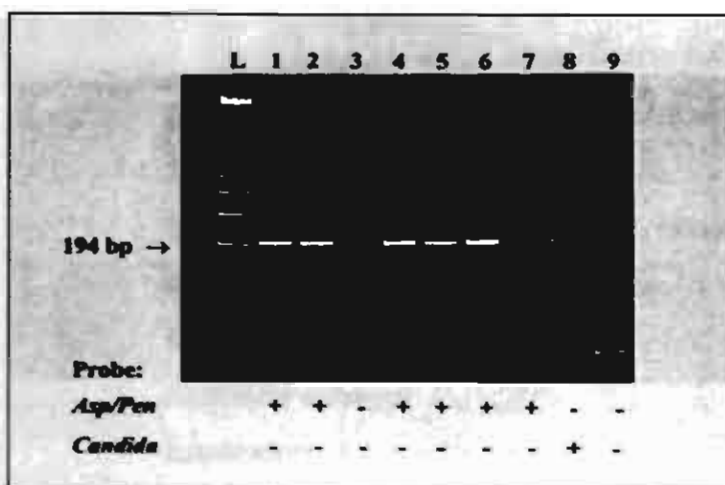


Figure 4. Detection of amplicons generated by a panfungal (A) and a *Penicillium marneffii* specific (B) PCR assay from clinical samples of the patient and controls by ethidium bromide stained polyacrylamide gel and by hybridization with a specific probe for *Aspergillus/Penicillium* using a DNA enzyme immuno assay (DEIA). Lanes: L, 100 bp ladder; 1, sputum 23 Oct 98; 2, retroperitoneal lymphnode 30 Oct 98; 3, bone marrow 30 Oct 98; 4, sputum 16 Nov 98; 5, blood 18 Nov 98; 6, *P. marneffii* (patient's isolate); 7, 100 pg of *Aspergillus fumigatus* DNA; 8, 100 pg *Candida albicans* DNA; 9, negative control.

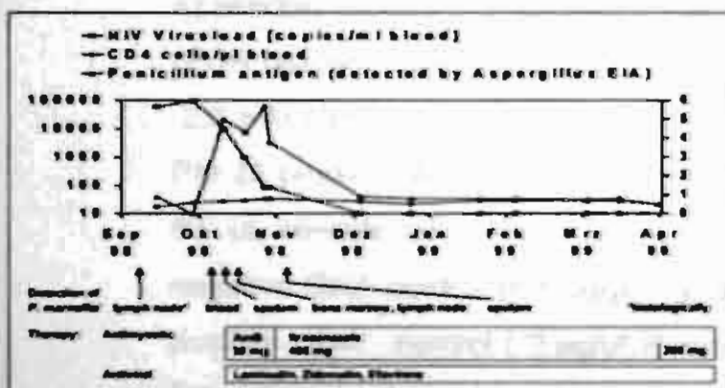


Figure 5. Course of laboratory parameters under antiretroviral and antifungal chemotherapy. Both HI virus load and *Penicillium* antigen dropped below the level of detection after two months of treatment.

References

- Segretain, G. (1959) Description d'une nouvelle espèce de *Penicillium*: *Penicillium marneffii* n. sp. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 75, 412-416.
- Cooper, C. R., McGinnis, M. R. (1997) Pathology of *Penicillium marneffii*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121, 798-804.
- Capponi, M., Sureau, P., Segretain, G. (1956) Penicilliose de *Rhizomys sinensis*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 49, 418-421.
- Deng, Z. L., Yun, M., Ajello, L. (1986) Human penicilliosis marneffii and its relation to the bamboo rat (*Rhizomys pruinosus*). *J. Med. Vet. Mycol.* 24, 383-389.
- Chariyalertsak, S., Vanittanakom, P., Nelson, K. E., Sirisanthana, T., Vanittanakom, N. (1996) *Rhizomys sumatrensis* and *Cannomys badius*, new natural animal hosts of *Penicillium marneffii*. *J. Med. Vet. Mycol.* 34, 105-110.
- Deng, Z., Ribas, J. L., Gibson, D. W., Connor, D. H. (1988) Infections caused by *Penicillium marneffii* in China and Southeast Asia: review of eighteen published cases and report of four more chinese cases. *Rev. Infect. Dis.* 10, 640-652.
- Drouhet, E. (1993) Penicilliosis due to *Penicillium marneffii*: a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia: review of 44 cases reported in HIV infected patients during the last 5 years compared to 44 cases of non AIDS patients reported over 20 years. *J. Mycol. Med.* 4, 195-224.
- Supparatpinyo, K., Khamwan, C., Baosoung, V., Nelson, K. E., Sirisanthana, T. (1994) Disseminated *Penicillium marneffii* infection in Southeast Asia. *Lancet* 344, 110-113.
- Duong, T. A. (1996) Infection due to *Penicillium marneffii*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* 23, 125-130.
- Singh, P. N., Ranjana, K., Singh, Y. L., Singh, K. P., Sharma, S. S., Kulachandra, M., Nabakumar, Y., Chakrabarti, A., Padhye, A. A., Kaufman, L., Ajello, L. (1999) Indigenous disseminated *Penicillium marneffii* infection in the state of Manipur, India: Report of four autochthonous cases. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2699-2702.
- Kronauer, C. M., Schär, G., Barben, M., Böhler, H. (1993) Die HIV-assoziierte *Penicillium-marneffii*-Infektion. *Schweiz. Med. Woch.* 123, 385-390.
- Hilmardottir, I., Coutellier, A., Elbaz, J., Klein, J. M., Datry, A., Gueho, E., Herson, S. (1994) A French case of laboratory-acquired disseminated *Penicillium marneffii* infection in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 19, 357-358.
- Sobotka, I., Albrecht, H., Mack, D., Stellbrink, H.-J., van Lunzen, J., Tintelnot, K., Laufs, R. (1996) Systemic *Penicillium marneffii* infection in a German AIDS patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 256-259.
- Rimek, D., Garg, A. P., Kappe, R., Sonntag, H.-G. (1998) Fungal PCR-assay for the detection of invasive aspergillosis. *Mycoses* 41, (Suppl. 2), 65-68.
- Priyachatigul, C., Hamal, P., Kappe, R. (1997) Specific primer for detection of *Penicillium marneffii*. In Abstracts of the I. Crsko-Slovenakou Mezioborovu Konverenci Lekarske Mykologie, p 72, Pardubice, Czech Republic.
- Sirisanthana, T., Supparatpinyo, K., Perriens, J., Nelson, K. E. (1998) Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *Penicillium marneffii* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 26, 1107-1110.
- Supparatpinyo, K., Perriens, J., Nelson, K. E., Sirisanthana, T. (1998) A controlled trial of itraconazole to prevent relapse of *Penicillium marneffii* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* 339, 1739-1743.

ชุดตรวจสอบสำเร็จเพื่อตรวจหา ดีเอ็นเอของเชื้อ *Penicillium marneffei*

โดยวิธี one tube seminested PCR

ชุดตรวจสอบนี้ใช้ได้กับ 50 tests ประกอบด้วย

1. ชุดเตรียม ดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ

lysis buffer (50 mM Tris pH 7.2, 50mM EDTA, 3% SDS)	100	ml
extraction buffer (10 mM mM Tris , 1 mM EDTA pH 8.0	80	ml
salt solution (5M NaCl)	5	ml
Absolute ethanol	40	ml
Eppendorf tube with lysing agent	50	tubes
Empty Eppendorf tube	50	tubes
Parafilm	60	ชิ้น

2. ชุด one tube seminested PCR

Eppendorf tubes (0.6 ml) with 45 µl PCR reaction mixture (PCR reaction mixture คือ 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL pH 8.4, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.001%gelatin, 200 µM dNTPs, F3 5 pmole, PM 25 pmole ,CPL1 25 pmol ,1 unit Taq polymerase, 50 µl, mineral oil)	50	tubes
negative DNA control (0.1 µg/µl human DNA)	10	µl
positive DNA control (2 pg/µl <i>Penicillium marneffei</i> DNA)	30	µl
Filter-tip	1	กล่อง

3. ชุด gel electrophoresis

Nusieve agarose ของละ 1 กรัม (ทำได้ 15 samples/ Mupid II well)	4	ซอง
50x electrophoretic buffer (2.0 M Tris-acetate, 0.05 M EDTA pH 8.3)	50	ml
DNA marker (Øx174 DNA <i>Hae</i> III 50 ng/µl)	25	µl
Gel-loading buffer (0.25% Bromphenol blue, 30%glycerol)	0.5	ml
1000x gel staining solution (0.5mg/ml Etidium bromide)	0.5	ml

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียม DNA จากสิ่งส่งตรวจ

เลือด(EDTA blood)

-ใส่เลือด 5 มล. และ lysis buffer 10 มล. นำไปปั่น 3500 รอบ 15 นาที ทิ้งส่วนบนเก็บตะกอนไว้ ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งไม่เห็นน้ำส่วนบนที่ hemolyse นำตะกอนที่ได้มาละลายใน extraction buffer 1 มล. แล้วถ่ายใส่ lysis tube (ถ้าตะกอนมีมากให้ใส่ extraction buffer 2 มล. แล้วถ่ายใส่ lysis tube 2 หลอดๆละ 1 มล.)

-*ตีส่วนผสมในหลอดให้เข้ากัน ด้วย vortex mixer นาน 1 นาที จากนั้นนำ lysis tube แช่ใน น้ำแข็งนาน 1 นาที ทำเช่นนี้สลับกันทั้งหมด 10 ครั้ง

-ปิดปากหลอดด้วยParafilm ต้มหลอดในน้ำเดือดนาน 10 นาที ดูดสารละลายที่ได้จากหลอดมาตกตะกอนด้วย 1/10 volume ของ salt solution ตามด้วย 2 volume ของ absolute ethanol เก็บไว้ที่ -20 °C นาน 30 นาที

-ปั่นที่ 12,000 รอบ 10 นาที ที่ 4 °C เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ปั่นอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง (ที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 °C) แล้วละลายตะกอนใน extraction buffer 5 µl เก็บไว้ที่ 4 °C หรือ -20 °C เพื่อนำมาใช้

สิ่งส่งตรวจประเภทสารน้ำอื่นๆ

-ปั่นสิ่งส่งตรวจที่ 3500 รอบ 5 นาที แล้วทิ้งส่วนบนเก็บตะกอนไว้ นำตะกอนที่ได้มาละลายใน extraction buffer 1 มล. แล้วถ่ายใส่ lysis tube (ถ้าตะกอนมีมากให้ใส่ extraction buffer 2 มล. แล้วถ่ายใส่ lysis tube 2 หลอดๆละ 1 มล.)แล้วทำเช่นเดียวกับสิ่งส่งตรวจจากเลือดตั้งแต่*จนเสร็จ

2. การทำ one tube seminested PCR

-เติม 5 µl ของ DNA ที่เตรียมได้จากสิ่งส่งตรวจลงในหลอด PCR reaction mixture (ใช้ filter tip ที่ให้มา)

-นำหลอดเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 95°C นาน 5 นาที และทำตามขั้นตอนดังนี้

95°C 1 นาที	62°C 1 นาที	72°C 1 นาที	20 รอบ
ตามด้วย			

95°C 1 นาที	54°C 1 นาที	72°C 1 นาที	30 รอบ
-------------	-------------	-------------	--------

-เก็บหลอด PCR product ที่ได้ ไว้ที่ -20 หรือ 4° C เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ DNA โดย gel electrophoresis ต่อไป

-ในการทำ ทุกครั้งต้องมีหลอด control ควมคุมไปด้วยเสมอในที่นี้จะใช้ 10 pg ของ *P.marneffei* DNA เป็น positive control, 0.5 µg ของ human DNA เป็น negative control

และหลอด reaction mixture ที่ไม่ได้เติม DNA เป็น reagent control (การดูดสารละลาย DNA และ PCR product ทุกครั้งให้ใช้ filter tip)

3. การตรวจวิเคราะห์แถบ DNA โดย gel electrophoresis

-เตรียม 4% Nusieve gel โดยตัม Nusieve agarose gel 1 กรัมในน้ำกลั่น 24.5 มล. ใน water bath จนละลายดี เติม 0.5 มล. ของ 50 x electrophoretic buffer ผสมให้เข้ากันแล้ว นำมาเทลงในถาดเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เจลแข็ง (ประมาณ 30 นาที)

-ผสม 6 μ l ของ PCR product กับ 3 μ l ของ gel loading buffer (PCR product : gel loading buffer = 2:1)

- dilute electrophoretic buffer ให้เป็น 1x เพื่อใช้ในการ run gel electrophoresis ที่ 50 volts 1 ชั่วโมง หรือ 100 volts 30 นาที (ในเครื่อง ขนาดเล็ก เช่น Mupid 2)

-ย้อมเจลที่ไตโดยแช่ใน 0.5 μ g/ml etidium bromide solution ประมาณ 10 นาที (ข้อควรระวัง : etidium bromide เป็นสารก่อกลายพันธุ์ ระวังอย่าให้ถูกผิวหนัง)

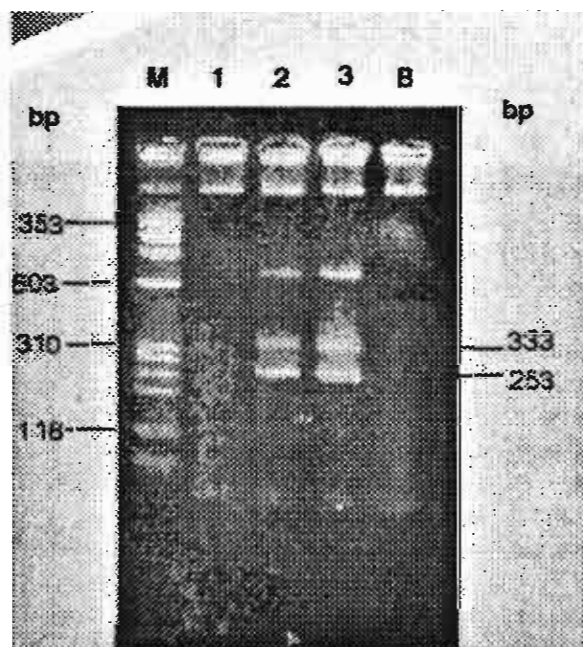
-ล้างเจลในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ระยะเวลา 10 นาที (เปลี่ยนน้ำใหม่)

-นำเจลมาตรวจดูแถบ DNA ที่ได้กับ standard DNA marker ϕ x174 *Hae*III (ข้อควรระวัง : เวลาดูควรใส่แว่นตาเพื่อป้องกันแสง UV ทำอันตรายดวงตา)

4. การอ่านผล

อ่านผล positive เมื่อเห็น DNA band ขนาด 333 bp และ 253 bp

อ่านผล negative เมื่อไม่เห็น DNA band ขนาด 333 bp และ 253 bp หรือไม่เห็น band ใดๆเลย



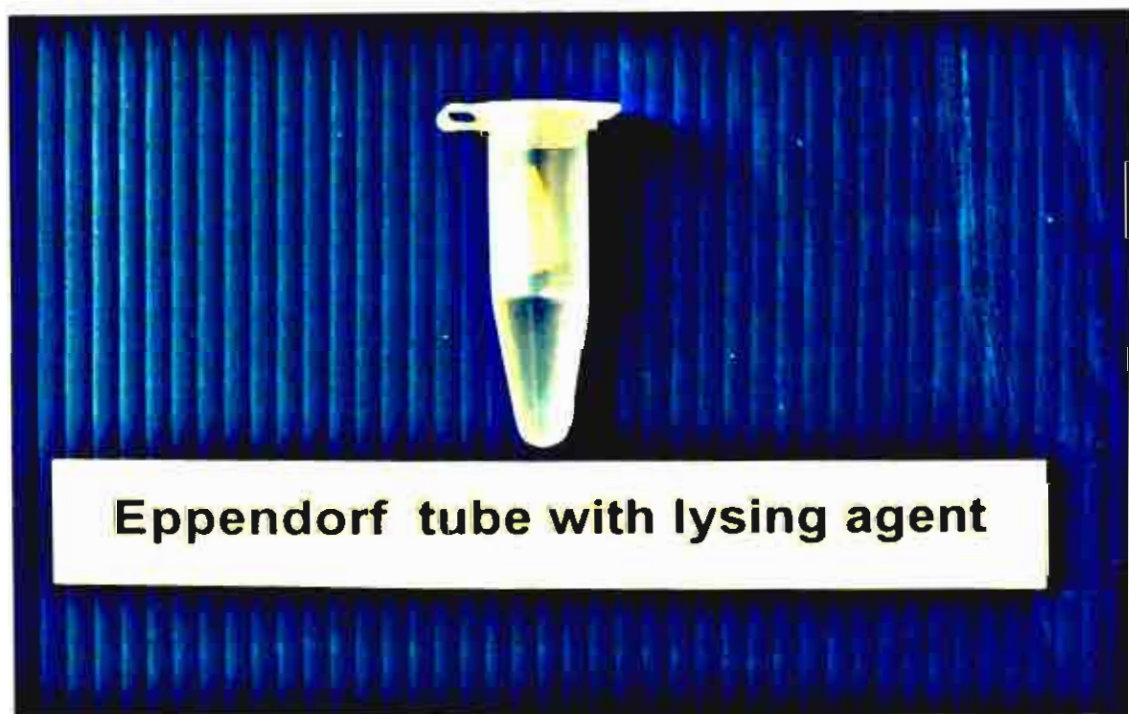
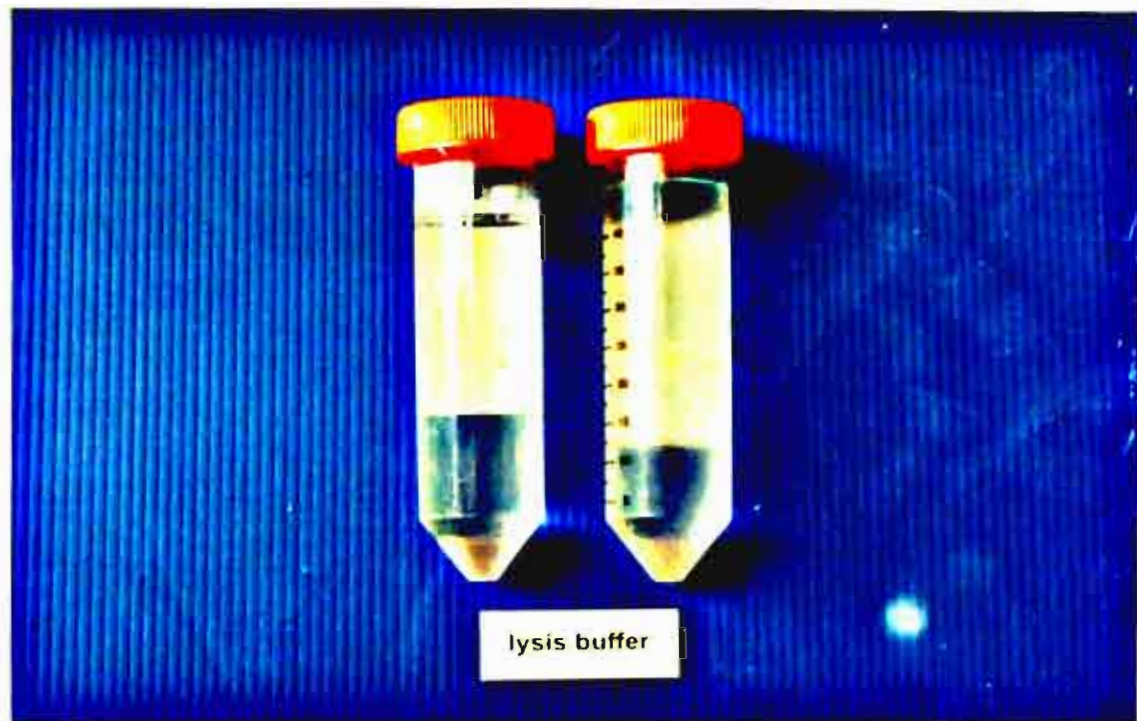
ช่อง M คือ DNA marker (ϕ x174 DNA *Hae*III)

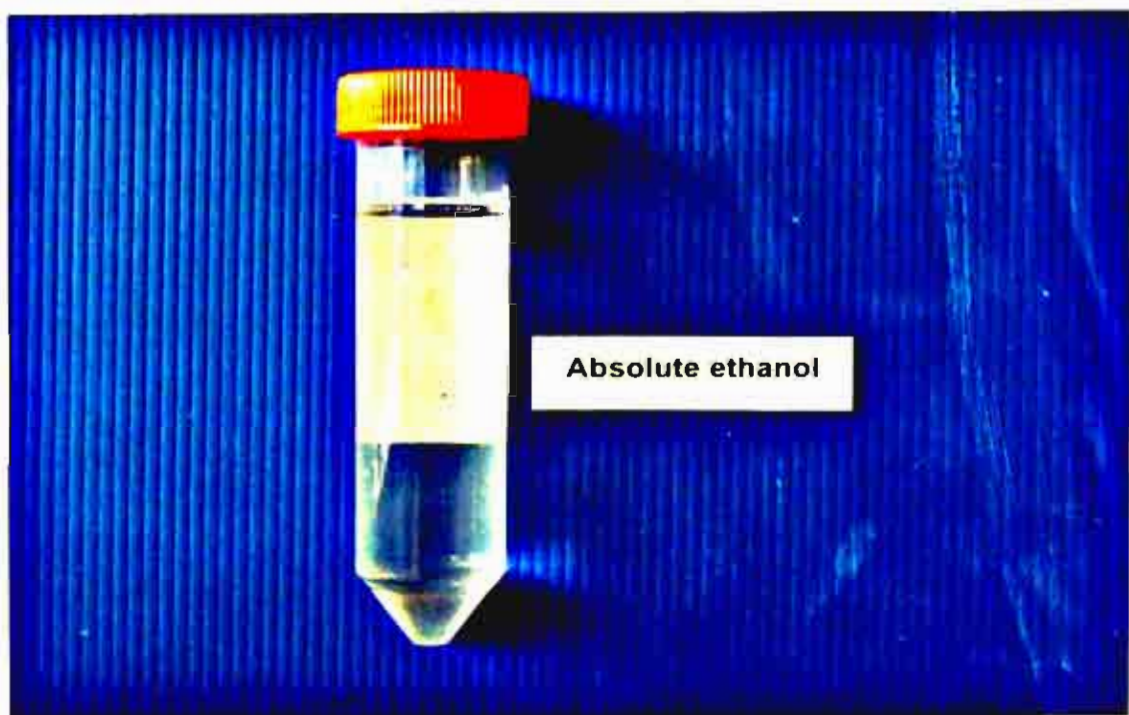
ช่อง 1 คือ negative control

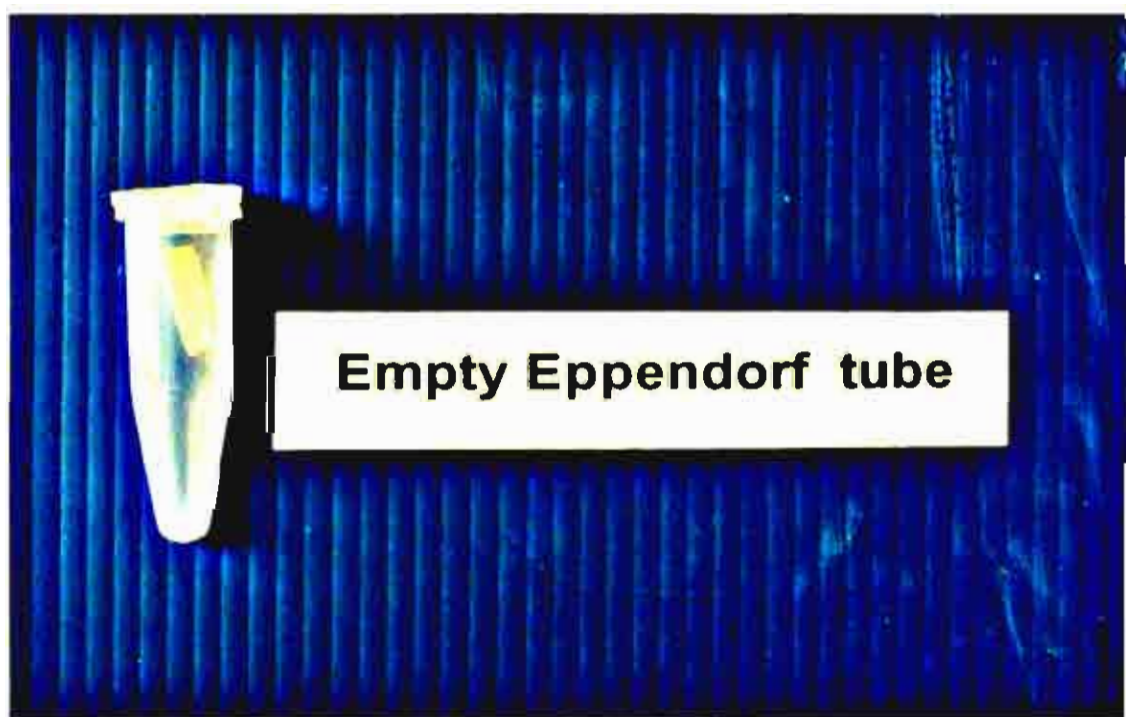
ช่อง 3 คือ positive control

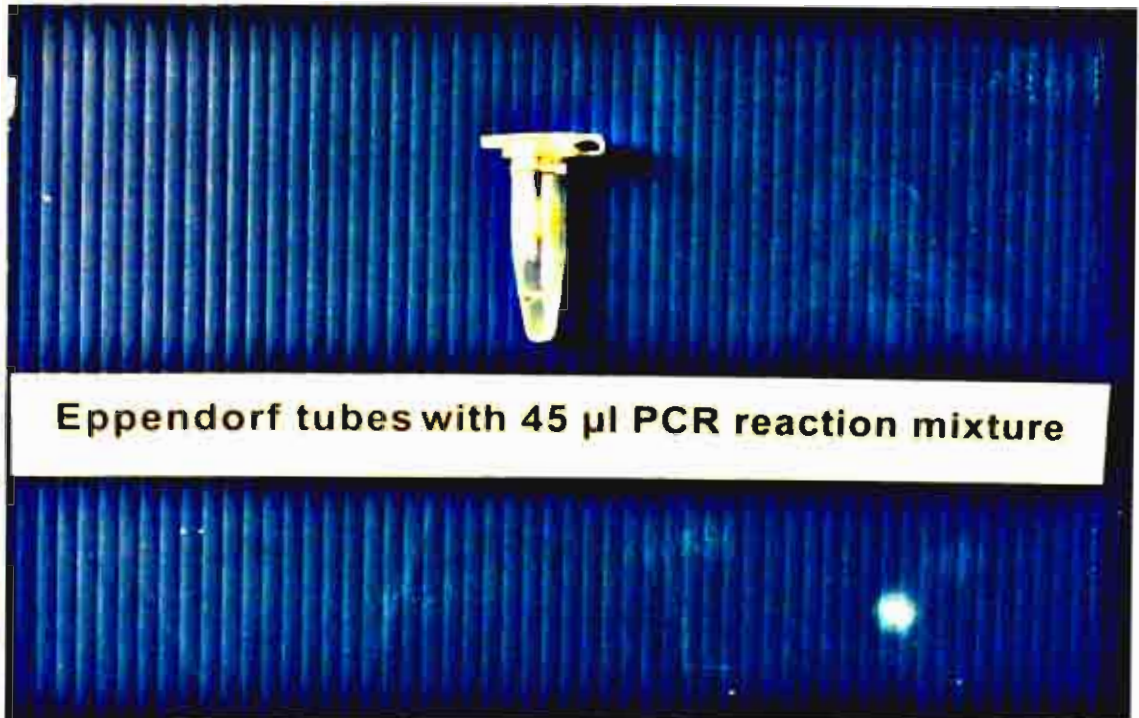
ช่อง 2 คือ sample ที่อ่านผล positive

ช่อง B คือ reagent control

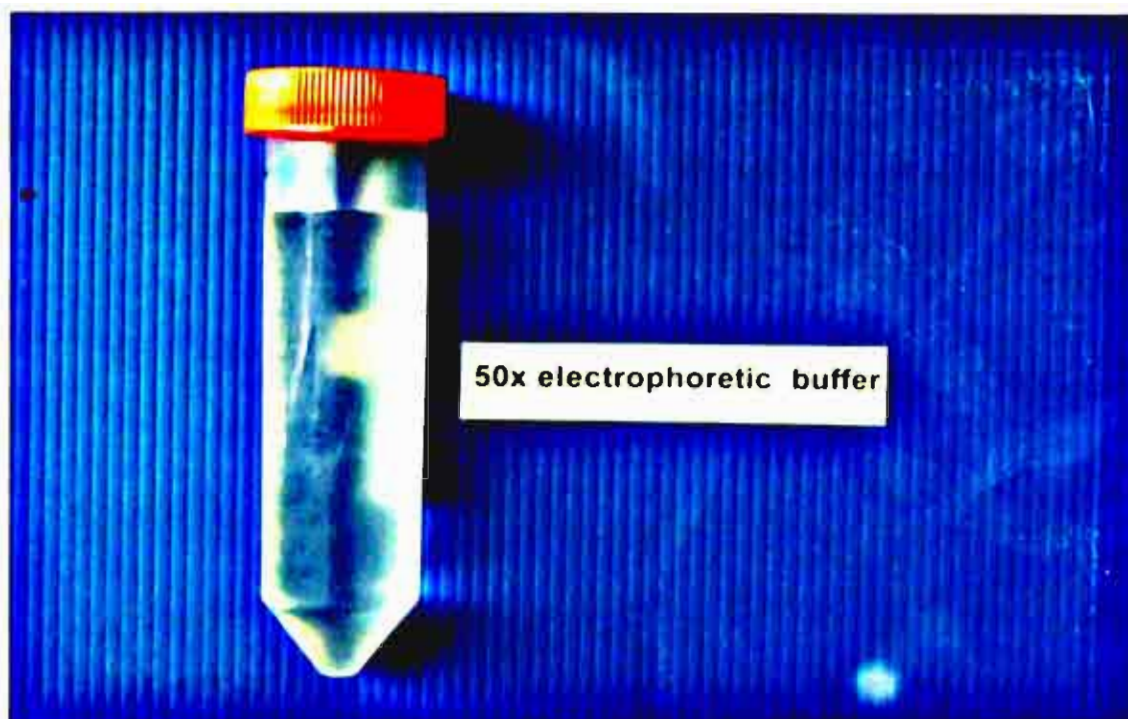




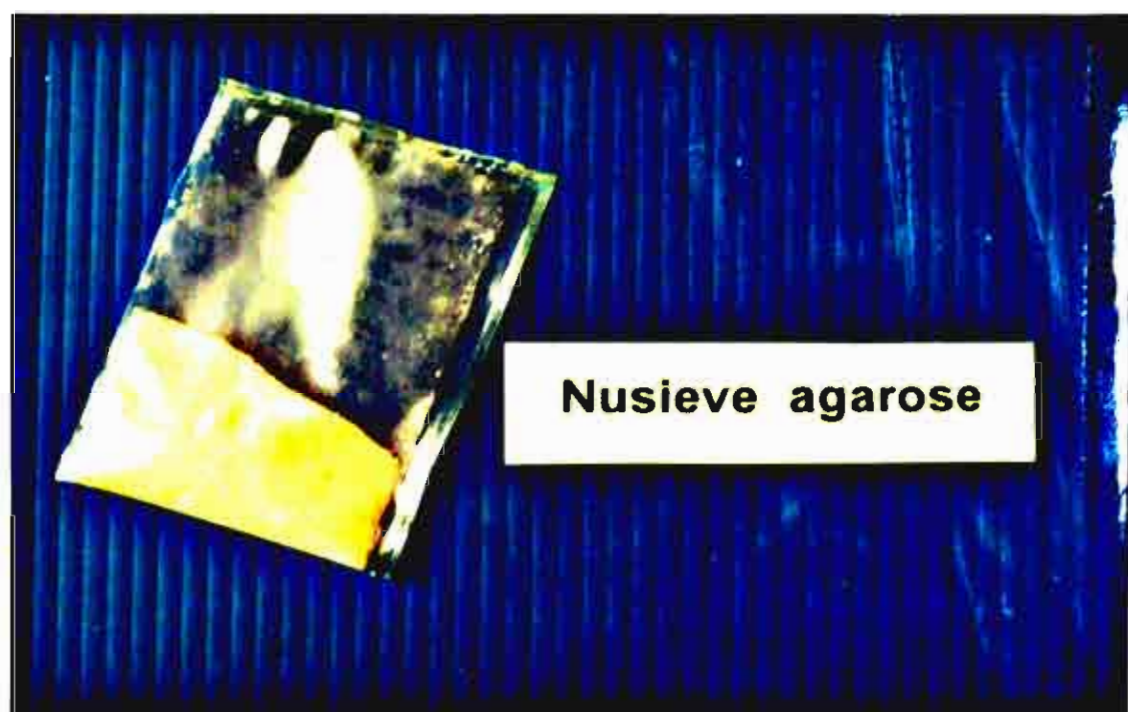








50x electrophoretic buffer



Nusieve agarose



