



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pythium insidiosum*
โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

Development of diagnosis for *Pythium insidiosum* based on molecular biology technique

โดย รศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรีชาติกุล หัวหน้าโครงการ
ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5 มกราคม 2550

สัญญาเลขที่ RSA4780009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pythium insidiosum* โดยอาศัยเทคนิคทาง
ชีววิทยาระดับโมเลกุล

Development of diagnosis for *Pythium insidiosum* based on molecular biology technique

ผู้วิจัย

รศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรีชาติกุล	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร. นิชา เจริญศรี	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
น.ส. ศรีสุตา ปัญญาอนุสรณ์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
น.ส. ประกายกุล แสงนาค	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
น.ส. ยอดหทัย ทองศรี	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
น.ส. ปิยณัฐ ศิริธร	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นาย พรศักดิ์ ทับศรีรัก	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่องนี้ ได้รับทุนอุดหนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และงบประมาณการวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ทุน คณะเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สิ่งส่งตรวจและอุปกรณ์การวิจัยเป็นอย่างสูง มา ณ ที่นี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA4780009
ชื่อโครงการ: การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pythium insidiosum* โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : รศ.ดร. จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
E-mail : chupra@kku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เชื้อ *Pythium insidiosum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค Pythiosis ในสัตว์และคน โรคนี้พบไม่บ่อยแต่มีความรุนแรง มีอัตราการพิการและเสียชีวิตสูง วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P. insidiosum* จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เทคนิค seminested polymerase chain reaction ทำให้การตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะและความรวดเร็วมากขึ้น การออกแบบไพรเมอร์สำหรับจีน 18S rRNA ที่ใช้ในการศึกษานี้มีการใช้ข้อมูลจาก GenBank ทั้งหมด 98 accesses ซึ่งประกอบไปด้วยข้อมูลของ *Pythium* spp., เชื้อราอื่นๆ และคน ทำการวิเคราะห์หาบริเวณที่เป็น Conserve และ Variable จากการวิเคราะห์ได้ไพรเมอร์ CPL6 และ PSL1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *P. insidiosum* ได้นำไพรเมอร์ทั้งสองนี้ไปใช้ร่วมกับไพรเมอร์ CPR8 จะได้ product ขนาด 512 และ 152 bp ตามลำดับการพัฒนาเทคนิค seminested PCR มีการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยมีการปรับ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ CPL6, $MgCl_2$, dNTPs, Taq DNA polymerase และจำนวนรอบ โดยมีความไวของการทดสอบเมื่อทดสอบกับ *P. insidiosum* สายพันธุ์ MCC2 เท่ากับ 1 pg ความจำเพาะของการทดสอบเมื่อทดสอบกับเชื้อ *P. insidiosum* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 34 สายพันธุ์และเชื้อ *Pythium* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ พบ product ขนาด 512 และ 152 bp ส่วนเชื้อราอื่นๆ 23 สายพันธุ์, แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ และเลือดจากคนปกติ จำนวน 1 รายไม่พบ product ขนาด 512 และ 152 bp และมีการใช้เทคนิค seminested PCR ในการตรวจชิ้นเนื้อที่มีการติดเชื้อ *P. insidiosum* จำนวน 4 ตัวอย่าง, ชิ้นเนื้อที่มีการติดเชื้อ *Candida* spp. จำนวน 2 ตัวอย่างและในสิ่งส่งตรวจจำลอง 3 ตัวอย่างที่ใส่เชื้อ *P. insidiosum* และ *A. niger* ได้ product จำเพาะจากชิ้นเนื้อที่ติดเชื้อ *P. insidiosum* และสิ่งส่งตรวจจำลองที่ใส่เชื้อ *P. insidiosum* เข้าไปเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P. insidiosum* อยู่ในรูปของชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อสะดวกในการใช้งานสำหรับสิ่งส่งตรวจต่อไป

คำหลัก: *P. insidiosum* , seminested polymerase chain reaction , ชุดตรวจสำเร็จรูป

Abstract

Project Code: RSA4780009

Project Title: Development of diagnosis for *Pythium insidiosum* based on molecular biology technique

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Chularut Prariyachatigul
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail Address: chupra@kku.ac.th

Project Period: 2 years

Pythium insidiosum is a rare pathogen that causes pythiosis in animals and humans with high morbidity and mortality. The accurate and rapid method to diagnose *P. insidiosum* is important and necessary. The purpose of this study was to develop a seminested polymerase chain reaction for the identification of *P. insidiosum* targeted to 18S rRNA gene. Primers were designed from 98 nucleotide sequences of *Pythium* species, other fungi and human. The primer CPL6 and PSL1 was specific for *P. insidiosum*. The primer CPR8 were paired with CPL6 and PSL1, which resulted in PCR products size of 512 and 152 bp. The development of a seminested PCR usually requires strategic planning and multiple attempts to optimize reaction conditions (concentration of the primer CPL6, amplification cycle, concentration of MgCl₂, dNTPs, and *Taq* DNA polymerase). Sensitivity of the assay was 1 pg that tested with DNA of *P. insidiosum* strain MCC2. Specificity of the assay was tested with DNA extracted from cultures of the 34 isolates of *P. insidiosum*, 5 *Pythium* spp., 23 species of fungi, 10 species of bacteria and healthy normal blood. Seminested PCR produced specific amplicon for each of the *P. insidiosum* and 5 *Pythium* spp., but did not produce amplicons with fungal species, bacterial species and healthy normal blood. Four biopsy tissues of pythiosis, two biopsy tissues of candidosis and three simulated samples were tested and revealed PCR product only in biopsy tissues of pythiosis patients and simulated samples that spiked with *P. insidiosum*. The diagnostic kit for *P. insidiosum* was also developed to use with clinical samples.

Keywords: *P. insidiosum*, seminested PCR, diagnostic kit

Executive Summary

โรค pythiosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อ *Pythium* spp. ที่พบในม้า วัว ควาย สุนัข แมว มานานแล้วโดยเริ่มมีรายงานปรากฏในชื่อของโรค bursattee (1) และ hyphomycosis destruens-equi (2) ยังไม่เคยมีรายงานของโรคนี้ในคนเลย จนกระทั่งในปี 1986 พบ human pythiosis 2 รายแรกที่โรงพยาบาลศิริราช โดย นพ.เมระนี เทียนประสิทธิ์ มีลักษณะรอยโรคที่ผิวหนังเป็น painful subcutaneous granulomatous infiltrative lumps with ulcers ที่แขนขวาของผู้ป่วยรายที่ 1 และ ขาซ้ายของผู้ป่วยรายที่ 2 นับเป็นการรายงานโรคนี้ในคนเป็นครั้งแรกของโลก (3,4) ผู้ป่วยทั้ง 2 รายเป็นโรค thalassemia/HbE ในขณะนั้นได้ส่งเชื้อสาเหตุที่แยกได้จากกรอยโรคไปทำการพิสูจน์และได้รับการยืนยันโดย De Cock และคณะในปี 1987 (5)ว่าเป็นเชื้อ *Pythium insidiosum* ต่อมาในช่วงปี 1987-1989 พญ. บุญมี สถาปัตยวงศ์ และคณะพบอีก 5 รายที่โรงพยาบาลรามาริบัติ (6) ทั้ง 5 รายมีลักษณะทางคลินิกเด่นของการอักเสบที่หลอดเลือดแดงขนาดกลางและใหญ่ ทำให้เกิดหลอดเลือดอุดตัน หลอดเลือดโป่งพอง (aneurysm formation) ผู้ป่วยมีอาการของการขาดเลือดไปเลี้ยงบริเวณขา ความรุนแรงของโรคต่างกัน ตั้งแต่จากการมี intermittent claudication การปวดขณะพัก จนถึง leg gangrene หากการอักเสบของเชื้อนี้ลุกลามจนถึง abdominal aorta จะทำให้เกิดการทำลายผนังหลอดเลือดจนแตกถึงแก่ความตายได้ และยังคงพบว่าผู้ป่วยทั้ง 5 รายนี้เป็นโรคร่วมกับ thalassemia เช่นกัน นับเป็นรายงานแรกของโรคที่บ่งชี้ถึงภาวะ pythium arteritis หลังจากได้มีรายงานถึงภาวะดังกล่าวนี้แล้วทำให้มีผู้พบภาวะดังกล่าวเพิ่มเติมมากขึ้น(7-10) จนถึงปัจจุบันรวบรวมผู้ป่วยได้ทั้งหมด 102 ราย (11) สิ่งที่น่าสนใจคือผู้ป่วยที่พบล้วนรายงานมาจากประเทศไทยและเป็น thalassemia ในสัดส่วนที่สูงคือ 7:1 ส่วนใหญ่มีอายุน้อยในวัยทำงาน ประกอบอาชีพเป็นชาวนา ชาวไร่ มีประวัติการถูกหญ้าบาด หรือมีบาดแผลที่ขา ก่อนที่จะมีอาการปวดขาหรือ gangrenous ulcer ที่บริเวณเท้า คาดว่าเชื้อน่าจะเข้าที่บาดแผลซึ่งสัมผัสกับแหล่งน้ำเพราะในธรรมชาติเชื้อนี้จะอยู่บนใบพืชในน้ำหรือที่ชื้นแฉะ อาการสำคัญของผู้ป่วยเหล่านี้คือ อาการของ arterial insufficiency แบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง อาการมักจะเป็นเรื่องปวดเฉพาะเวลาเดิน (intermittent claudication) ปวดขณะพัก (resting pain)หรือมีแผลเรื้อรังจากเนื้อตายขาดเลือด (gangrenous ulcer) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการอุดตันและความเพียงพอของ collateral circulation เมื่อทำการศึกษาหลอดเลือดแดงในผู้ป่วยเหล่านี้โดยการฉีดสี (angiography) พบว่ามีการอุดตันของหลอดเลือดแดงขนาดกลางและขนาดใหญ่ เช่นหลอดเลือดแดง popliteal หลอดเลือดแดง femoral และมี collateral circulation จำนวนมาก พบผนังหลอดเลือดขยาย (aneurysmal dilatation)ในรายที่โรคลุกลามมากจะพบความผิดปกติสูงขึ้นถึงหลอดเลือด

เลือดแดง common iliac ตลอดจนถึง bifurcation ของ aorta ซึ่งจะเกิด thromboembolism ลามไปยังขาอีกข้างได้ หากมีการลุกลามถึงขนาดนั้นแล้วผู้ป่วยมักถึงแก่ความตาย ซึ่งผู้ป่วยส่วนมากต้องเสียชีวิตเพราะการวินิจฉัยที่ล่าช้า เนื่องจากการเพาะเชื้อจะเสียเวลานานอย่างน้อย 2-3 วัน และเมื่อเพาะเชื้อได้แล้วก็ยังไม่อาจบอกได้อย่างชัดเจนว่าเป็นเชื้อ *P. insidiosum* เพราะมีเชื้อหลายชนิดที่สร้างแต่สายราอย่างเดี่ยวเช่นเดียวกับเชื้อนี้ ดังนั้นจึงต้องไปทำการ induce เพื่อให้เชื้อสร้าง zoospore ซึ่งเป็น infective stage ของเชื้อจึงจะพอบอกได้ว่าเป็นเชื้อนี้ ขั้นตอนการ induce zoospore ต้องใช้เวลาอีก 2-3 วัน ขณะที่ต้องเสียเวลาในการวินิจฉัยอยู่นั้น เชื้ออาจลุกลามไปตามหลอดเลือดอย่างรวดเร็วยากแก่การรักษา เพราะการเจริญของเชื้อในหลอดเลือดจะเร็วกว่าการเจริญในจานเพาะเชื้อ การวินิจฉัยโดยการทำ biopsy และดูผลจากการย้อมชิ้นเนื้อจะพบลักษณะคล้ายสายราแบบ non septate แทรกอยู่ อาจทำให้แพทย์ไปรักษาด้วยยาที่ใช้รักษาเชื้อรา ซึ่งจะไม่ได้ทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น เนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อคล้ายเชื้อรา ในปัจจุบันไม่ถือว่าเป็นเชื้อราที่แท้จริง จัดอยู่ใน Kingdom Chromista, Phylum Pseudofungi, Class Oomycetes, Order Pythiales, Family Pythiaceae(12) การรักษาด้วยยาจึงไม่ได้ผล ทั้งการให้ amphotericin B ยา กลุ่ม azol และ potassium iodide การรักษาที่ได้ผลคือ การตัดขา limb amputation (3,8,6,13) ให้เพียงพอเหนือระดับของหลอดเลือดแดงที่มีเชื้อนี้อยู่ที่ผนังหลอดเลือดอย่างรวดเร็ว ก่อนที่เชื้อจะลุกลามไปมากกว่านั้นจนถึงแก่ชีวิตซึ่งถ้าทำการผ่าตัดรักษาทันผู้ป่วยก็จะกลายเป็นผู้พิการ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องตระหนักถึงความรุนแรงและอันตรายจากโรคนี้ องค์ความรู้ของโรคนี้ที่เกิดขึ้นในคนมีนักวิทยาศาสตร์ทำการศึกษากันน้อย ยังไม่มีผู้ใดอธิบายได้อย่างชัดเจนเกี่ยวกับความสัมพันธ์อย่างจำเพาะระหว่างโรค thalassemia กับการติดเชื้อรา *P. insidiosum* โดยเฉพาะโรคที่เกิดขึ้นในคนและมีอาการรุนแรงของภาวะ pythium arteritis ซึ่งมีรายงานพบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น ซึ่งเป็นการลำบากต่อนักวิทยาศาสตร์ต่างชาติที่จะศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้ จึงน่าจะเป็นจุดแข็งของการวิจัยในประเทศไทยที่จะสนับสนุนนักวิจัยให้ศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้อย่างจริงจัง เพื่อให้ได้คำตอบในทุกแง่มุม เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยมีประสบการณ์เกี่ยวกับการศึกษา 18S rRNA gene ของเชื้อราหลายชนิดซึ่งเป็นงานวิจัยที่เคยทำเมื่อครั้งเรียนระดับปริญญาเอก(14) และในภายหลังได้รับทุนวิจัยหลังปริญญาเอกจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยซึ่งในครั้งนั้นแม้จะไม่ได้ทำการวิจัยเรื่องเกี่ยวกับ *P. insidiosum* โดยตรงแต่ส่วนหนึ่งของทุนที่ได้รับทำให้สามารถหาลำดับเบสของเชื้อ *P. insidiosum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย และได้ deposit ไว้ใน GenBank data เป็นรายแรก (15) จึงเป็นแรงผลักดันให้ มีความสนใจที่จะศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อนี้อย่างต่อเนื่อง เพราะโรคนี้เป็นอันตรายร้ายแรงถึงชีวิตต้องอาศัยความรวดเร็วในการวินิจฉัย การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาจะสามารถเพิ่มความไว ความจำเพาะ และย่นระยะเวลาในการตรวจสอบได้ งานวิจัยครั้งนี้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจชนิด one tube seminested

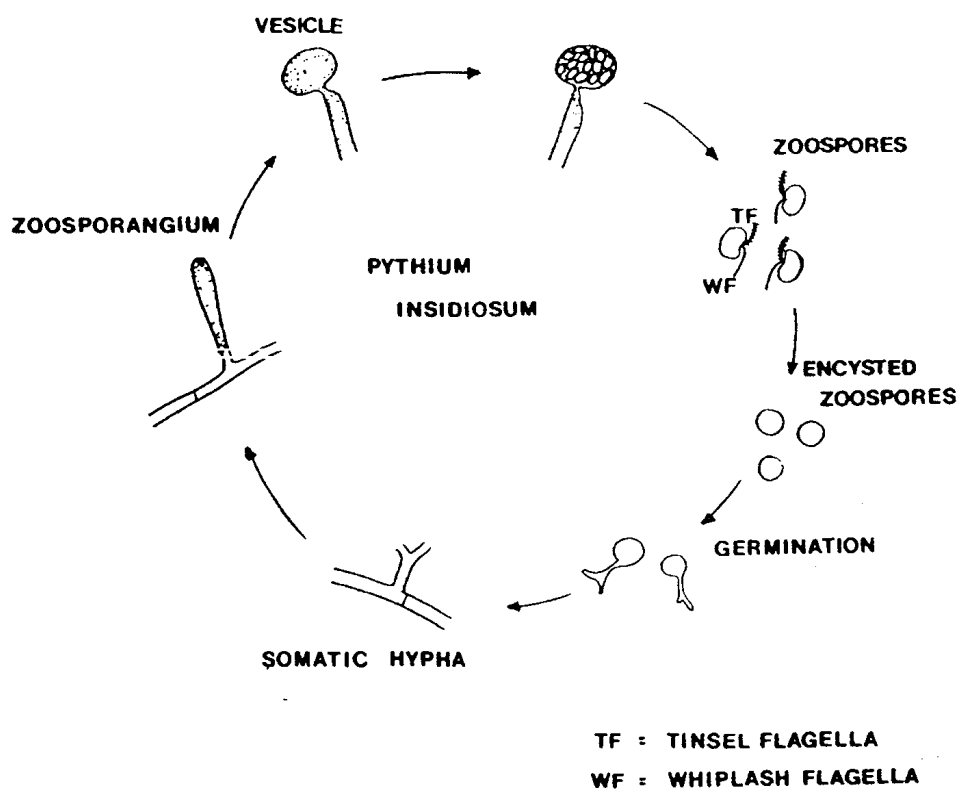
polymerase chain reaction เริ่มจากเตรียม design primer และ condition ที่จะใช้โดยหาข้อมูลจาก computer ทำ alignment ของลำดับเบสใน 18S rRNA gene วิเคราะห์ข้อมูลเหล่านั้น รวมทั้งตัดสินใจเลือก primer แล้วจึงทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบ condition ว่ามีความเป็นไปได้ในห้องปฏิบัติการหรือไม่และทำการปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมจนได้ตามต้องการ หลังจากนั้นได้ทดสอบความไว และความจำเพาะของการทดสอบแล้วจึงมาทดลองกับสิ่งส่งตรวจจริง และสิ่งส่งตรวจจำลอง เนื่องจากสิ่งส่งตรวจมีน้อยจึงได้ทดลองทำสิ่งส่งตรวจจำลองขึ้นมาด้วย ได้ผลเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง จึงได้จำลองเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปต้นแบบเพื่อพัฒนานำไปใช้ต่อไป

บทบทวนเอกสาร

ความสำคัญของเชื้อ *Pythium insidiosum* ^(16,17)

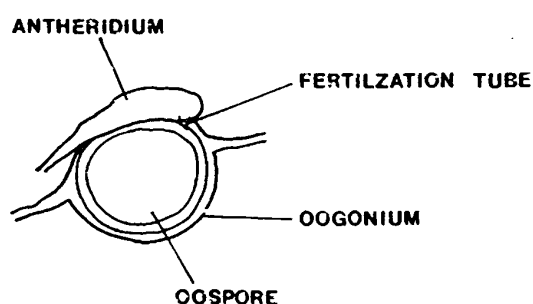
เชื้อสกุล *Pythium* นี้ แต่เดิม Alexopoulos และคณะ จัดไว้ใน Kingdom Myceteae, Phylum Mastigomycota, Class Oomycetes ซึ่งประกอบด้วย Order Saprolegniales, Leptomitales, Lagenidiales, Peronosporales โดยเชื้ออยู่ในน้ำ ก่อโรคเน่าในพืช (damping off of seedlings) เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่ว มะเขือเทศ ในสัตว์ก่อโรคในวัว ควาย สุนัข โดยเฉพาะในม้า และพบก่อโรคในคน ได้ โดยในปี พ.ศ. 2530 De Cock และคณะรวบรวมเชื้อที่ก่อโรคในคน ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยไทย และในม้า นำมาศึกษาและสรุปว่า เชื้อที่ก่อโรคในคนและในม้าเป็นเชื้อเดียวกัน จัดได้ดังนี้ Kingdom Protoctista (ภายหลังถูกแยกออกมาเป็น Kingdom Chromista), Phylum Pseudofungi, Class Oomycetes, Order Pythiales, Family Pythiaceae, Genus *Pythium* และเรียกชื่อเชื้อว่า *Pythium insidiosum* ซึ่งเป็นเชื้อเพียงสปีชีส์เดียวที่ก่อโรคได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เรียกโรคที่เกิดขึ้นว่า Pythiosis insidiosi

ลักษณะสำคัญของเชื้อ *P. insidiosum* คือ สร้างสาขาราคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 μm สาขาราคแตกแขนงแบบตั้งฉาก มีผนังกันภายในสาขาค่อยๆ เชื้อสร้าง zoosporangium ที่ส่วนปลายสาขาราคหรือเกิดที่ตำแหน่งอื่นของสาขาค โดยการเกิดผนังกันแบ่งที่ส่วนนั้นๆ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็น zoosporangium นี้มีหน้าตาไม่ต่างจากสาขาราคทั่วไป ที่ปลายหรือด้านข้างของ zoosporangium มีส่วนที่งอกออกมาเป็นท่อ เรียก discharge tube ขนาดยาวประมาณ 45-700 μm เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 μm พองออกเล็กน้อยที่ปลาย (5-8 μm) และมีผนังบาง เมื่อ sporangium แก่ โปรโทพลาสซึมที่อยู่ภายในจะไหลออกมาผ่านรูเปิดของ discharge tube ออกมาสร้างเป็นถุง (vesicle) รูปกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-60 μm ภายในมีการแบ่ง (cleavage) สร้างเป็นสปอร์ชนิดมี 2 หาง (biflagellate zoospores) รูปร่างคล้ายถั่วหรือไต จำนวนมาก และถูกปล่อยออกมาภายนอกโดยการแตกที่ผนังของถุง ตำแหน่งของ flagella อยู่ด้านข้างของ zoospore มี 2 เส้น เส้นหนึ่งมีรูปร่างคล้ายเครื่องประดับหรือคล้ายซี่หวี (tinsel) อีกเส้นหนึ่งมีรูปร่างคล้ายหางแส้ (whiplash) ขนาดของ flagella ประมาณ 12-14 x 6-8 μm Flagella นี้เป็นส่วนที่เกาะกับเศษใบหญ้าหรือเส้นขนหรือผม หลังจากนั้นจะเกิดการหดตัวกลายเป็น encyst zoospores มีรูปกลมขนาด 8-12 μm และเจริญต่อโดยงอก germ tubes และกลายเป็นสาขาราคต่อไป (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อ *P. insidiosum* ในภาวะไม่มีเพศ สร้าง zoospore

ในภาวะมีเพศ เชื้อสร้าง oogonia ซึ่งอาจพบที่ส่วนหนึ่งภายในสาขรา (intercalary) หรือส่วนเกือบปลายสุด (subterminal) เชื้อสร้าง oogonia ได้บนอาหาร cornmeal agar ที่อุณหภูมิห้อง Oogonia มีรูปกลม ผนังเรียบไม่มีสี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 19-36 μm Antheridia (หรือ male gamete) พบ 1-3 ต่อ 1 oogonium Antheridia มีรูปร่างยาวเรียว เกาะติดกับ oogonium และงอก fertilization tube ผ่านเข้าผนังของ oogonium เกิดขบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส และมีการรวมของไซโทพลาสซึม (plasmogamy) มีเพียง 1 male nucleus เท่านั้นที่ทำหน้าที่ได้และเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ของ oogonium มาคู่กับนิวเคลียสเพียงนิวเคลียสเดียวของ oogonium เช่นกัน หลังจากนั้นเกิดการรวมตัวของนิวเคลียสทั้งสอง (karyogamy) ได้เป็น zygote มีผนังหนาขึ้นเป็น oospore (รูปที่ 2) จาก oospore อาจจะงอกเป็นสาขรา หรือสร้าง zoosporangium แล้วแต่สภาวะแวดล้อม



รูปที่ 2 *P. insidiosum* ในภาวะมีเพศ สร้าง oospore

นิเวศวิทยาและการติดต่อ

พบเชื้อได้ในน้ำ โดยจัดเป็นโรคติดต่อทางน้ำ (water-borne disease) จากการตรวจทางพยาธิวิทยาพบสายคล้ายสาหร่ายขนาดกว้าง เมื่อเลี้ยงบนวุ้นเพาะแล้วเก็บมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบสายไม่มีผนังกัน หรือมีผนังกันหยาบๆ คล้ายที่พบในเชื้อสกุล *Mucor* และ *Rhizopus* จึงจัดเชื้อก่อโรคว่าเป็น Phycomycetes (Zygomycetes) แม้ว่าเชื่อนี้จะไม่สร้างโคนิเดียหรือสปอร์บนวุ้นเพาะ โดยเชื้อ *Pythium* species มีคุณสมบัติพิเศษคือ zoospores ของเชื่อนี้มี chemotactic behaviour กับ organic tissue บางชนิด เช่น ชอบว่ายน้ำมาเกาะติดกับเส้นขนของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ขนม้า วัว กระต่าย หนู และเส้นผมของคน โดยเฉพาะส่วน hair follicle โดยจะว่ายน้ำมาเกาะติดกับเส้นผมได้ในเวลาเพียง 2 นาที หลังจากนั้นจะมี encystment และงอก germ tube นอกจากนี้ zoospores ของ *Pythium* ยังมี chemotactic behaviour ได้กับพืชน้ำบางชนิด เช่น Australian water lily (หรือ *Nymphaea gigantea*) Germ tube ดังกล่าว จะงอกเป็นสาหร่ายเข้าไปในเส้นผมหรือเซลล์พืช หลังจากนั้นเชื้อสร้าง sporangium และมี zoospores จำนวนมาก ในช่วงที่ zoospores มี encystment เชื้อจะสร้าง amorphous material ที่ช่วยการเกาะติดของ zoospores กับพืชหรือผิวหนังซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นน่าจะเป็นคำอธิบายได้สำหรับการติดเชื้อ *Pythium* species จากน้ำมาสู่พืช สัตว์ หรือคน ซึ่งถึงแม้ว่าโรค pythiosis นี้ จะพบก่อโรคในคนและสัตว์ดังกล่าว แต่ไม่ปรากฏมีรายงานว่ามี การติดต่อระหว่างสัตว์ด้วยกันเองหรือจากสัตว์มาสู่คน การติดต่อของโรคนี้จะเกิดขึ้นเมื่อสัมผัสกับแหล่งน้ำที่มี infective zoospore ของ *P. insidiosum* โดยตรง ซึ่งจะเห็นได้ว่า รอยโรคที่เกิดขึ้นมักจะเกิดกับอวัยวะของสัตว์ที่สัมผัสกับน้ำบ่อยๆ คือ ขา ท้อง และบุคคลที่เสี่ยงต่อโรคนี้ก็จะเป็นผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับน้ำ หรือต้องสัมผัสกับแหล่งน้ำเป็นประจำ เช่น ชาวนา เป็นต้น ⁽¹⁸⁾

ลักษณะอาการทางคลินิก

โรค pythiosis เป็นได้กับสัตว์หลายชนิด แต่ที่พบบ่อย คือ equine pythiosis หรือเป็นในม้า อาการของโรคที่พบในม้าจะเป็นก้อนแกรนูโลมาที่ผิวหนัง ก้อนแกรนูโลมานี้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มักพบรอยโรคตามบริเวณ ขา ท้อง ออก หลัง บริเวณอวัยวะเพศ บางรายมีรอยโรคที่ปอด

P. insidiosum ที่ก่อโรคในคน แบ่งได้เป็น 3 รูปแบบ ดังนี้

1. รอยโรคที่ผิวหนัง (cutaneous หรือ subcutaneous form) เป็น infiltration lesion ที่ผิวหนัง ลักษณะแข็งดาน เป็นเรื้อรัง และเจ็บ เริ่มต้นเป็นตุ่มเล็กๆ ต่อมาใหญ่ขึ้นกลายเป็น แผลแกรนูโลมา แผลอาจแตกเป็น ulcer และมี fibrosis การตอบสนองของร่างกายคล้ายกับที่พบใน equine pythiosis พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ eosinophils, macrophages, multinucleated giant cells ผู้ป่วยมักมีประวัติเคยลงว่ายน้ำในหนองน้ำมาก่อน

2. รอยโรครุนแรงแบบแพร่กระจาย (systemic หรือ progressive form) รอยโรคจะเป็นที่หลอดเลือด โดยเริ่มที่ small blood vessel ก่อนแล้วไปที่ artery มี arterial inflammation เกิด arteritis มี thrombus เกิดการอุดตันของเส้นเลือด มีการโป่งพองของเส้นเลือด (aneurysm) และเกิด gangrene โรคเป็นถึงกระดูก ในรายที่เป็นรุนแรงรอยโรคจะลามไปถึง arterial aorta ผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ด้วยอาการของเส้นเลือดอุดตันที่ขา จนเป็น gangrene และต้องทำการตัดขา (AK amputation) ที่น่าสนใจคือ ผู้ป่วยทั้ง subcutaneous และ progressive pythiosis ทุกรายจะเป็นร่วมกับโรค thalassemia hemoglobinopathy syndrome รอยโรคในผู้ป่วยแบบ subcutaneous อาจเป็นที่แขน หรือขา ส่วนแบบ progressive เท่าที่พบเป็นที่ขา และอัตราการตายสูง

3. รอยโรคที่กระจกตา (ophthalmic หรือ corneal ulcer หรือ keratitis) ผู้ป่วยในกลุ่มนี้อาจไม่เป็นโรค thalassemia ก็ได้ อาการของโรคไม่แตกต่างจากโรคกระจกตาอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา อาการอาจรุนแรงจนถึงกับต้องผ่าตัด remove ลูกตา ผู้ป่วยมักให้ประวัติฝังเข้าตา น้ำในนากระเด็นเข้าตา มีอาการเคืองตา ปวดตา การเห็นเลวลง⁽¹⁹⁾

โรค pythiosis insidiosi ที่มีรายงานในคน

รายงานแรกจากสาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เมื่อประมาณ พ.ศ. 2528 เป็นผู้ป่วยชายไทย 2 ราย ซึ่งเชื้อสาเหตุมารายงานโดย De Cock และคณะในปี 1987 (พ.ศ. 2530) ว่าเป็น *P. insidiosum* ทั้งสองรายนี้มีรอยโรคที่ผิวหนังชั้นลึกและเป็นร่วมกับโรค thalassemia ต่อมาในช่วงปี 1987-1989 มีรายงานพบอีก 5 รายที่โรงพยาบาลรามาธิบดี เป็นแบบรุนแรงแตกต่างไปจาก 2 รายแรก และยังคงพบว่าผู้ป่วยเป็นโรคนี้นับร่วมกับ thalassemia นอกจากนี้ ในช่วงปี 1988 มีผู้ป่วยด้วยโรคนี้อีก 2 รายที่โรงพยาบาลศิริราช เป็นแบบรุนแรงและพบร่วมกับโรค

thalassemia เช่นเดิม ที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีรายงานพบโรค pythiosis จำนวน 4 ราย ในช่วงระยะเวลา 1 ปี ผู้ป่วยทุกรายเป็น thalassemia อยู่เดิม มาโรงพยาบาลด้วยภาวะ เส้นเลือดอุดตันเรื้อรัง และขาเน่าในคนอายุน้อย โดยมีรายงานพบผู้ป่วยด้วยโรคนี้กันเพิ่มขึ้น จนถึง ปัจจุบันไม่ต่ำกว่า 102 ราย และส่วนมากเป็นรายงานจากประเทศไทยที่ผู้ป่วยมักมีโรคเดิมคือ thalassemia ⁽²⁰⁾ ซึ่งจากการศึกษาของ Wanachiwanawin ได้จัดว่า pythiosis เป็น unique infection ของโรคนี้ ⁽²¹⁾

เกี่ยวกับ pathophysiology ของโรค pythiosis ในผู้ป่วย thalassemia มีผู้ศึกษาในเรื่องนี้ ได้แสดงให้เห็นว่า เลือดของผู้ป่วย thalassemia อาจจะมีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *P. insidiosum* โดย *P. insidiosum* สามารถเจริญบน RPMI 1640 agar ที่เติมซีรัมของผู้ป่วย thalassemia ได้ดีกว่า media ชนิดเดียวกันแต่เติมซีรัมของคนปกติลงไป ⁽²²⁾

อย่างไรก็ตาม เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2546 มีรายงานทาง internet เกี่ยวกับผู้ป่วยที่เป็น โรค pythiosis ซึ่งไปรับการรักษาที่โรงพยาบาลรามาริบัติ ต้องทำการผ่าตัดขา ซึ่งไม่มีรายงานว่า ผู้ป่วยรายนี้เป็นโรค thalassemia ด้วยหรือไม่ ⁽²³⁾

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. การย้อม สิ่งส่งตรวจอาจเป็นรอยโรคที่ผิวหนังชั้นลึก เช่น biopsy หรือแผล ulcer ในบาง ราย สำหรับรายที่เป็นรุนแรงแบบแพร่กระจาย เชื้อเข้าหลอดเลือด ให้นำก้อน thrombus ที่พบใน บริเวณที่มี aneurysm มาตรวจหาเชื้อราโดยวิธีง่ายๆ คือทำ KOH preparation จะพบสายราขนาด ใหญ่เป็นท่อนสั้นหรือยาว มักไม่เป็นท่อนตรงแต่หักงอไปมา ส่วนที่มีการแตกแขนงจะแตกแขนง แบบตั้งฉาก พบผนังกันห้องภายในสายราได้บ้าง การตรวจทางพยาธิวิทยาขึ้นเนื้อย้อมด้วยวิธี Gomori methenamine silver (GMS) จะพบสายราชนิดไม่มีผนังกันหรือมีผนังกันภายในสายเพียง บางส่วน (sparsely septate) ผนังบาง การย้อมด้วยวิธี Periodic Acid Schiff (PAS) ย้อมติดเชื้อได้ แต่ ไม่ค่อยดีนัก ถ้าย้อมด้วยวิธี hematoxylin-eosin (H&E) จะตรวจพบเชื้อได้แต่พบยากขึ้น เนื่องจาก เชื้อย้อมติดสี H&E ไม่ดี เชื้ออยู่ใน giant cell ที่ผนังหลอดเลือดพบมี inflammatory response มี cellular infiltration ทั้งของนิวโทรฟิลและอีโอซิโนฟิลและมี granulomatous inflammation ไม่พบ Splendore Hoeppli phenomenon หรือ asteroid body (ซึ่งตรวจพบได้ใน equine pythiosis)

2. การเพาะเชื้อ เชื้อเจริญง่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar ที่อุณหภูมิ 25°C หรือ 37°C ให้โคโลนีสีขาวหรือครีม แบบ glabrous ต่อมาฟู ไม่พบสปอร์ มีแต่สายราขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 μm เชื้อสร้างสปอร์ได้เมื่อเลี้ยงใน water หรือ water-agar culture ที่อุณหภูมิ 25-37°C ในที่มีด บางสายพันธุ์สร้างสปอร์ได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37°C โดยเลี้ยงเชื้อบนเศษใบไม้ หรือ

บนชิ้นวุ้นเล็กๆ ลอยในน้ำกลั่นหรือ soil extract (สารสกัดจากดิน น้ำดิน 400 กรัม ต้มน้ำ 1 ลิตร กรองและนึ่งฆ่าเชื้อ) เชื้อสร้าง zoosporangium และ zoospores ชนิด biflagellate จำนวนมาก เชื้อนี้ตายง่ายเมื่อแยกจากผู้ป่วย สิ่งที่ต้องมาตรวจเมื่อนำลงเพาะในวุ้นซาบูโรหรือวุ้นแป้งข้าวโพดต้องผสมยาปฏิชีวนะ เช่น chloramphenicol ลงไปด้วยเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ต้องไม่ใช้ในฟอर्मาลิน

3. การกระตุ้นให้เชื้อสร้าง zoospore เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำ สายเจริญเต็มที่เกิด vesicle รูปกลมหรือรี มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 30-60 μm ภายใน vesicle สร้าง zoospores ซึ่งมีขนาด (flagella) 2 เส้น เมื่อ vesicle แก่ ผนังแตก ปล่อย zoospores ขนาดประมาณ 6-8 x 12-14 μm ซึ่งจะติดกับใบหญ้า ผสมคนหรือขนม้า ที่นำมาใส่ไว้ในน้ำ นำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

zoospores เกิดได้ดีเมื่อนำเชื้อลงเพาะใน 2% water agar pH 6.9 นำใบหญ้าที่ต้มแล้ววางลงบนวุ้นบ่มจนเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C วันรุ่งขึ้นถ่ายใบหญ้าลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายของ K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{CL}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 มล. Zoospores จะเกิดได้ดีเมื่อบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C ประมาณ 1 ชั่วโมงจะตรวจพบ zoospores ได้ แต่ละ sporangium ให้ 5-10 zoospores ซึ่งจะว่ายน้ำในน้ำประมาณ 15-25 นาที แล้วกลายเป็น cyst

4. การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา ⁽²⁴⁾

- Immunodiffusion test (ID) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม ได้นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและติดตามผลการรักษา human pythiosis ชนิด cutaneous or subcutaneous pythiosis และ systemic pythiosis ที่มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างดี สามารถทดสอบได้ง่ายและรวดเร็ว การตรวจวิธีนี้ใช้ antigen 2 ชนิดคือ trypsin antigen ซึ่งได้จากการใช้ enzyme trypsin มาย่อยสายราของตัวเชื้อ ผลบวกของการทดสอบโดยใช้ trypsin antigen จะให้ single precipitin band แต่พบว่า antigen ตัวนี้ไม่ค่อยมีความคงตัว จึงไม่ค่อยได้รับความนิยมเท่าที่ควร antigen อีกชนิดหนึ่งที่ใช้กันอยู่คือ culture filtrate antigen (CFA) โดยเตรียมจากการ freeze-thawed เชื้อ *Pythium insidiosum* ที่เลี้ยงใน liquid culture ผลบวกที่ได้จากการทดสอบด้วย antigen ชนิดนี้จะให้ 3-6 precipitin band แต่การเกิดจำนวน precipitin band ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค แต่ระดับของ antibody titer ที่เพิ่มขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกที่ดีขึ้นของผู้ป่วย นอกจากนี้ antigen ชนิดนี้ยังมีข้อดีคือมีประสิทธิภาพในการตรวจพบการเกิด precipitin band และมีความคงตัวสูง

อย่างไรก็ตาม ID test จะให้ผลลบกับผู้ป่วย ophthalmic pythiosis ทุกราย และการศึกษาของ Mendosa ยังชี้ให้เห็นถึง sensitivity ที่ไม่พอเพียงของ Immunodiffusion test (ID)

- Fluorescence-antibody technique เป็นวิธีการทดสอบเพื่อใช้ในการวินิจฉัยและแยกสาเหตุของโรค pythiosis ที่มีการติดเชื้อในคนและสัตว์ออกจากกัน เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและ

อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้เฉพาะในงานศึกษาวิจัยทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น

- Complement fixation test เป็นวิธีที่เคยใช้ในการวินิจฉัยโรค pythiosis ที่เกิดในม้า ซึ่งมีการใช้เฉพาะในประเทศออสเตรเลียเท่านั้น แต่เป็นวิธีที่ไม่ค่อยจำเพาะ เพราะให้ผลบวกกับซีรัมของม้าซึ่งหายจากการติดเชื้อแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีนี้มีความไวต่ำด้วย

- Immunohistochemical Assays เป็นการวินิจฉัยโดยใช้เนื้อเยื่อของคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ โดยการทำ biopsy สามารถทำได้ 2 วิธี คือ Immunoperoxidase test และ Immunofluorescence test ซึ่งทั้ง 2 วิธีสามารถวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว และสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกได้ มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีขนาดเล็ก เพราะต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง

- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่เพิ่งได้รับการพัฒนาเมื่อไม่นานมานี้ ซึ่งแต่ก่อนยังไม่เคยมีการใช้ทดสอบในคน แต่เคยใช้ทดสอบในการวินิจฉัย pythiosis ในม้า จากการศึกษาของ Theerapong และคณะซึ่งได้นำวิธี ELISA มาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วย pythiosis พบว่าเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการวินิจฉัย human pythiosis⁽²⁵⁾

5. การตรวจวินิจฉัยทาง molecular การวินิจฉัยโรคติดเชื้อในมนุษย์ ด้วยเทคนิคทาง molecular ได้มีความสำคัญและถูกนำมาใช้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การวินิจฉัยตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงยาก อีกทั้งเทคนิคการวินิจฉัยที่อาศัยพื้นฐานทาง molecular ก็เหมาะสมที่จะนำไปวินิจฉัยโรค invasive mycoses ที่ลักษณะทาง histologic อย่างเดียวให้การวินิจฉัยไม่ได้ หรือในกรณีที่เป็นการยากที่จะให้การวินิจฉัย genus หรือ species จากการ culture โดยอาศัยลักษณะทางรูปร่าง หรือ colony นอกจากนี้เทคนิคทาง molecular ยังมีความจำเพาะมากกว่าในการแยกเชื้อในระดับ genus , species หรือ strain โดยการอาศัยความแตกต่างของ DNA⁽²⁶⁾

การรักษา

เนื่องจากผนังเซลล์ของ *P. insidiosum* ประกอบด้วย cellulose การใช้ยาต้านเชื้อราจึงไม่ได้ผล ได้มีการทดสอบยาต้านเชื้อราชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ทางห้องปฏิบัติการ พบว่า amphotericin B ไม่ได้ผล ส่วนยาในกลุ่ม azoles สามารถทำลายเชื้อได้ในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งอาจเป็นพิษต่อร่างกายคน การรักษาแบ่งตามรูปแบบการเกิดโรคได้ดังนี้

1. โรคที่ผิวหนัง

การใช้ saturated solution of potassium iodide (SSKI) ขนาด 1-3 มล. วันละ 3 ครั้ง ได้ผลดี อาการไม่กลับซ้ำภายในเวลา 1 ปี นอกจากนี้มีรายงานการใช้ amphotericin B ขนาด 0.5 มก. / กก. / วัน ทางหลอดเลือดดำ ร่วมกับ flucytosine ขนาด 150 มก. / กก. / วัน และ hydrocortisone ขนาด 50 มก. / กก. / วัน ระยะเวลา 5-6 สัปดาห์ ได้ผลเช่นกัน

2. โรคตามระบบหรือโรคในเส้นเลือด

การผ่าตัดบริเวณที่มีการอักเสบของเส้นเลือดแดงออกให้หมดและต้องตัดให้เหนือตำแหน่งที่มีการอุดตันประมาณ 10 ซม. เนื่องจากตำแหน่งที่เป็นโรคมักพบบริเวณขา ผู้ป่วยต้องตัดขา บางรายแนะนำให้ SSKI ก่อนทำการผ่าตัดและหลังผ่าตัดอีกหลายเดือน

3. โรคที่กระดูกตา

โรคนี้มีการพยากรณ์โรคไม่ดี ต้องให้การวินิจฉัยโรคโดยเร่งด่วนและทำการผ่าตัดตำแหน่งที่เป็นโรคออกก่อนที่พยาธิสภาพจะลุกลามลงไปได้กระดูกตา ถ้าพยาธิสภาพถึงเบ้าตาที่ต้องควักตาออก

การรักษาทางอิมมูโนวิทยา

เมื่อเร็วๆ นี้ มีการพัฒนาวัคซีนรักษาโรค pythiosis โดย Mendoza และคณะ โดยวัคซีน (*Pythium insidiosum* - vaccine : PIV) มีกลไกไปเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งทดลองใช้กับม้าและสุนัขที่เป็นโรคนี้ ผลปรากฏว่ารักษาม้าที่เป็นโรคได้ร้อยละ 72 และรักษาสุนัขที่เป็นโรคได้ร้อยละ 33⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ Alexandre และคณะ ได้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย *Pythium insidiosum* Antigens ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การใช้แอนติเจนที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถกระตุ้น immunologic response (IgG) ได้ ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษา⁽²⁸⁾ โดยได้มีการทดลองใช้วัคซีนที่ผลิตขึ้นสำหรับใช้กับม้ามาใช้กับผู้ป่วยเด็กชายไทยเป็น thalassemia และได้ตัดม้ามไป 4 ปี ก่อนการติดเชื้อ *P. insidiosum* โดยลงเล่นน้ำในบริเวณที่น้ำท่วม มาด้วยผิวหนังอักเสบที่ต้นคอ พบว่ามี aneurysm ที่หลอดเลือดแดง external carotid ข้างซ้ายได้รับการรักษาด้วย amphotericin B, iodides, ketoconazole และผ่าตัดเอา aneurysm ออก แต่ยังพบเชื้อในผนังหลอดเลือดอยู่ซึ่งไม่สามารถทำการผ่าตัดได้อีก จึงใช้วัคซีนดังกล่าวฉีดได้ผิวหนังที่ไหล่ พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งนับเป็นรายแรกของโลกในคนที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีนี้ ซึ่งคงต้องมีการพัฒนาต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. organisms เชื้อ *P. insidiosum* 34 สายพันธุ์ เชื้อราอื่นๆ 23 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์
ดังนี้

เชื้อ *P. insidiosum*

1. *P. insidiosum* CBS 673.85 [Kr]
2. *P. insidiosum* M29 [MU]
3. *P. insidiosum* MCC 1 [S-T]
4. *P. insidiosum* MCC 9 [LA]
5. *P. insidiosum* MCC 10 [PC]
6. *P. insidiosum* MCC 11 [RT]
7. *P. insidiosum* MCC 2(477-35) [S-Ko]
8. *P. insidiosum* MCC 3 [BC]
9. *P. insidiosum* MCC 4 [BS]
10. *P. insidiosum* MCC 5 [P-L]
11. *P. insidiosum* MCC 6 [PYII]
12. *P. insidiosum* MCC 7 [PU]
13. *P. insidiosum* MCC 8 [To]
14. *P. insidiosum* SIMI 18093 [J-J]
15. *P. insidiosum* SIMI 3306-44 [J-U]
16. *P. insidiosum* SIMI 348-37 [D-C]
17. *P. insidiosum* SIMI 6666 [C-R]
18. *P. insidiosum* SIMI 10201 [N-N]
19. *P. insidiosum* SIMI 149-41 [K-S]
20. *P. insidiosum* SIMI 16068 [N-K]
21. *P. insidiosum* SIMI 1839-46 [K-C]
22. *P. insidiosum* SIMI 240-37 [P-D]
23. *P. insidiosum* SIMI 283-40 [P-H]
24. *P. insidiosum* SIMI 2921-45 [H-R]

25. *P. insidiosum* SIMI 2989–42 [L–P]
26. *P. insidiosum* SIMI 322–37 [W–CH]
27. *P. insidiosum* SIMI 4523–45 [J–M]
28. *P. insidiosum* SIMI 4763 [B–J]
29. *P. insidiosum* SIMI 7873 [P–S]
30. *P. insidiosum* SIMI 7874 [P–S]
31. *P. insidiosum* SIMI 8659 [M–K]
32. *P. insidiosum* SIMI 8727 [P–M]
33. *P. insidiosum* SIMI 9642 [O–C]
34. *P. insidiosum* SIMI 9743 [O–C]

เชื้อราอื่นๆ

1. *Absidia* spp.
2. *Aspergillus flavus*
3. *Aspergillus niger*
4. *Basidiobolus ranarum*
5. *Candida albicans*
6. *Candida tropicalis*
7. *Cladosporium carrionii*
8. *Cryptococcus neoformans*
9. *Epidermophyton floccosum*
10. *Exophiala jeanselmei*
11. *Fonsecaea compacta*
12. *Histoplasma capsulatum*
13. *Mucor* spp.
14. *Rhodotorula* spp.
15. *Saccharomyces cerevisiae* (wild type)
16. *Saccharomyces cerevisiae* (diploid sporulate)
17. *Scedosporium apiospermum*
18. *Trichosporon* spp.

19. *Trichophyton rubrum*
20. *Prototheca wickerhamii*
21. *Syncephalastrum* spp.
22. *Penicillium* spp.
23. *Phaeoannellomyces werneckii*

เชื้อแบคทีเรีย

1. *Burkholderia pseudomallei*
2. *Diphtheriae* spp.
3. *Enterococci* spp.
4. *Escherichia coli*
5. *Klebsiella pneumoniae*
6. *Pseudomonas aeruginosa*
7. *Salmonella typhi*
8. *Staphylococcus aureus*
9. *Streptococcus pyogenes*
10. *Streptococcus viridans*

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Blood Agar (BA) (OXOID)
2. LB broth (FLUKA)
3. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (OXOID) ที่เติม Chloramphenicol
4. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (OXOID) ที่เติม Chloramphenicol

3. อุปกรณ์

1. analytical balance (LIBROR AEG-220 Shimadzu corporation JAPAN)
2. autoclave (KOKUSAN Autosteam sterilizer)
3. automatic pipette ขนาด 0.5-10, 10-50, 50-200, 200-1,000 μ l (Biohit Proline FINLAND)
4. beaker ขนาด 50, 100, 600, 1,000, 2,000 ml (PYREX USA.)
5. centrifuge tube ขนาด 15 ml, 50 ml

6. comb
7. cylinder ขนาด 100, 1,000 ml
8. Erlenmeyer flask ขนาด 100 ml (PYREX USA)
9. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml
10. foil
11. fungus incubator (Low temperature incubator 815 precision scientific)
12. high speed refrigerate centrifuge (ALC 4239R)
13. hood
14. hood laminar flow (SterilGARD The baker company)
15. hot air oven
16. magnetic bar
17. magnetic stirrer (Jencons Genesis stirrer ENGLAND)
18. micro tube ขนาด 100 μ l (EPPEN DROF)
19. micro tube ขนาด 1,500 μ l (EPPEN DROF)
20. microwave (SHARP Carousel)
21. needle เข็มฉีดยา
22. parafilm
23. pipette tips
24. rack
25. screw cap tube ขนาด 25×150 mm (PYREX USA)
26. Seropipette ขนาด 10 ml (PRECICOLOR HBG GERMANY)
27. vortex mixer (VERTEX-2 GENIE USA)
28. water bath (Grant Y28)
29. เครื่อง run gel electrophoresis (MINI-SUB CELL GT USA)
30. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA PTC (200 Peltier Thermal Cycler USA)
31. เครื่องถ่ายภาพด้วยคอมพิวเตอร์ (Gel doc 1000 BIO RAD)
32. เครื่องวัดปริมาณ DNA (WPA UV 1101 Biotech photometer)
33. เทปขาว
34. โกร่งบด + สาก
35. กล่องโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง

36. ขนาด ขนาด 40×90 mm
37. ตู้แช่ -20 °C (SANYO)
38. ฝักอช
39. ลูกยาง
40. สำลี

4. สารเคมี

1. 10X buffer (Promega)
2. 70% alcohol
3. 8-hydroxy quinoline (SIGMA)
4. 95% alcohol
5. Agarose gel (Promega USA)
6. boric acid
7. Chloramphenicol (SIGMA)
8. chloroform (JT.BAKER)
9. conc.HCl
10. distilled water
11. DNA marker (1 kb DNA ladder)
12. DNA marker (ØX 174 DNA)(Promega USA)
13. dNTP (Phamacia biotech)
14. EDTA
15. Ethidium bromide
16. Isoamyl alcohol
17. isopropanal
18. isopropyl alcohol (CARLO ERBA Reagent)
19. liquid nitrogen
20. Loading dye
21. mercaptoethanol (SIGMA)
22. $MgCl_2$ (Promega USA)
23. NaOH (JT.baker Sweden)

24. phenol
25. proteinase K (INVITROGEN life technologies)
26. forward primer (CPL 6) 5' GACACAGGGAGGTAGTGA
CAATAAATA 3' PSL1 5'GAATAATAAGAT ACGACCTTGG 3'
(INVITROGEN life technologies)
27. reverse primer (CPR 8) 5' CTTGGTAAATGCTTTCGCCT 3'
(INVITROGEN life technologies)
28. RNase A (AMRESCO)
29. sodium acetate
30. sodium dedocyl sulfat
31. taq DNA polymerase (Promega)
32. Tris-base

5. สิ่งส่งตรวจ

ชิ้นเนื้อจากคนไข้ pythiosis, candidosis ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. อังคณา นายประเสริฐ จำนวน 6 ตัวอย่าง

วิธีการศึกษา

การ design primer

ได้เข้าไปใน URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> เพื่อหาลำดับเบสของ 18S rRNA gene ของเชื้อต่าง ๆ ซึ่งได้นำลำดับเบสของเชื้อ 98 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย Pythium 7 สายพันธุ์ เชื้อราอื่น ๆ ที่มีการก่อโรคคล้าย pythiosis 89 สายพันธุ์ คน 2 สายพันธุ์ มาทำ alignment เพื่อหาตำแหน่งที่เป็น conserve และ variable ลำดับเบสที่นำมาใช้ปรากฏในตาราง 1

ตาราง 1 รายชื่อเชื้อที่นำข้อมูลมาจาก GenBank

No.	Organisms	Accession No.
1	<i>Absidia corymbifera</i>	AF113408
2	<i>Ahnfeltia plicata</i>	Z14139
3	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	U57101
4	<i>Amaurascopsis perforatus</i>	AJ315171
5	<i>Apophysomyces elegans</i>	AF113412
6	<i>Arachniotus ruber</i>	AJ315166
7	<i>Archaeospora leptoticha</i>	AB015052
8	<i>Arthrobotrys dactyloides</i>	AJ001997
9	<i>Arthrobotrys superba</i>	AJ 001989
10	<i>Arxula adenivorans</i>	AB000659
11	<i>Ascotricha lusitanica</i>	AB048282
12	<i>Aspergillus flavus</i>	D63696
13	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AB008401
14	<i>Aspergillus nidulans (Emericella nidulans)</i>	X78539
15	<i>Aspergillus nidulans mt small ribosomal subunit</i>	J01393
16	<i>Aspergillus niger</i>	D63697
17	<i>Aspergillus terreus</i>	AF516138
18	<i>Auricularia auricula-judae (ear fungus)</i>	L22254
19	<i>Auricularia polytricha</i>	L22255
20	<i>Basipetospora variabilis</i>	AF437892
21	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	M63096
22	<i>Byssoascus striatosporus</i>	AJ315170
23	<i>Byssoonygena ceratinophila</i>	AJ315176
24	<i>Candida albicans</i>	AF114470
25	<i>Candida glabrata</i>	AY046237
26	<i>Candida lusitaniae</i>	M55526

No.	Organisms	Accession No.
27	<i>Candida maltosa</i>	D14593
28	<i>Candida parapsilosis</i>	AY055857
29	<i>Castanedomycetes australiensis</i>	AJ315177
30	<i>Ceriporia purpurea</i>	AB084586
31	<i>Cryptococcus albidus</i>	AB084586
32	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	AJ560316
33	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	AF113421
34	<i>Duddingtonia flagrans</i>	AJ001895
35	<i>Endomyces scopularum</i>	AF267227
36	<i>Eremothecium gossypii</i>	AF113137
37	<i>Euscomycete</i> spp. K89	AB016175
38	<i>Exophiala jeanselmei</i>	X80705
39	<i>Fonsecaea pedrosoi</i> nuclear	AJ232949
40	<i>Fusarium solani</i>	E17084
41	<i>Geomyces asperulatus</i>	AB016173
42	<i>Geosiphon pyriforme</i>	X86686
43	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	AB084611
44	<i>Glomus versiforme</i>	X86687
45	<i>Gymnoascus reesii</i>	AJ315169
46	<i>Histoplasma capsulatum</i> DNA	X58572
47	<i>Histoplasma capsulatum</i> spp. <i>duboisii</i>	Z75306
48	Human	M10098
49	Human	K03432
50	<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	Y17504
51	<i>Leptosphaeria bicolor</i>	U04202
52	<i>Leptosphaeria maculans</i>	U04238
53	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	U04235
54	<i>Madurella mycetomatis</i>	AF527881

ตาราง 1 รายชื่อเชื้อที่นำข้อมูลมาจาก GenBank (ต่อ)

No.	Organisms	Accession No.
55	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	AF487274
56	<i>Microsporium canis</i>	AY083227
57	<i>Monacrosporium ellipso sporum</i>	AJ001995
58	<i>Monilia pruinosa</i> sensu <i>Gilman</i>	AF437893
59	<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	AF113427
60	<i>Mucor ramosissimus</i>	AF113431
61	<i>Muscodor</i> spp. A3-5	AH010859
62	<i>Neosartorya fischeri</i>	U21299
63	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	D85136
64	<i>Paecilomyces variotii</i>	Y13996
65	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AF241655
66	<i>Penicillium marneffe</i>	AF034197
67	<i>Pestalospaeria hansenii</i>	AF242846
68	<i>Pestalospaeria</i> spp. NE-32	AF104356
69	<i>Phanerochaete magnoliae</i>	AB084596
70	<i>Phialophora verrucosa</i> nuclear	AJ232945
71	<i>Phlebia chrysocreas</i>	AB084601
72	<i>Protomyces inouyei</i>	D11377
73	<i>Pseudallescheria boydii</i>	U43913
74	<i>Pythium insidiosum</i>	AF221847
75	<i>Pythium insidiosum</i>	AF289981
76	<i>Pythium insidiosum</i>	AF442497
77	<i>Pythium monospermum</i>	AJ238653
78	<i>Pythium myriotylum</i>	E17133
79	<i>Pythium spinosum</i>	E17134
80	<i>Pythium ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	AF452163

No.	Organisms	Accession No.
81	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Z74483
82	<i>Rhizoctonia solani</i>	E17098
83	<i>Rhizopus oryzae</i>	AF113440
84	<i>Rhodotorula glutinis</i>	AB021869
85	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Z75578
86	<i>Saksenaea vasiformis</i>	AF113442
87	<i>Sclerotium</i> spp. BSC- 97	AF010303
88	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	AY083220
89	<i>Septoria nodorum</i>	U04236
90	<i>Sordariomycete</i> spp.	AF292054
91	<i>Sporothrix schenckii</i>	M85053
92	<i>Stephanoascus farinosus</i>	AB000660
93	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	X89437
94	<i>Talaromyces flavus</i>	M83262
95	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	AY083233
96	<i>Trichophyton rubrum</i>	X58570
97	<i>Trichophyton tonsurans</i>	AY083229
98	<i>Trichosporon cutaneum</i>	AB001753

การเตรียมสิ่งส่งตรวจจำลอง

ได้มีการจำลองสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด โดยนำเลือดคนปกติมาใส่เชื้อ *P. insidiosum* (SIMI 7874) 0.028 กรัม, *P. insidiosum* (MCC2) 0.038 กรัม, *A. niger* 0.01 กรัมลงในเลือดของคนปกติ จากนั้นทำการdilute ส่วนผสมของเลือดและเชื้อในแต่ละสายพันธุ์แบบ 10 fold dilution นำแต่ละ dilution ไปสกัด DNA และตรวจหาจากวิธีที่ทำการศึกษาต่อไป

การเพาะเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *P. insidiosum* ทุกสายพันธุ์บน SDA ที่ 25°C เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วตัดก้อนวัณ SDA ที่เชื้อเจริญขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำไปใส่ใน SDB 250 ml ซึ่งบรรจุอยู่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml จากนั้น incubate SDB นี้ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการ shaking เป็นระยะ ๆ ส่วนเชื้อ bacteria นั้น นำไปเลี้ยงใน BA แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24

ชม. แล้วเลือก 3 colony มาใส่ TSB เลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน ที่ 37°C กรอง pellet ที่ได้ด้วย whatman No. 1 นำ pellet ไปล้างและสกัด DNA ต่อไป

การสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจ

ตัดชิ้นเนื้อจากคนไข้ให้มีน้ำหนัก 0.02-0.03 g จากนั้นตัดให้เป็นเศษเล็ก ๆ จนละเอียดที่สุดที่จะทำได้ แล้วใส่ extraction buffer ลงไปพร้อมกับ Proteinase K และ RNase A โดย incubate ที่ 50-60°C เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำไปใส่ phenol/chloroform / isoamyl alcohol เขย่าแรง ๆ เพื่อสกัดเอาโปรตีนออก แล้วจึงตกตะกอน DNA ด้วย ethanol จากนั้นจึงเก็บ DNA ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

สิ่งส่งตรวจจำลองที่ทำขึ้นโดยการใส่เชื้อลงไปในเลือดคนปกติได้สกัด DNA ด้วย Flexi Gen DNA Kit (Quiagen) ตาม protocol ที่มีมากับ kit

การหา condition ที่เหมาะสมในการทำ semi-nested PCR

DNA ที่สกัดได้แล้วถูกนำมาใช้กับ CPL6, CPL1 และ CPR8 primer ด้วยวิธี Semi-nested PCR คือมี primer 3 primer ใน 1 หลอด โดยลำดับการทดลองจะต้องหาปริมาณที่เหมาะสมของ CPL6 primer, จำนวนรอบที่จะทำการ amplified, ปริมาณ MgCl₂, ปริมาณ Taq DNA polymerase และปริมาณ dNTP ที่จะต้องใช้ โดยสารแต่ละชนิดจะถูกนำมาทดสอบที่ปริมาณต่าง ๆ กันตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัจจัยต่าง ๆ ที่นำมาใช้ศึกษา

สาร/condition	ปริมาณที่ใช้ทดลอง						หน่วยที่ใช้
CPL6 primer	1	5	10	15	20	25	p mole
จำนวนรอบของการ amplified	-	20	-	-	30	-	รอบ
MgCl ₂	1.5	2	2.5	3	3.5	-	mM
Taq Polymerase	-	1	-	-	2	-	unit
dNTP	0	2	0.3	0.4	0.5	-	mM

การหา sensitivity

ได้ทำการหา ทั้งจาก purified DNA และจากสิ่งส่งตรวจจำลอง ดังนี้

จาก purified DNA ทำการ dilute ปริมาณ DNA ของ *P. insidiosum* แบบ 10 fold serial dilution เริ่มจาก 10 ng จนถึง 100 fg แล้วจึงนำแต่ละ dilution ไปทำการตรวจจากวิธีที่ทำการศึกษา เพื่อจะได้ทราบปริมาณ DNA น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้

จากสิ่งส่งตรวจจำลอง ได้ใส่เชื้อ *P. insidiosum* (SIMI 7874) 0.028 กรัม และ *P. insidiosum* (MCC2) 0.038 กรัม ลงในเลือดของคนปกติ จากนั้นทำการ dilute ส่วนผสมของเลือดและเชื้อในแต่ละสายพันธุ์แบบ 10 fold dilution นำแต่ละ dilution ไปสกัด DNA และตรวจหาจากวิธีที่ทำการศึกษาต่อไป (Yields ที่ได้จากการสกัด purified DNA ของ *P. insidiosum* SIMI 7874, และ *P. insidiosum* MCC2 ในการวิจัยครั้งนี้ คือ 3.48 และ 26.36 $\mu\text{g}/\text{gram}$ wet weight ตามลำดับ ดังนั้นใน dilution แรกควรจะมี DNA 100 ng)

การหา specificity

ได้ทำการศึกษาทั้งจาก purified DNA และจากสิ่งส่งตรวจ

โดยจาก purified DNA ใช้ DNA ของเชื้อราชนิดอื่นๆ, แบคทีเรีย, คน ปริมาณอย่างละ 100 ng ในการ amplified เพื่อให้แน่ใจว่าการศึกษานี้จะไม่มี cross reaction กับเชื้ออื่น ๆ

จากสิ่งส่งตรวจได้นำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่เป็น candidiasis มาทดสอบ และได้ทำสิ่งส่งตรวจจำลองที่ใส่เชื้อ *A. niger* 0.01 กรัม ลงในเลือดของคนปกติ จากนั้นทำการ dilute ส่วนผสมของเลือดและเชื้อแบบ 10 fold dilution นำแต่ละ dilution ไปสกัด DNA และตรวจหาจากวิธีที่ทำการศึกษาต่อไป (Yields ที่ได้จากการสกัด purified DNA ของ *A. niger* ในการวิจัยครั้งนี้ คือ 0.01 $\mu\text{g}/\text{gram}$ wet weight)

ผลการศึกษา

Primers

จากการศึกษาพบว่าการจับคู่กันของ CPL6-CPR8, PSL1-CPR8 จะทำให้ได้ PCR production ขนาด 512 และ 152 bp ตามลำดับ ลำดับเบสของ primer มีดังนี้

primer	Sequence 5'→ 3'	Tm(°C)	% GC
CPL6	GACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATA	76	41
CPR8	CTTGGTAAATGCTTTCGCCT	58	45
PSL1	GAATAATAAGATACGACCTTGG	60	36

Condition ที่ใช้ทำ PCR

พบว่า condition ที่เหมาะสมในการทำ PCR และสารต่าง ๆ ที่จะต้องใช้คือ

CPL 6 primer ใช้ปริมาตร 5 pmole

จำนวนรอบที่ใช้ในการ amplified สำหรับ profile ที่ 1 คือ 30 รอบ

ปริมาณ $MgCl_2$ ใช้ปริมาตร 2.5 mM

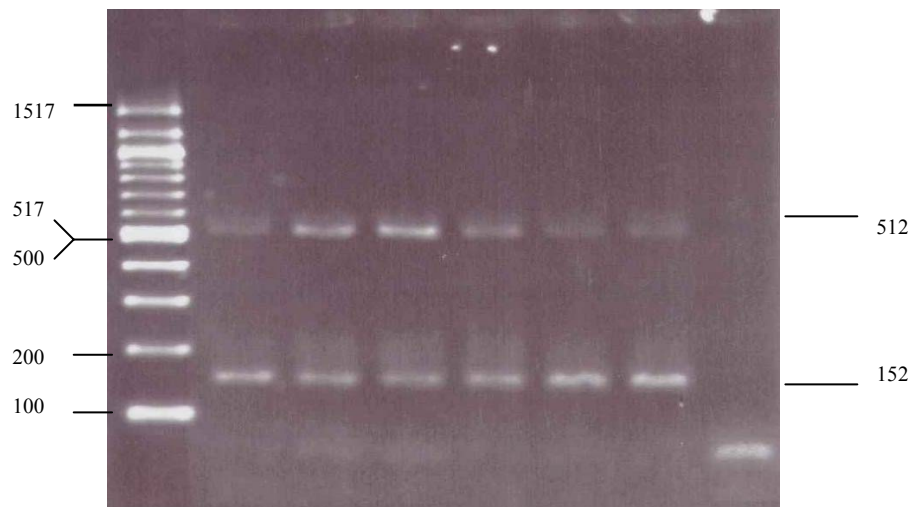
ปริมาณ Taq Polymerase ที่ใช้คือ 1 unit

ปริมาณ dNTP ใช้ปริมาณ 0.5 mM

และ condition ที่ใช้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR

Profile	Primer	Denaturation		Annealing		Extension		No. of cycles
		Temp	Time	Temp	Time	Tem	Time	
		(°C)	(min)	(°C)	(min)	(°C)	(min)	
		95	5	-	-	-	-	1
1	CPL6- CPR8	95	1	68	1	72	1	30
		95	5	-	-	-	-	1
2	PSL1-CPR8	95	1	58	1	72	1	20

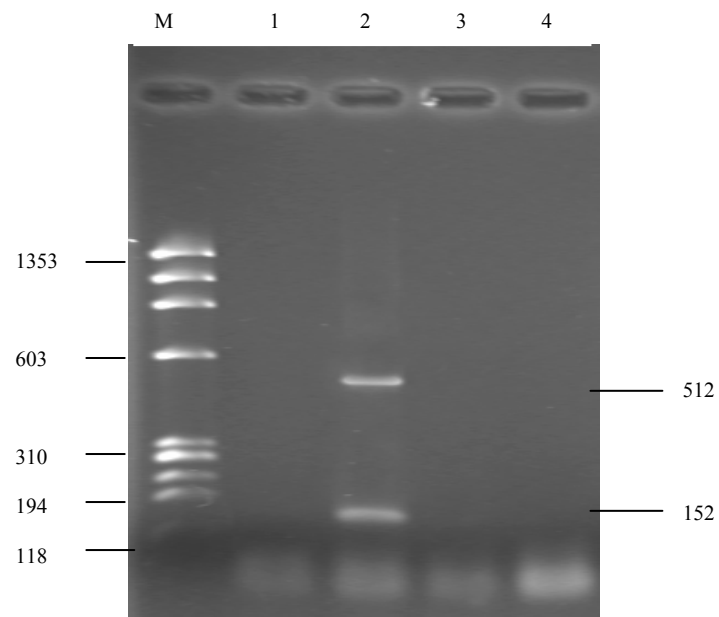


รูปที่ 3 ผลของ CPL 6 primer ที่ปริมาณต่าง ๆ

Lane M: 100 base pair DNA ladder, Lane 1 : CPL6 25 pmole,

Lane 2 : CPL6 20 pmole, Lane 3 : CPL6 15 pmole, Lane 4 : CPL6 10 pmole, Lane 5 :

CPL6 5 pmole, Lane 6 : CPL6 1 pmole and Lane 7: Blank



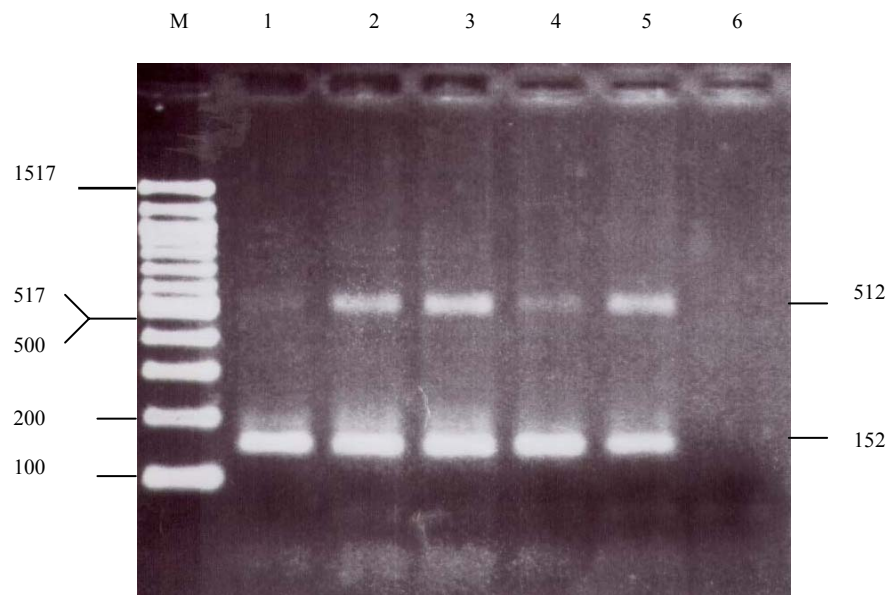
รูปที่ 4 ผลของจำนวนรอบใน profile ที่ 1 ในการ amplified

Lane M : *Hae* III digested ϕ X 174 DNA, Lane 1 : Blank, Lane 2 : Amplification

cycles of 30 cycles in the first profile and 20 cycles in the second profile, Lane 3 :

Blank and Lane 4 : Amplification cycles of 20 cycles in the first profile and 20 cycles

in the second profile

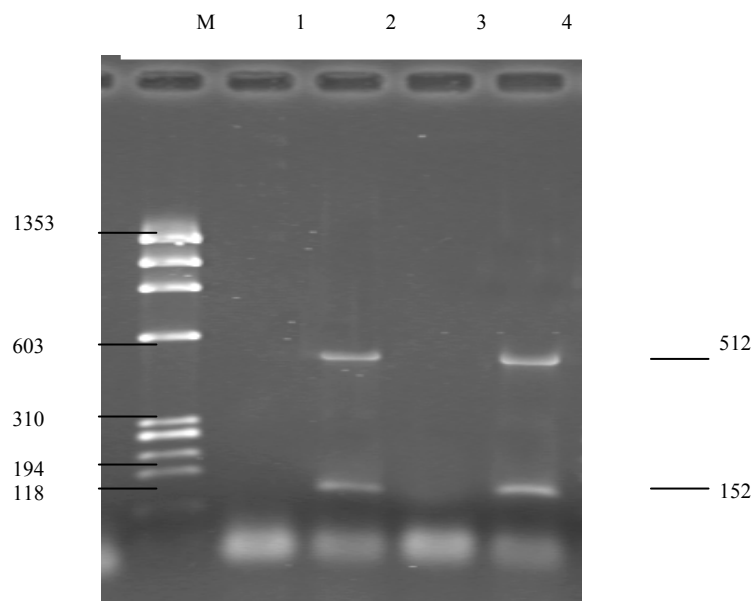


รูปที่ 5 ผลของ MgCl₂ ที่ปริมาณต่าง ๆ

Lane M : 100 base pair DNA ladder, Lane 1: MgCl₂

3.5mM, Lane 2 : MgCl₂ 3.0 mM, Lane 3 : MgCl₂ 2.5 mM, Lane 4 : MgCl₂ 2.0

mM, Lane 5 : MgCl₂ 1.5 mM and Lane 6 : Blank

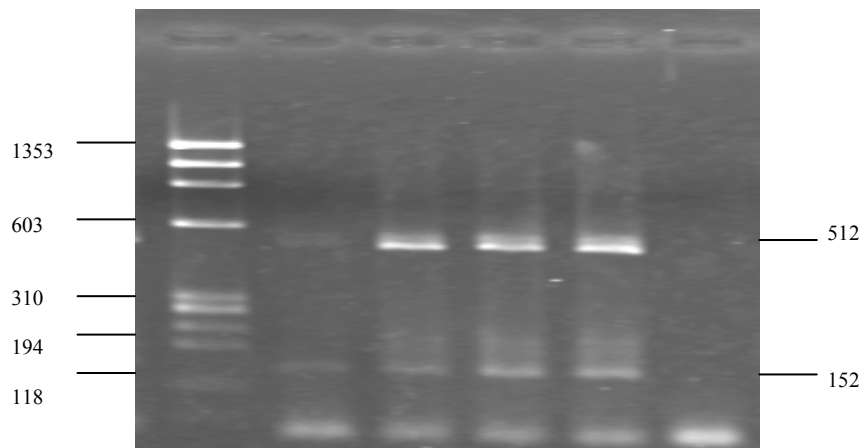


รูปที่ 6 ผลของ Taq polymerase ปริมาณต่าง ๆ

Lane M : *Hae* III digested ϕ X 174 DNA,

Lane 1 : Blank, Lane 2 : *Taq* DNA polymerase 1 unit , Lane 3 : Blank and Lane 4 : *Taq*

DNA polymerase 2 units



รูปที่ 7 ผลของ dNTP ปริมาณต่าง ๆ

Lane M : *Hae* III digested ϕ X 174 DNA, Lane 1: dNTPs 0.2 mM,

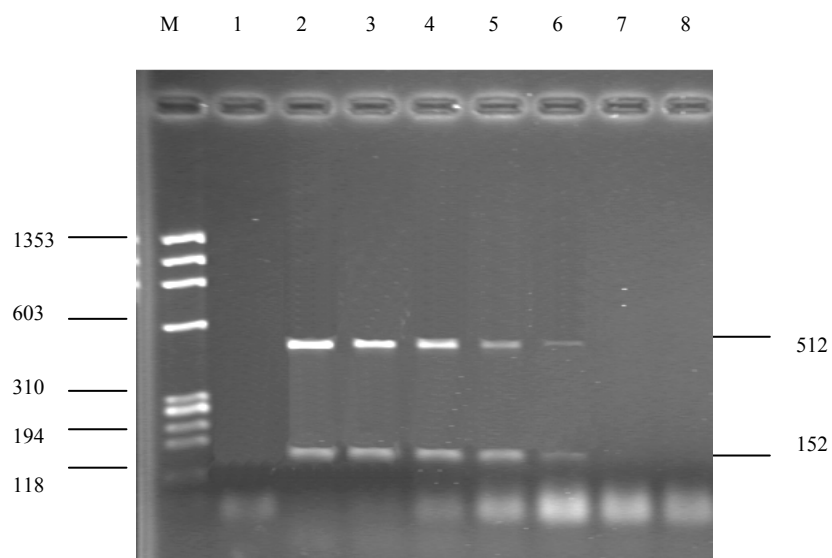
Lane 2: dNTPs 0.3 mM, Lane 3 : dNTPs 0.4 mM, Lane 4: dNTPs 0.5 mM

Lane 5 : Blank

Sensitivity

จากการใช้ purified DNA พบว่าปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจได้คือ 1 pg

จากการใช้เลือดคนปกติที่ได้ DNA ของเชื้อเข้าไปพบว่าเมื่อใช้ *P. insidiosum* SIMI 7874 จะสามารถตรวจได้ปริมาณน้อยที่สุด 10 pg ส่วน *P. insidiosum* MCC2 คือ 1 pg



รูปที่ 8 Sensitivity ของ *P. insidiosum* MCC 2

Lane M : *Hae* III digested ϕ X 174 DNA ,

Lane 1 : Blank, Lane 2 : *P.insidiosum* MCC2 DNA 10 ng,

Lane 3:*P.insidiosum*MCC2 DNA 1 ng,Lane 4 : *P. insidiosum* MCC2 DNA100 pg,

Lane 5: *P. insidiosum* MCC2 DNA 10 pg, Lane 6: *P. insidiosum* MCC2 DNA 1 pg,

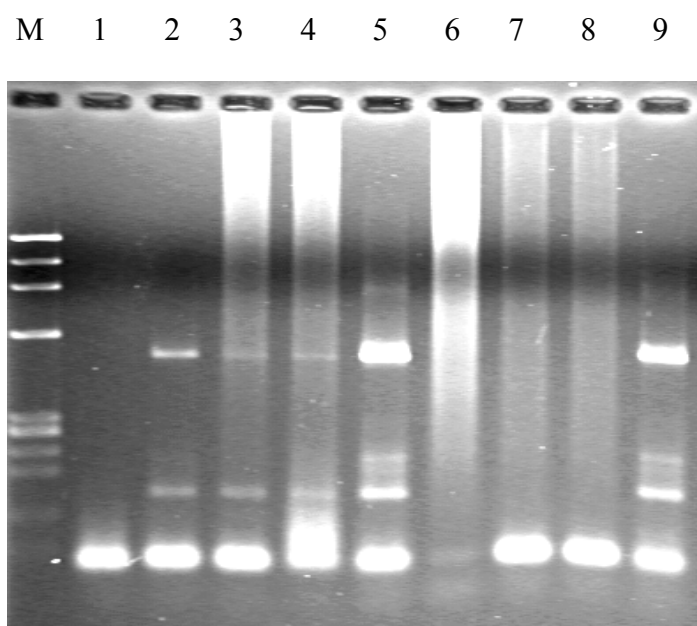
Lane 7: *P. insidiosum* MCC2 DNA 100 fg ,Lane 8: *P. insidiosum* MCC2 DNA 10 fg

Specificity

สามารถ amplified purified DNA ของ *P. insidiosum* ได้ 34 สายพันธุ์ แต่ไม่ amplified purified DNA ของเชื้อราอื่น ๆ bacteria และคนได้ แสดงถึงความจำเพาะของการทดสอบ

ส่วนการใช้สิ่งส่งตรวจจากชิ้นเนื้อคนไข้โรคอื่น ๆ ก็พบว่าไม่สามารถ amplified ได้เช่นกัน

สำหรับสิ่งส่งตรวจจำลองที่ทำขึ้นโดยใส่ DNA ของเชื้อ *A. niger* ก็พบว่าไม่สามารถ amplified ได้เช่นกัน



รูปที่ 9 specificity ของชิ้นเนื้อจากคนไข้

Lane M : *Hae* III digested ϕ X 174 DNA, Lane 1 : Blank,

Lane 2 : Tissue biopsy No. 1 (pythiosis), Lane 3 : Tissue biopsy No. 2

(pythiosis), Lane 4 : Tissue biopsy No. 3 (pythiosis), Lane 5 : Tissue biopsy No. 4

(pythiosis), Lane 6 : Tissue biopsy No. 5 (candidosis), Lane 7 : Tissue biopsy

No. 6 (candidosis), Lane 8 : Healthy human whole blood DNA and Lane 9 :

P.insidiosum MCC2 (control)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้พยายามพัฒนาวิธี one tube seminested PCR ขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *P. insidiosum* จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง โดยไม่ต้องเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจก่อน หมายถึงถ้าในสิ่งส่งตรวจมีเชื้อที่ต้องการตรวจนี้อยู่ก็จะสามารถตรวจพบได้เลย โดยทำการสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งในสิ่งส่งตรวจนั้นจะมีทั้ง DNA ของคน ของเชื้อที่เราจะตรวจปนอยู่ด้วยกัน ถ้าการทดสอบที่ศึกษาอยู่ได้ผลก็จะสามารถทำให้ตรวจหาเชื้อ *P. insidiosum* ได้จากสิ่งส่งตรวจนั้นเลย แต่การทำ PCR นั้นถ้าทำขั้นตอนเดียวอาจจะได้ผลไม่ specific พอ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธี nested PCR ขึ้นมา แต่การทำ nested PCR จะต้องทำการ amplified 2 ครั้ง คือทำการ amplified primer คู่แรกก่อน จากนั้นจึงนำ PCR product นั้นมาเป็น template ของ primer คู่ใน โดยดู PCR product ที่ได้จาก profile ที่ 1 มาใส่ใน reaction mixture ที่จะใช้ในการ amplified ของ profile ที่ 2 ซึ่งการทำเช่นนี้จะทำให้มี contaminate ได้ง่าย ดังนั้น จึงได้มีวิธี one tube nested PCR เกิดขึ้น คือใส่ primer ทั้ง 2 คู่ลงในหลอดเดียวกันหมด แล้วทำปฏิกิริยา 2 profile แต่การทำเช่นนี้ต้องระวังเรื่องการ design primer ที่ใส่เข้าไปทั้งหมด อย่าให้เกิดการจับกันเองของ primer รวมทั้ง condition ที่ใช้ด้วย ต้องปรับให้ดี โดยเฉพาะ annealing temperature ของแต่ละ profile ซึ่งการศึกษานี้ได้มีการดัดแปลงใช้ primer เพียง 3 ข้าง ไม่ใช่ 4 ข้าง โดยทำในหลอดเดียวกัน จึงเรียกว่า one-tube seminested PCR มี primer ทางด้าน forward 2 ข้าง คือ CPL6 และ PSL1 ส่วน primer ทางด้าน reverse มี 1 ข้าง คือ CPR8 ซึ่งทั้ง CPL6 และ PSL 1 สามารถแย่งกันจับกับ CPR8 ได้ จึงต้องทำการหาปริมาณ CPL6 ซึ่งเป็น forward primer ที่อยู่ก่อนให้เหมาะสม โดยปกติการทำ PCR ทั่ว ๆ ไปจะใช้ primer ข้างละประมาณ 25 pmole แต่เนื่องจากการแย่งกันจับของ forward primer 2 ข้างกับ reverse primer ข้างเดียว ดังนั้นจึงต้องการให้ CPL6 ใช้พอดี ใน profile ที่ 1 ไม่ต้องเหลืมาแย่งจับใน profile ที่ 2 อีก จากการศึกษาโดยการ vary ปริมาณ CPL6 ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าให้ผลดีที่สุดที่ 5 pmole ดังได้รายงานไว้ในส่วนผลการทดลองแล้ว เนื่องจากการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่ต้องการนำไปใช้ในสิ่งส่งตรวจโดยตรง จึงได้เก็บสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อมาได้ 6 ตัวอย่าง เป็นชิ้นเนื้อที่ติดเชื้อ *P. insidiosum* 4 ตัวอย่าง และติดเชื้อ *Candida spp* 2 ตัวอย่าง ก็ให้ผลตรงตามที่ต้องการคือตรวจพบความจำเพาะกับชิ้นเนื้อที่ติดเชื้อ *P. insidiosum* เท่านั้น แม้ว่าการศึกษานี้จะมีสิ่งส่งตรวจน้อยแต่ก็ทำได้ตามเป้าที่กำหนดคือจากแบบเสนอโครงการวิจัยที่ส่งให้คณะกรรมการพิจารณาตั้งแต่ยื่นข้อเสนอโครงการก็ได้รายงานสถิติการเป็นโรคนี้ไว้แล้ว ว่าน่าจะมีผู้ป่วยปีละประมาณ 5 ราย ซึ่งสิ่งส่งตรวจที่ได้จากผู้ป่วยจริงๆเก็บได้ 4 ราย ดังนั้นจึงได้ทำสิ่งส่งตรวจจำลองการติดเชื้อขึ้นด้วยอีก 3 ตัวอย่าง ซึ่งก็ได้ผลที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. insidiosum* เท่านั้น จึงนับว่า

การศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง แต่อย่างไรก็ดีควรจะมีการศึกษาใช้กับสิ่งส่งตรวจให้มากกว่านี้ต่อไปในอนาคต

ภาคผนวก

รายการสารเคมี และวิธีการเตรียม

1. TE 10-1 buffer pH 8.0 ปริมาตร 500 ml

ส่วนประกอบ

1 M Tris-HCl

EDTA

conc.HCl

Steriled distilled water

ขั้นตอนการเตรียม

-stock 1 M Tris-HCl pH 8.0 1,000 ml

1. ชั่ง Tris-base 121.14 g ใส่ใน beaker ขนาด 1,000 ml
2. เติม steriled distilled water ปริมาตร 700 ml ใส่ steriled magnetic bar นำไปตั้งบน magnetic stirrer จนละลาย สารละลายจะมี pH ประมาณ 10.5
3. ปรับ pH ด้วย conc.HCl ให้ได้ pH ประมาณ 10.5
4. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 1,000 ml

-stock 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 500 ml

1. ชั่ง EDTA 93.06 g ใส่ใน beaker ขนาด 500 ml
2. เติม steriled distilled water ปริมาตร 300 ml ใส่ steriled magnetic bar นำไปตั้งบน magnetic stirrer จนละลายดี สารละลายจะมี pH ประมาณ 6.5
3. ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH (ละลายเม็ด NaOH ประมาณ 25 เม็ด ในน้ำกลั่นประมาณ 25 ml) ให้ได้ pH 8.0
4. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 500 ml

เมื่อได้สารละลาย 1 M Tris-HCl pH 8.0 และ 0.5 M EDTA pH 8.0 จึงเตรียม TE 10-1 buffer pH 8.0 ปริมาตร 500 ml ดังนี้

1. คูด stock 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 5 ml ใส่ใน beaker ขนาด 500 ml
2. คูด stock 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 1 ml
ปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml โดยเติม steriled distilled water ปริมาตร 494 ml

2. TE-saturated phenol

1. ละลายผลึก phenol ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 °C
2. เติม 8-hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 % (phenol ในขวด 100 g ต้องชั่ง 8-hydroxyquinoline 0.1 g) phenol จะกลายเป็นสีเหลือง
3. เติม 1 เท่าของปริมาตร 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 mix ด้วย magnetic stirrer 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นขำก้น
4. คูด supernate ที่สกัดด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 เท่ากับ 1 เท่า ปริมาตรของสารที่มี mix ด้วย magnetic stirrer 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นขำก้น
5. คูด supernate ที่ให้เหลือสารละลายข้างบนประมาณ 1 cm จากรอยต่อ แล้วเก็บที่ 4 °C

3. 3 M sodium acetate ปริมาตร 20 ml

1. ชั่ง sodium acetate 4.922 g ใส่ใน beaker ขนาด 50 ml
2. เติม steriled distilled water ปริมาตร 20 ml ปรับ เก็บในขวดสีชาหรือหุ้มภาชนะด้วย foil

4. 1 M Tris-HCl pH 7.2 ปริมาตร 500 ml

1. ชั่ง Tris base 60.57 g ใส่ใน beaker ขนาด 500 ml
2. เติม steriled distilled water ปริมาตร 300 ml ปรับ pH ด้วย conc. HCl ให้ได้ pH 7.2
3. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 500 ml

5. 10X TBE buffer 2,000 ml

1. ชั่ง Tris-base 242.18 g ใส่ใน beaker ขนาด 2000 ml
2. Mix ด้วย magnetic stirrer ให้ละลาย
3. ชั่ง boric acid (H_2BO_3) 123.62 g เติมลงไป
4. เติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 80 ml
5. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 2,000 ml

6. 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 500 ml

1. ชั่ง Tris-base 6.06 g ใส่ใน beaker ขนาด 500 ml
2. เติม steriled distilled water ปริมาตร 300 ml mix ด้วย magnetic stirrer ให้ละลาย

3. ปรับ pH ด้วย conc.HCl ให้ได้ pH 8.0

4. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 500 ml

7. 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 500 ml

1. ชั่ง Tris-base 30.29 g ใส่ใน beaker ขนาด 500 ml

2. เติมน้ำ steriled distilled water ปริมาตร 300 ml mix ด้วย magnetic stirrer ให้ละลาย

3. ปรับ pH ด้วย conc.HCl ให้ได้ pH 8.0

4. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 500 ml

8. Lysis buffer ปริมาตร 200 ml

-เตรียม 2 M Tris-HCl pH 7.7 ปริมาตร 100 ml

1. ชั่ง Tris-base 24.23 g

2. เติมน้ำ steriled distilled water ปริมาตร 50 ml mix ด้วย magnetic stirrer ให้ละลาย

3. ปรับ pH ด้วย conc.HCl ให้ได้ pH 7.7

4. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 100 ml

- เตรียม Lysis buffer 200 ml

1. งด 2 M Tris-HCl pH 7.7 ปริมาตร 5 ml

2. งด 0.5 M EDTA ปริมาตร 20 ml

3. เติมน้ำ sodium dodecyl sulfate (SDS) 6 g

4. ปรับปริมาตรด้วย steriled distilled water ให้ครบ 100 ml

9. Proteinase K 5 mg/ml ปริมาตร 10 ml

1. ชั่ง proteinase K 0.05 g ใส่ใน flask ขนาด 10 ml

2. เติมน้ำ reconstituted ตามที่บริษัทแนะนำ ในที่นี้ใช้ของบริษัท Invitrogen จึงเติมน้ำ reconstituted ปริมาตร 10 ml คนให้ละลาย

3. แบ่งใส่ microtube ละ 1 ml

4. เก็บที่ -20 °C

10. RNase A 5 mg/ml

1. ชั่ง RNase A 0.05 g ใส่ใน flask ขนาด 10 ml

2. เติมน้ำ 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 10 ml

3. ต้มในน้ำเดือด 10 นาที เพื่อทำลาย Dnase

4. แบ่งใส่ microtube ละ 1 ml

5. เก็บที่ -20 °C

11. Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 100 ml

1. ตวง chloroform (HCL_3) ปริมาตร 96 ml
2. ตวง isoamyl alcohol ปริมาตร 4 ml
3. คนให้เข้ากัน เก็บที่ 4 °C

12. Sabouraud Dextrose Agar (1000 ml) with chloramphenicol

Dextrose 40 g
Peptone 10 g
Agar 20 g (2% agar)
distilled water 1000 ml
Chloramphenicol 50 mg (0.05 mg/ml)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง dextrose 40 g, peptone 10 g, agar 20 g ใส่ใน beaker ขนาด 2000 ml
2. เติมน้ำ distilled water ปริมาตร 500 ml ใช้ stirring rod คนให้ละลายแล้วเติมน้ำ distilled water ให้ครบ 1000 ml
3. อุ่นใน microwave จนละลายดี
4. ชั่ง Chloramphenicol 50 mg ละลายใน 95% alcohol ปริมาตร 10 ml แล้วผสมใน media ผสมให้เข้ากัน
5. เทใส่ tube ขนาด 20×150 mm tube ละ 20 ml
6. Autoclave ที่ 118 °C เป็นเวลา 10 นาที
7. เอียง slant ปล่อยให้แข็งตัว เก็บในตู้เย็นจนกว่าจะใช้

13. Sabouraud Dextrose Broth (1000 ml) with chloramphenicol

Dextrose 40 g
Peptone 10 g
Distilled water 1000 ml
Chloramphenicol 50 mg (0.05 mg/ml)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง dextrose 40 g, peptone 10 g ใส่ใน beaker ขนาด 2000 ml
2. เติมน้ำ distilled water 500 ml ใช้ stirring rod คนให้ละลายแล้วเติมน้ำ distilled water ให้ครบ 1000 ml
3. อุ่นใน microwave จนละลายดี

4. ชั่ง Chloramphenicol 50 mg ละลายใน 95% alcohol 10 ml แล้วผสมใน media ผสมให้เข้ากัน
5. เทใส่ flask ขนาด 250 ml flask ละ 50 ml
6. ปิดจุก flask ด้วยผ้าก๊อชห่อสำลี
7. Autoclave ที่ 118 °C เป็นเวลา 10 นาที
8. ปล่อยให้เย็น เก็บในตู้เย็น 4 °C จนกว่าจะใช้

14. Blood Agar (1000 ml) (OXOID)

Blood agar base 40 g

Defibrinated blood 50-100 ml.

Distilled water 1,000 ml.

วิธีการเตรียม

1. blood agar base 40 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 1,000 มล. โดยคนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายสม่ำเสมอ
2. เข้า Microwave เพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แทะแม่เหล็ก (magnetic bar) 1 แท่ง ลงใน flask ที่อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4. เข้า Autoclave 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. หลังจาก Autoclave แล้ว นำไปใส่ใน Water bath 45-50 °C
6. เมื่ออุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงถึง 45-50 °C แล้ว เติม defibrinated blood ประมาณ 5-10 % ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic stirrer
7. เท plate (plate ต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อ 180 °C, 3 ชั่วโมง ใน hot air oven) ปริมาตร 15-20 มล./plate
8. ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของ media ใช้ปลายไฟลน
9. ตั้งจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้ว นำไปทดสอบสภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน

15. LB broth (1000 ml) (OXOID)

Tryptone 10 g/l

Yeast extract 5 g/l

Sodium chloride 5 g/l

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน 20 g ในน้ำกลั่น 1000 ml

คนให้ละลายแล้วนำเข้า Autoclave 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารอ้างอิง

1. Smith F, The Pathology of bursattee. Vet J 1884; 19:16-7
2. Avis JA. Hyphomycosis destruens-equi. Veeartsenijkundige Bld Ned Indie 1901; 8: 305-74
3. Thianprasit M. Fungal infection in Thailand. Jap J Dermatol 1986; 96: 1343-5
4. Thianprasit M. Cutaneous pythiosis in human being. Annual meeting of 100 years ,Siriraj Hospital, Bangkok, April 18-22, 1988. Abstract no. 94
5. De Cock AWAM, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. Nov., the etiologic agent of pythiosis J Clin Microbiol 1987; 25:344-9
6. Sathapatayavongs B, Leelachaikul P, Prachaktam R , *et al.* Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. J Infect Dis 1989; 159:274-80
7. Chetchotisakd P, Porntaveevudhi O, Mairiang P, *et al* Human pythiosis in Srinagarind Hospital: one year's experience. J Med Assoc Thai 1992; 75:248-54
8. Thianprasit M: Human pythiosis Top Dermatol 1990; 4: 1-4
9. Wanachiwanawin W, Thianprasit M, Fucharoen S, *et al* Fatal arteritis due to *Pythium insidiosum* infection in patients with thalassemia Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1993;87:296-89
10. Tanphaichitra D : Tropical disease in the immunocompromised host: Melioidosis and pythiosis Rev Infect Dis 1989; 11(suppl 7): 1629-43
11. Sathapatayavongs B. Human pythiosis. [workshop] proceeding of the 30th annual congress of Infectious Disease Association of Thailand ; 2004 Oct 9th -12th ; Thailand.
12. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*: a review. J Mycol Med 1996; 6:151-64
13. Sekhon As, Padhye AA, Garg AK. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents Eur J Epidemiol 1992; 8: 427-32
14. Prariyachatigul C. Detection and identification of important fungi causing systemic mycoses in Thailand by PCR . Thesis for Ph.D. of Graduate Studied, Mahidol University 1996
15. Prariyachatigul C, Chaiprasert A, Pattanakitsakul S. 18S rRNA partial sequence of *Pythium insidiosum* GenBank data of nucleotide sequence Accession No. AF 221847

16. นงนุช วัฒนัยธนาคม. วิทยาเชื้อราการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2542
17. พรรณกร อิมวิทยา. เชื้อราก่อโรคในคน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัทสารมวลชน จำกัด; 2535
18. SA Headley, HN Arruda Jr, TCSS Leggi, V Bett. Cutaneous pythiosis in a slaughtered horse: a case report. Arq Inst Biol. 2002; 69(4): 109-112
19. พรรณกร อิมวิทยา. โรคติดเชื้อรา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการ คณะรัฐมนตรี; 2543
20. จุฬารัตน์ ปรัชชาติกุล. เอกสารประกอบการสอนวิชาพิษวิทยาคลินิก 463 431. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
21. Wanachiwanawin W. Infections in E-beta thalassemia. Journal of Pediatric Hematology Oncology. 2000; 22(6): 581-7
22. <http://www.mahidol.ac.th/abstracts/annual1999/0675.htm>
23. http://bangkokhealth.com/consult_htdoc/Question.asp?GID=9640
24. <http://medtech.cls.msu.edu/medtech/mendoza>
25. Theerapong Krajaejun, et al. Development and Evaluation of an In-House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Early Diagnosis and monitoring of Human Pythiosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2002; 9(2): 378-382
26. Grooters AM, Gee MK. Development of a nested Polymerase Chain Reaction Assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. J Vet Intern Med. 2002 ; 16 : 147-152
27. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum* – vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. Vaccine. 2003; 20; 21(21-22): 2797-804
28. Alexandre T, Janio M, Andriana BM, et al. Serological response in rabbits immunized with *Pythium insidiosum* antigens associated with different adjuvants. Cienc Rural. 2002; 32(6): 1027-1032

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. A Chaiprasert, S. Pannanusorn, **C. Prariyachatigul**, T. Krajaejun, W. Wanachiwanawin, B. Stapatayawong. RAPD typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolated in Thailand . Mycoses 48(Suppl.2):2005 P. 65
2. **C. Prariyachatigul**, A. Chaiprasert, A. Jetrasrisupab. Specificity of CPL5 and CPR8 primers to *Pythium insidiosum* by polymerase chain reaction. Mycoses 48(Suppl.2):2005 P. 82

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ นำผลงานไปใช้พัฒนาการเรียนการสอนทั้งในระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษาในหัวข้อ recent advance in medical mycology ของหลักสูตรเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทำให้เกิดการสร้างนักวิจัยใหม่ระดับปริญญาตรี 4 คน ระดับบัณฑิตศึกษา 2 คน

3. กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

การไปเสนอผลงาน

1. Sangnark P., Sirithon P., Tubseeruk P., Chaiprasert A., Charoensri N., Homchampa P., **Prariyachatigul C.** Evaluation of two methods of DNA extraction of *Pythium insidiosum*. Proceeding in the 10th Asean Conference in Medical Laboratory Technology. Lotus Hotel Pang Suan Kaew , Chiang Mai, Thailand. 26th-30th April 2004:200. (Poster presentation)
2. ประกายกุล แสงนาค, **จุฬารัตน์ ปริยชาติกุล**, อังคณา นายประเสริฐ, ปรีชา หอมจำปา., นิชา เจริญศรี การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของยีน 18S rRNA สำหรับเชื้อ *Pythium insidiosum*. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 4 โรงแรมโลดส์สปางสวนแก้ว จ.เชียงใหม่ วันที่ 10- 11 สิงหาคม 2547: 214. (Oral presentation)
3. ประกายกุล แสงนาค, **จุฬารัตน์ ปริยชาติกุล**, อังคณา นายประเสริฐ, ปรีชา หอมจำปา., นิชา เจริญศรี. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของยีน 18S rRNA สำหรับเชื้อ *Pythium insidiosum*. การประชุมสัมมนาเสนอผลงานวิทยานิพนธ์และการศึกษาอิสระ ครั้งที่ 1 อาคารศูนย์วิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 10 กันยายน 2547:39-40.(Oral presentation)
4. **Prariyachatigul C.**, Chaiprasert A., Sangnark P., Pientaweechai K., One-tube seminested polymerase chain reaction for detection and identification of *Pythium insidiosum*. Proceeding in the 3rd Congress of Asia-Pacific Society for Medical Mycology (3rd APSMM). The Dusit Thani Hotel Bangkok, Thailand. 4th -6th March 2005:86. (Poster presentation)

5. ปรากฏกุล แสงนาค, จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล, อังคณา ฉายประเสริฐ, ปรีชา หอมจำปา, นิชา เจริญศรี, อรุณี เจตศรีสุภาพ. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยา ระดับโมเลกุล. การประชุมวิชาการประจำปีสมาคมเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 29 กระบวนทัศน์ใหม่ของนักเทคนิคการแพทย์: การบูรณาการเพื่อสุขภาพ. โรงแรมไดมอนด์พลาซ่า จ.สุราษฎร์ธานี, 27-29 เมษายน 2548:149. (Poster presentation)

6. **Prariyachatigul C.**, Chaiprasert A. Pienthaweechai K., Puapermpoomsiri S. , Jitjak K. Pamoonesi P. Copy of 18 S rRNA gene in *Pythium insidiosum*. Proceeding in the 10th Asean conference in medical Laboratory Technology, April 26-30, 2004 , Chiang Mai, Thailand P. 251 (Poster presentation)

7. Chaiprasert A., pannanusorn S., **Prariyachatigul C.**, Wanachiwanawin W. Ribotyping of *Pythium insidiosum* Human isolates. Proceeding in the 9th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases (9th WPCCID) December 1-5, 2004, Queen Sirikit Convention Center. (Poster presentation)

8. Chaiprasert A, Pannanusorn S, **Prariyachatigul C**, Krajaejun T, Wanachiwanawin W, Stapatayawong B. RAPD typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand. The second international congress on Trends in Medical Mycology (TIMM-2) 23-26 October 2005, Berlin, Germany. (Poster presentation)

9. **Prariyachatigul C**, Chaiprasert A, Jetrasrisupab A. Specificity of CPL5 and CPR8 primers to *Pythium insidiosum* by polymerase chain reaction. The second international congress on Trends in Medical Mycology (TIMM-2) 23-26 October 2005, Berlin, Germany. (Poster presentation)

10. จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล, อังคณา ฉายประเสริฐ, ปรากฏกุล แสงนาค, นิชา เจริญศรี, อรุณี เจตศรีสุภาพ Polymerase chain reaction for detection and identification of *Pythium insidiosum* การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. โรงแรมริเจนท์ ซะอำ จ. เพชรบุรี 13-15 ตุลาคม 2548 หน้า 106

11. จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล, อังคณา ฉายประเสริฐ, ปรากฏกุล แสงนาค, ปรีชา หอมจำปา, นิชา เจริญศรี Development of diagnosis for *Pythium insidiosum* based on molecular biology technique การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. โรงแรมริเจนท์ ซะอำ จ. เพชรบุรี 12-14 ตุลาคม 2549 หน้า 99 (Poster presentation)

การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

1. Chaiprasert A., **Prariyachatigul C.**, Srimuang S. PCR diagnosis of Pythiosis. The 3rd Congress of Asia-Pacific Society for Medical Mycology (3rd APSMM) 4-6 March 2005 ,The Dusit Thani Hotel Bangkok, Thailand.

2. กลุ่มวิจัย thalassemia คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรสัมมนาทางวิชาการพูด เรื่อง Pythiosis โรคที่ควรคำนึงถึงในผู้ป่วย thalassemia วันพุธที่ 31 สิงหาคม 2548 ณ ห้องประชุมภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ตึก 89 พรรษา สมเด็จพระเจ้า มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. กลุ่มวิจัย thalassemia คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรสัมมนาทางวิชาการพูด เรื่อง The diagnosis of pythiosis by one-tube semi nested polymerase chain reaction วันอังคารที่ 28 พฤษภาคม 2549 ณ ห้องประชุมภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ตึก 89 พรรษา สมเด็จพระเจ้า มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หนังสือ

จุฬารัตน์ ปรียชาติกุล การติดเชื้อ *Pythium insidiosum* ใน อรุณี เจตศรีสุภาพ, สุพรรณ พุทธิเจริญ บรรณาธิการ.องค์ความรู้ศาสตร์สุขภาพ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 2547: 159-167

การจดสิทธิบัตร

ได้พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปโดยขอขึ้นจดสิทธิบัตร PATENT COOPERATION TREATY (PCT) โดยยื่นเรื่องผ่านทางสกว. หลังจากนั้นทางสกว.ได้ส่งเรื่องให้บริษัทAxis Associates International Co.,Ltd. ดำเนินการนำไปจดให้ที่ประเทศสิงคโปร์ เมื่อ 10 ตุลาคม 2549 โดยได้รับ New International (PCT) Patent Application No. PCT/SG2006/000300 ซึ่งการจดสิทธิบัตรแบบPCT ในประเทศสิงคโปร์นี้จะได้รับความคุ้มครองครอบคลุมทั้งหมด 131 ประเทศ

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากผู้วิจัยได้ส่งผลงานวิจัยในลักษณะชุดตรวจสอบสำเร็จรูปเพื่อขอจดสิทธิบัตร โดยผ่านทางสกว. โดยได้ยื่นเรื่องไปให้ทางสกว.ตั้งแต่ 6 มี.ค.49โดยมีขั้นตอนคือเมื่อสกว.ได้รับเรื่องจึงจัดส่งไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิสำรวจความเป็นไปได้ในการขอจดใช้เวลาทั้งสิ้น 2 เดือนโดยวันที่ 4 พค. 49 ทางสกว.ส่งจดตอบมาให้แก้ไขปรับปรุงตามที่ผู้ทรงคุณวุฒิแนะนำ และให้ผู้วิจัยส่งฉบับที่แก้ไขแล้วกลับมายังสกว. 1 ชุดและส่งไปยังบริษัท Axis Associates International Co.,Ltd. 1 ชุด ผู้วิจัยจึงรีบดำเนินการแก้ไขและส่งไปเมื่อ 22 พค.49 หลังจากนั้นเรื่องก็เงียบหายไป ผู้วิจัยได้โทรไปที่บริษัท เป็นระยะๆ ก็ได้รับคำตอบว่ากำลังดำเนินการเรื่องจนกระทั่ง 7 กย. 49 จึงได้รับE-mail จากทางบริษัทว่าให้ตรวจสอบ first draft of application และในที่สุดได้ยื่นจดเมื่อ 10 ตค.49 นับเป็นเวลาถึง 7 เดือนในขั้นตอนตั้งแต่ยื่นเรื่องไป ผู้วิจัยคิดว่าถ้าขั้นตอนเหล่านี้สามารถทำได้เร็วกว่านี้ก็จะดีมาก เพราะผู้วิจัยไม่สามารถตีพิมพ์ผลงานใน journal ได้จนกว่าจะได้ยื่นจดแล้ว