

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 โดยในขณะที่ทำการทดสอบใช้วิธี 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. ผู้วิจัยเคยพบว่านักวิจัยบางท่านบอกว่าอย่าให้เงินเหลือให้รีบ 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. *Penicilliosis 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. marneffei*. 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, Jeankajoin 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 mameffeii* 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 atcccttatcga ggatcaattg gagggcaagt ctggtgccac caccgcggt
121 aattccagtt ccaatngngt atattaaaag ttgtgcagt taaaaagtt gtagttggat
181 ttctgttttg agcgtccggc ccgntctttg agtgtgtgn taggatgtt gagacattt
241 ttgtgaggat gtccctctgc cattaagttg gtggttggat agacttgc atcgttactgt

301 gaaaaaatta gagtgtttaa agcaggcgtt tgctcattga atacattagc atggaataat
361 aagatacgac ctgggtggtc tattttgttg gttgcacac cagggtaatg attaataagg
421 acagttgggg gtattcatat tccagcgtca gaggtgaaat tcttggatcg 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).

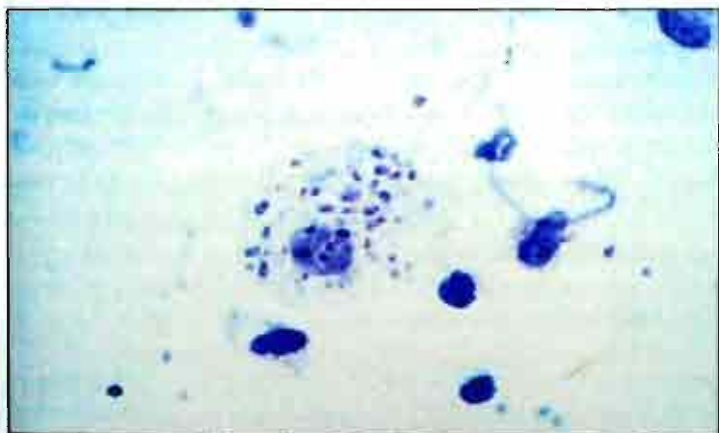
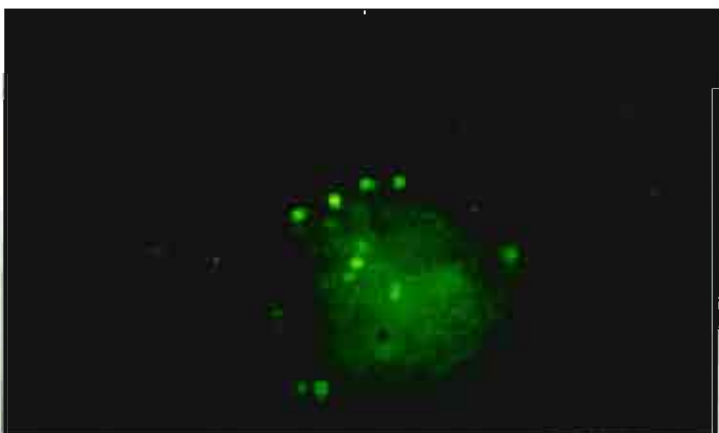


Figure 2. Giemsa (A) and calcofluor white (B) stained smears, which were prepared from a fine needle aspirate of a cervical lymphnode and a sputum sample respectively, reveal masses of small intra- and extracellular yeast-like organisms, some of which are sausage-shaped and show prominent cross walls.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



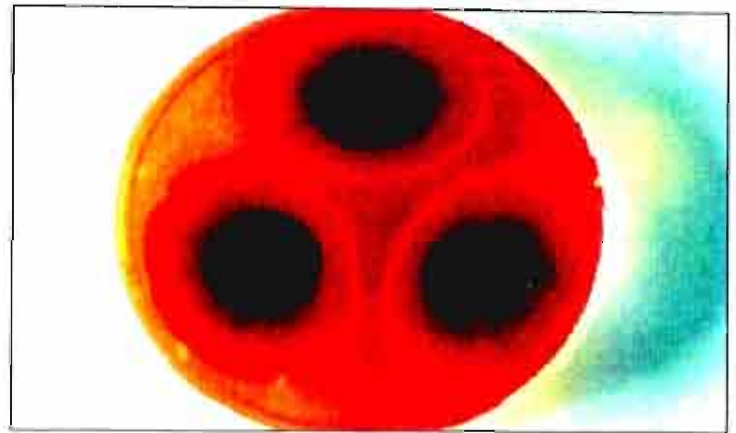
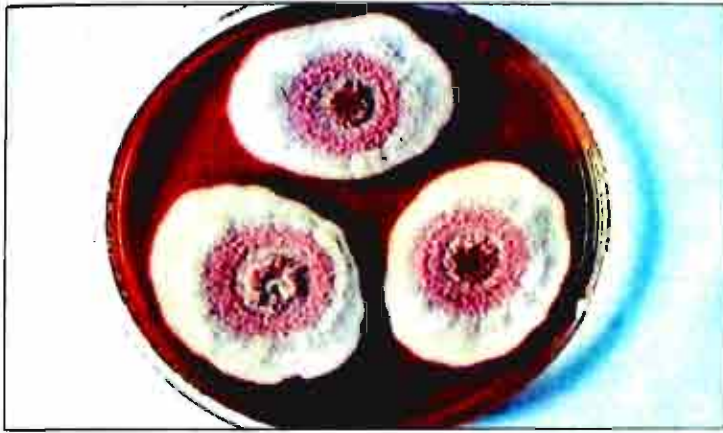


Figure 3. Surface (A) and reverse (B) of a subculture of *Penicillium marneffei* on Sabouraud glucose (2%) agar in a 90 mm petri dish after 29 days at 28 °C. The colonies are flat, sparse, mostly submerged, with white aerial mycelium, and a distinct red exudate. A wet mount prepared from the margin of 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

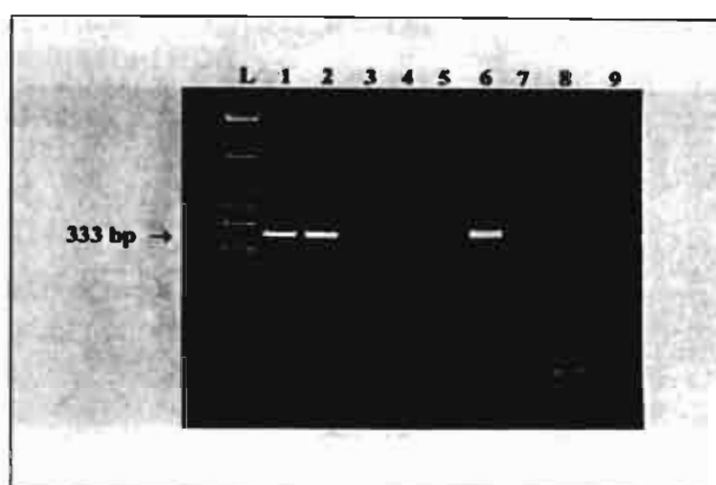
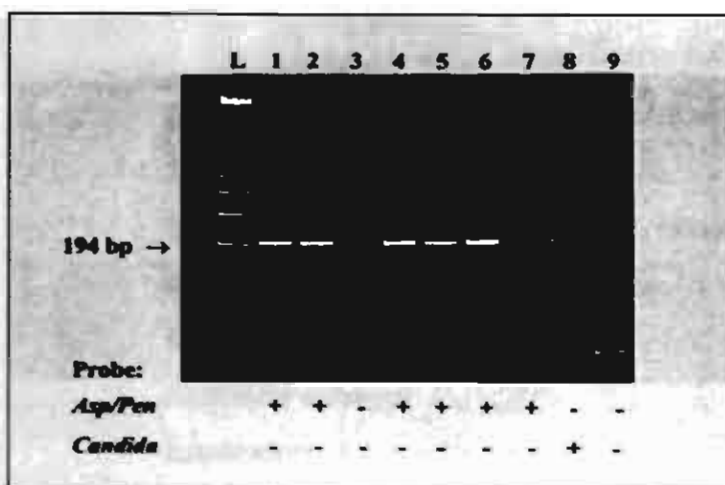


Figure 4. Detection of amplicons generated by a panfungal (A) and a *Penicillium marneffii* specific (B) PCR assay from clinical samples of the patient and controls by ethidium bromide stained polyacrylamide gel and by hybridization with a specific probe for *Aspergillus/Penicillium* using a DNA enzyme 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.

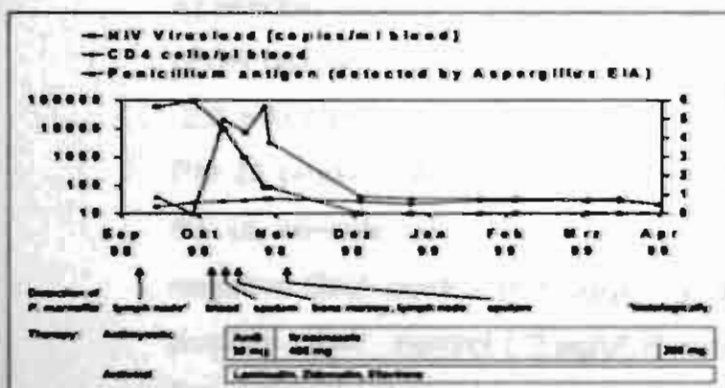


Figure 5. Course of laboratory parameters under antiretroviral and antifungal chemotherapy. Both HI virus load and *Penicillium* antigen dropped below the level of detection after two months of treatment.

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 โดยต้ม 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)

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

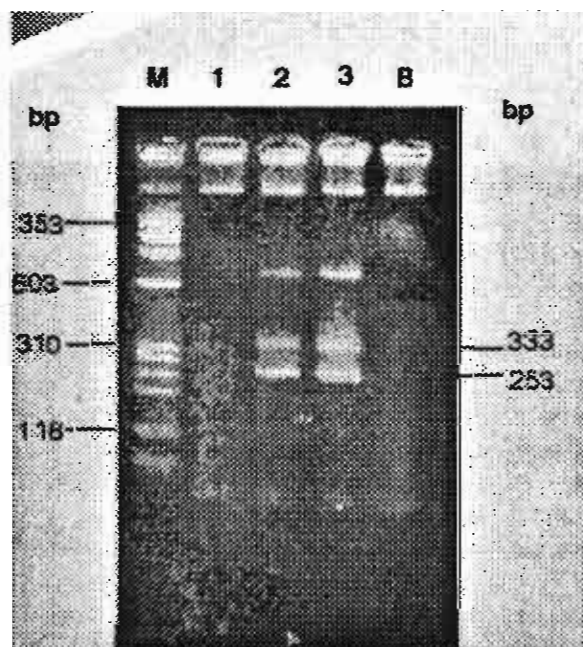
-ล้างเจลในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ระยะเวลา 10 นาที (เปลี่ยนน้ำใหม่)

-นำเจลมาตรวจดูแถบ DNA ที่ได้จาก standard DNA marker ϕ x174 HaeIII (ข้อควรระวัง : เวลาตรวจควรใส่แว่นตาเพื่อป้องกันแสง 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



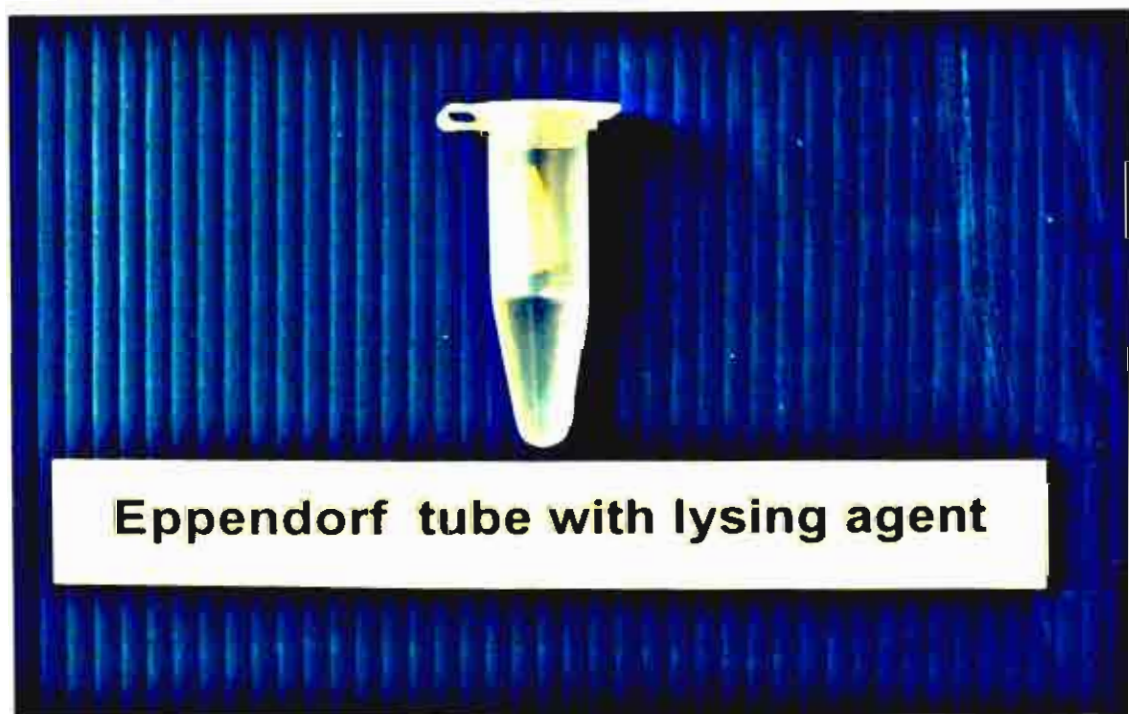
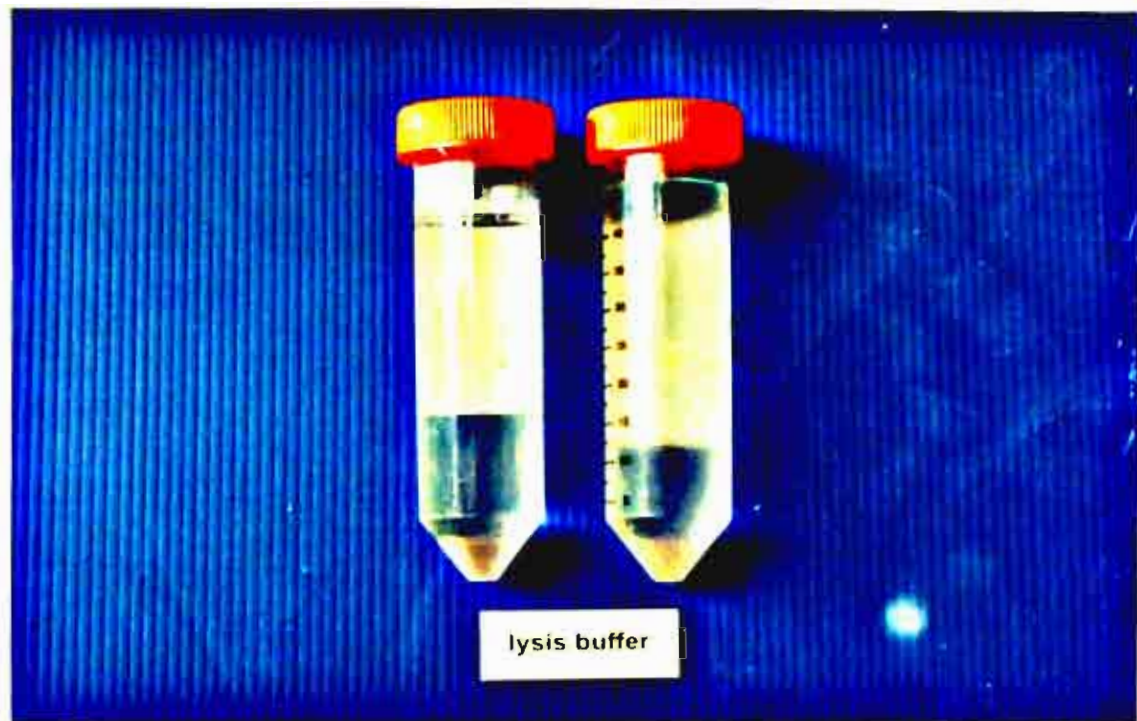
ช่อง M คือ DNA marker (ϕ x174 DNA HaeIII)

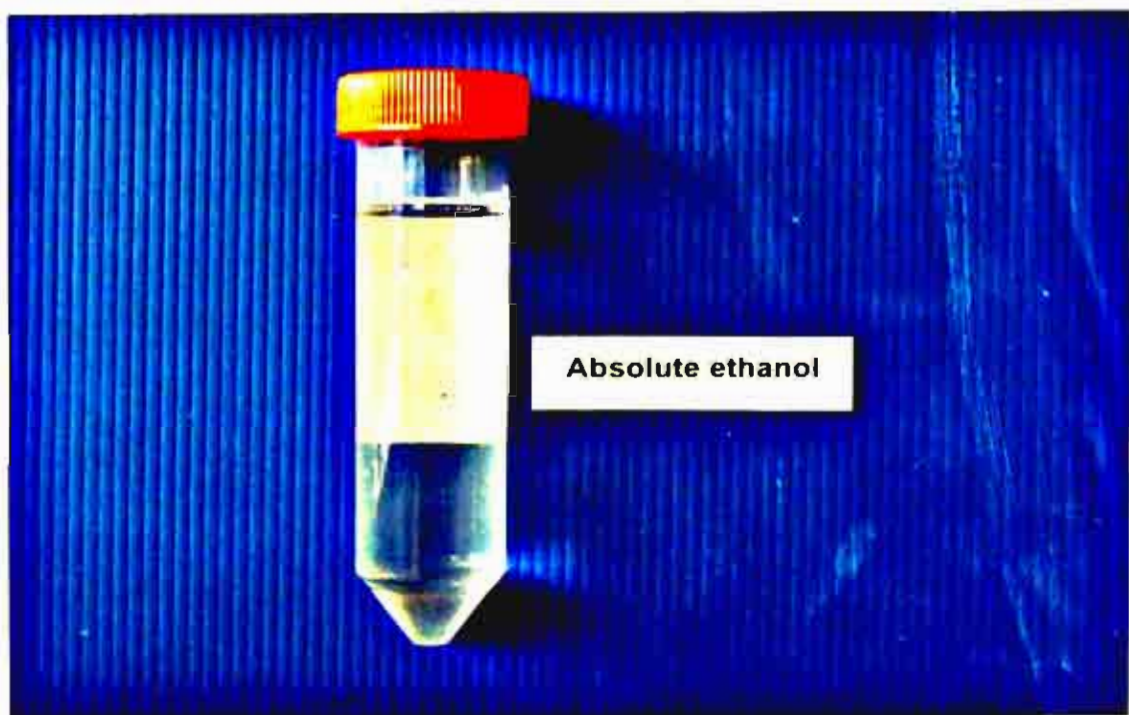
ช่อง 1 คือ negative control

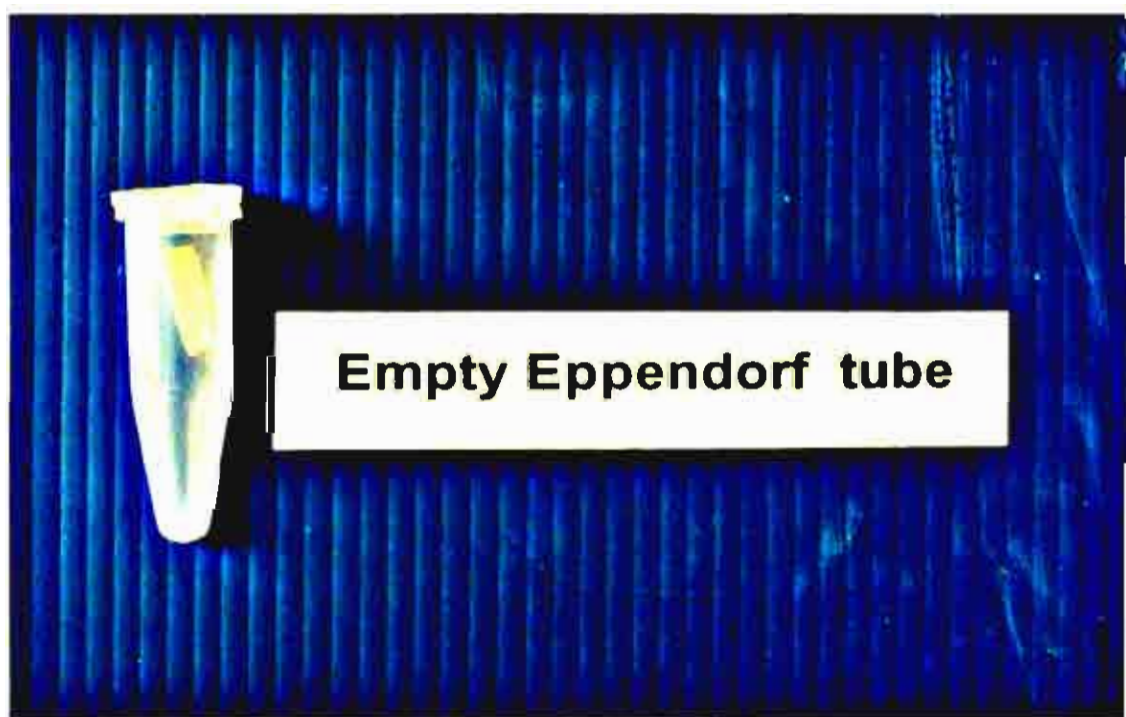
ช่อง 3 คือ positive control

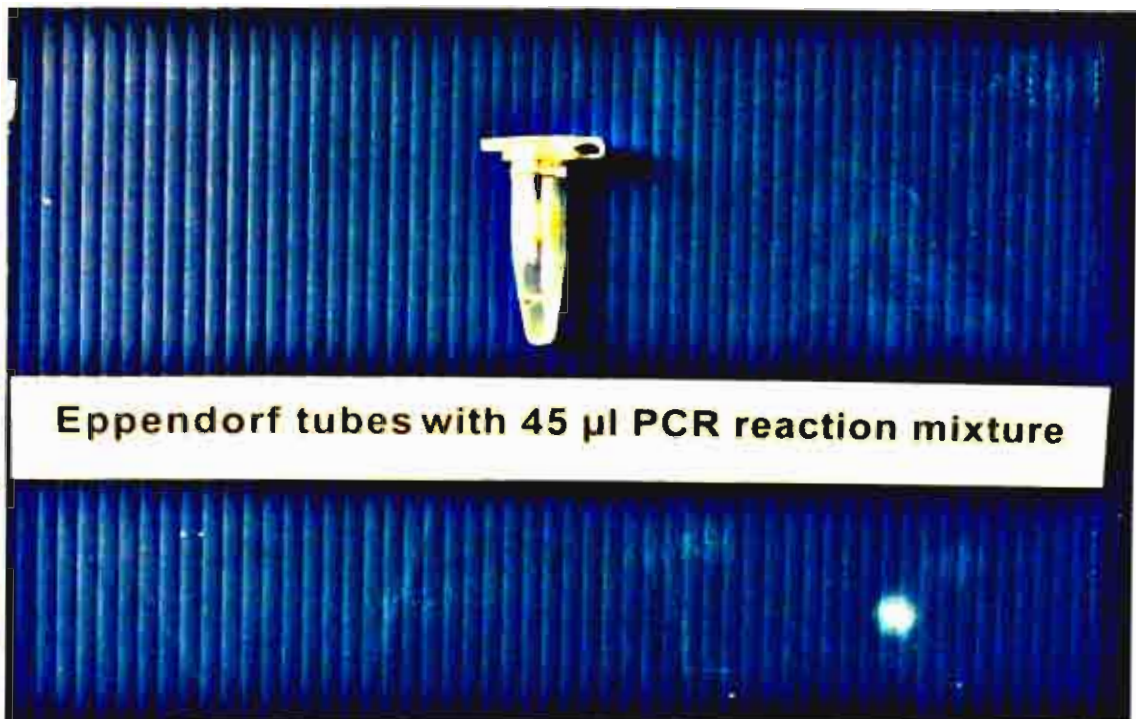
ช่อง 2 คือ sample ที่อ่านผล positive

ช่อง B คือ reagent control

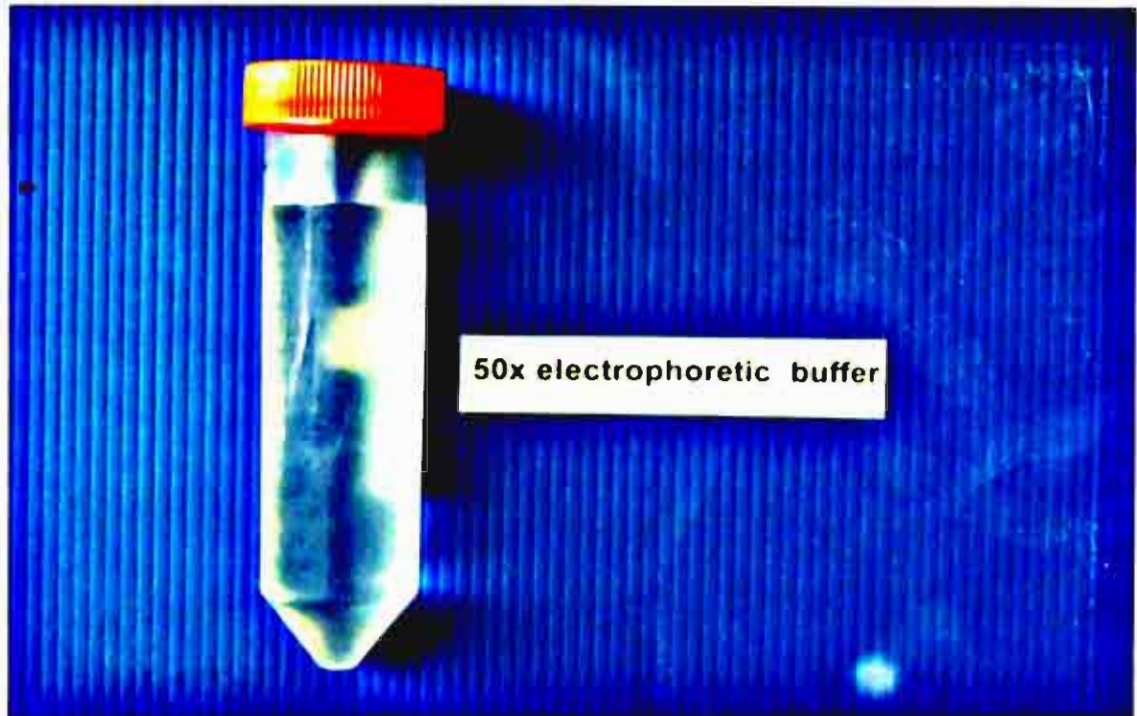




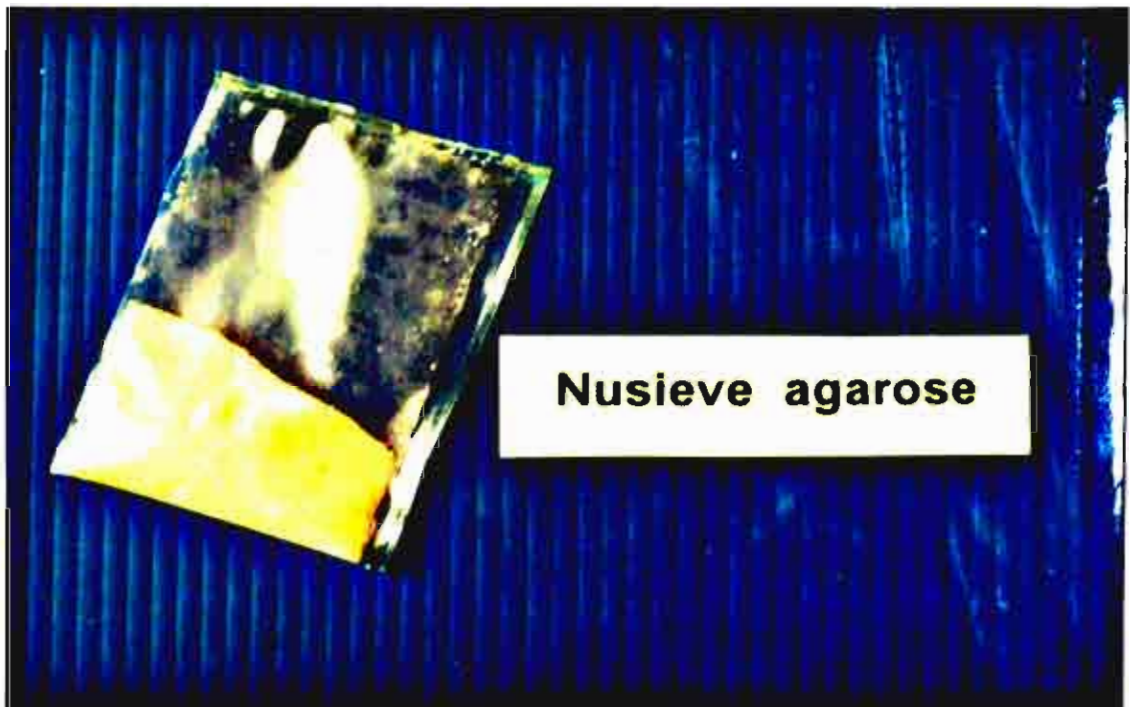








50x electrophoretic buffer



Nusieve agarose



