การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา *Penicillium marneffei* แบบรวดเร็วโดยใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด 4D1

Rapid Diagnosis of *Penicillium marneffei* Infection by Using Yeast Specific Monoclonal Antibody 4D1

กฤษฎา พฤกษผล (Kritsada Pruksaphon)* สิริดา ยังฉิม (Sirida Youngchim)**
นงนุช วณิตย์ธนาคม (Nongnuch Vanittanakom)***

บทคัดย่อ

Penicillium marneffei จัดเป็นเชื้อราสองรูปที่ขึ้นกับอุณหภูมิ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราฉวยโอกาส ทั่วร่างกาย มักพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อดังกล่าวอย่างรวดเร็วโดยวิธี inhibition immunochromatographic assay (Inh-ICA strip) เพื่อตรวจหาแอนติเจนในระยะยีสต์ของเชื้อ *P. marneffei* ในซีรั่มของผู้ป่วย การทดสอบประกอบด้วย โมโนโคลนอล แอนติบอดี 4D1 (MAb 4D1) และ cytoplasmic yeast antigen (CYA) ของ *P. marneffei* โดยการทำ MAb 4D1 ให้บริสุทธิ์ด้วยหลักการ protein G affinity chromatography ผลการทดสอบ immuno-reactivity และ specificity พบว่า MAb 4D1 ทำปฏิกิริยาได้กับโปรตีนของ *P. marneffei* ในระยะยีสต์เท่านั้น ไม่พบการทำปฏิกิริยากับโปรตีนของเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA และ immunoblotting และเมื่อนำแอนติเจนและแอนติบอดีดังกล่าว มาทดสอบด้วยวิธี indirect inhibition ELISA ผลของค่า normalized relative binding (B/B_0) จากการสร้างกราฟมาตรฐานพบว่า ค่าความเข้มข้นของการยับยั้งจาก CYA ของ *P. marneffei* อยู่ในช่วง 10-50 µg/ml เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม สามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนการพัฒนา Inh-ICA strip ต่อไป

ABSTRACT

Penicillium marneffei is a thermally dimorphic fungus that can cause of opportunistic systemic mycoses in a patient infected with the human immunodeficiency virus (HIV). The purpose of this research was to develop the inhibition immunochromatographic assay (Inh-ICA strip) for detection of *P. marneffei* yeast antigens in patient sera. The system employed *P. marneffei* yeast phase specific monoclonal antibody 4D1 (MAb 4D1) and *P. marneffei* cytoplasmic yeast antigen (CYA). MAb 4D1 was concentrated and purified with protein G affinity chromatography and then determined the immuno-reactivity and specificity with indirect ELISA and immunoblotting. The result showed that MAb 4D1 was strongly reactive for *P. marneffei* CYA only but unable to react with other commonly pathogenic fungi. Demonstration of the normalized relative binding curve (B/B_0) in an indirect inhibition ELISA was constructed with various concentrations of *P. marneffei* CYA inhibitor showing the inhibit concentrations were ranged from 10-50 µg/ml. Therefore, this concentration of optimizing *P. marneffei* CYA inhibitors can be applied in development of an Inh-ICA strip test.

คำสำคัญ: โรคติดเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาร์เนฟฟีไอ โมโนโคลนอล แอนติบอดี 4D1 การทดสอบ Inh-ICA strip

Keywords: Penicilliosis marneffei, Monoclonal antibody 4D1 (MAb 4D1), Inh-ICA strip test

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

**** ศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

บทนำ

Penicillium marneffei หรือ *Talaromyces marneffei* (Samson *et al*., 2011) จัดเป็นเชื้อราฉวยโอกาสก่อโรคอุบัติใหม่ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราทั่วร่างกาย (opportunistic systemic mycoses) โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) พบการระบาดของเชื้อนี้ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย, ตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย, จีน, ฮ่องกง, เวียดนาม และ ไต้หวัน (Supparatpinyo *el al*., 1994; Deng *et al*., 1988) เชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นราสองรูปที่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (thermally dimorphic fungus) โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบการเจริญของเชื้อ อยู่ในรูปของราสาย (mold phase) ลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Penicillium* spp. และพบการสร้างสารละลายสีแดงแพร่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งที่สภาวะในร่างกายของโฮสต์ (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) เชื้อจะเปลี่ยนรูปการเจริญอยู่ในรูปของเซลล์ยีสต์ (yeast-like phase) ขนาด 2 - 6 µm และพบการแบ่งตัวแบบ binary fission และ *P. marneffei* เป็นเชื้อชนิดเดียวใน Genus Penicillium ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อราสองรูป (Kaufman *et al*., 1995; Vanittanakom *et al*., 2006)

ในอดีตที่ผ่านมาพบว่าการติดเชื้อ *P. marneffei* มักพบในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเอดส์ แต่ในปัจจุบันพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ (Non AIDS-immunodeficiency syndrome) กลับพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *P. marneffei* เพิ่มสูงขึ้น เช่นในผู้ป่วยโรค SLE (systemic lupus erythematosus), ผู้ป่วยโรคมะเร็ง และผู้ป่วยเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน รวมทั้งผู้ป่วยกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง ที่มีการสร้าง anti-interferon-gamma autoantibody (Anti - IFN-γ antibody) ซึ่งพบรายงานในผู้ป่วย adult-onset immunodeficiency syndrome จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้มีลักษณะอาการทางคลินิก ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และ ผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสารต้านเชื้อรา ที่แตกต่างกับผู้ป่วยโรคเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* อีกด้วย (Browne *et al*., 2012; Kawila *et al*., 2013)

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา *P. marneffei* ต้องอาศัยความถูกต้องและความรวดเร็วในการวินิจฉัย เพื่อช่วยให้แพทย์ให้การรักษาผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็วและเหมาะสม เป็นการช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากโรคนี้ การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *P. marneffei* สามารถทำได้โดยการตรวจจาก tissue biopsy ด้วยวิธีการทางเซลล์วิทยา การแยกเพาะเชื้อ และการวินิจฉัยจำแนกชนิดเชื้อ จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยเฉพาะการแยกเพาะเชื้อนั้นถือเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 1-2 สัปดาห์ จึงสามารถตรวจพบการเจริญของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัย โดยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffei* ได้รวดเร็ว จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ร่วมด้วย มักมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. marneffei* ในระดับต่ำๆ แต่มีระดับแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ในระดับสูง (Wong *et al*., 2011)

ดังนั้นจึงมีการพัฒนา วิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* มาอย่างต่อเนื่อง โดยการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ทั้งชนิด polyclonal antibodies (PAbs) และ monoclonal antibodies (MAbs) การผลิต MAbs ต่อแอนติเจนของ *P. marneffei* ที่ผ่านมาพบว่า MAbs ที่ได้มักเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับแอนติเจนของเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ ดังนั้นการผลิต MAbs ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. marneffei* เท่านั้น จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ จากการศึกษาของ Rafferty ในปี ค.ศ.2004 มีการทดลองใช้ cyclophosphamide ซึ่งเป็น immunosuppressive agentsร่วมกับกระบวนการผลิต MAbs เพื่อให้แอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะกับ แอนติเจนในระยะยีสต์ ของเชื้อ *P. marneffei* เท่านั้น โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับแอนติเจนของเชื้อราชนิดอื่นๆ (Rafferty Ph.D. thesis, 2004) จากการศึกษาพบว่า MAb 4D1 มีความจำเพาะกับเชื้อ *P. marneffei* ในรูปของเซลล์ยีสต์ (yeast phase

specific MAb) โดยสามารถจับได้กับ N-linked glycosylated mannoprotein ขนาด 50-180 กิโลดาลตัน และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *P. marneffei* ที่อยู่ในรูปของราสาย รวมทั้งเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ชนิดอื่นๆ

ในปัจจุบันนี้มีวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันซึ่งเรียกว่า เทคนิค rapid lateral-flow immunochromatographic assay (rapid ICA strip test) ซึ่งอาศัยหลักการ one step antigen-antibody interaction ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ โดยวิธีการนี้มีความรวดเร็ว สามารถใช้งานได้ง่าย และใช้ระยะเวลาในการอ่านผล ประมาณ 10 นาที โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะและประสบการณ์ หรือความเชี่ยวชาญในการอ่านผล ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย ซึ่งอาศัยหลักการ lateral flow assay ในการตรวจคัดกรองหาแอนติเจนจากแคปซูลของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นเชื้อราฉวยโอกาสก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องที่พบได้บ่อย โดยใช้ MAbs ที่มีความจำเพาะกับแคปซูลแอนติเจนของ *C. neoformans* มาใช้ ในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *C. neoformans* ในซีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย (Hansen *et al.*, 2013)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี inhibition lateral-flow immunochromatographic assay (Inh-ICA strip) โดยใช้ MAb 4D1 ในการตรวจหาแอนติเจนของ *P. marneffei* ในซีรั่ม เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองหาแอนติเจนของ *P. marneffei* ในสิ่งส่งตรวจได้ซึ่งง่ายต่อการใช้งานและแปลผลได้รวดเร็ว เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใช้ MAb 4D1 ในการตรวจหาแอนติเจนของ *P. marneffei* โดยอาศัยหลักการดังกล่าวมาก่อน

วัตถุประสงค์การวิจัย

พัฒนาการตรวจวินิจฉัยเพื่อหาแอนติเจนของ *P. marneffei* ในซีรั่ม ด้วยวิธี Inhibition lateral-flow immunochromatographic assay (Inh-IC) โดยใช้ MAb 4D1 และประเมินประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือ วิธีการเพาะแยกเชื้อ *P. marneffei* จากเลือด

วิธีการวิจัย

1. การเตรียม *P. marneffei* cytoplasmic yeast antigen (CYA)

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* CBS 119456 รวมทั้งเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Histoplasma capsulatum*, *C. neoformans* และ *Penicillium sp.* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA: Difco ™) แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการเก็บโคนิเดียของเชื้อ และ inoculate โคนิเดียของเชื้อ จำนวน $5x10^6$ conidia/ml ลงใน brain heart infusion (BHI: Difco™) broth แล้วนำไป incubate โดยการเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อเปลี่ยนรูปร่างไปเป็น yeast cell และ yeast like arthroconidia เติม 0.02% thimerosal เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วนำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์ยีสต์ หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ ใส่ใน PBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมลงไปใน chamber ของเครื่อง bead beater homogenizer (Biospec, Bartlesville, OK, USA) จากนั้นเติม glass beads ขนาด 0.5 มิลลิเมตร และเติม protease inhibitors ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้คือ 50 mM ของ IAA (iodoacetic acid), 50 mM ของ PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride) และ 500 mM ของEDTA (Jeavons *et al.*, 1998) นำไปแตกเซลล์ 30-35 ครั้งๆละ 1 นาที จากนั้นนำส่วน supernatant ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 15 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ออก นำ supernatant ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี dye-binding method (Bradford) และเก็บโปรตีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immunoblotting และ indirect ELISA ต่อไป

2. การเตรียม purified MAb 4D1 จาก 4D1 hybridoma clone cell

นำ hybridoma clone ของ MAb 4D1 มาเพาะเลี้ยงใน hybridoma serum-free medium (Gibco™) เพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีและทำการทดสอบ activity ของMAb 4D1 ด้วยวิธี indirect ELISA แล้วจึงทำการเก็บ supernatant ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดมาทำให้เข้มข้น (concentrate) ด้วย Vivaspin 20 Ultrafiltration devices (MWCO: 30,000 Da: GE Healthcare) โดยทำให้ supernatant เข้มข้นขึ้น 10 เท่า หลังจากนั้นจึงนำไป purified เพื่อแยกเอาเฉพาะแอนติบอดีออกมา โดยใช้หลักการ protein G affinity chromatography ผ่าน HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare) ซึ่ง MAb 4D1 นั้นมีคุณสมบัติเป็น IgG1 ซึ่งมีส่วนของ Fc portion ที่สามารถจับได้กับ recombinant protein G ของ group G Streptococci ได้เป็นอย่างดี หลังจากนั้นทำการ elute ออกมาด้วย 0.1 M glycine-HCl pH 2.7 จากนั้นนำไป dialysis กับ1x PBS ด้วย dialysis tubing เพื่อกำจัดเกลือส่วนเกินออกและเก็บแอนติบอดีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปทดสอบ activity และ purity ด้วยวิธี SDS-PAGE, immunoblotting, indirect immunofluorescence staining และ indirect ELISA

3. การทดสอบความบริสุทธิ์ (purity) และ immuno-reactivity ของ MAb 4D1

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ MAb 4D1 ที่ได้โดยใช้วิธี SDS-PAGE และ immunoblotting ทั้งนี้หาก MAb 4D1 ที่ purified ได้มีความบริสุทธิ์สูง จะคำนวณความเข้มข้นของ MAb 4D1 จาก molar extinction coefficient ของ IgG บริสุทธิ์ที่ค่า 1 หน่วยของการดูดกลืนแสงที่ OD 280 nm (1 absorbance unit at OD 280 nm) (Harlow *et.al*, 1988)

3.1 การทดสอบความบริสุทธิ์ ของMAb 4D1

ทดสอบความบริสุทธิ์ของ MAb 4D1 หลังจากการ purified และ dialysis โดยใช้วิธี SDS-PAGE นำตัวอย่าง MAb 4D1 ที่แยกได้นำมาผสมกับ protein loading buffer และไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำโปรตีนมาแยกส่วนใน polyacrelamide gel เมื่อครบเวลา นำเจลมาย้อมสีด้วย colloidal blue staining kit (Novex® in VitroGen) เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนของ IgG ในสภาวะ reducing condition กับแถบสีของโปรตีนมาตรฐาน (Thermo Scientific) และทำการตรวจสอบชนิดของ MAb 4D1 ที่แยกได้ว่ามีคุณสมบัติเป็น mouse IgG โดยทำการถ่ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Hybond®) ด้วยชุด Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell จากนั้นทดสอบโปรตีนตัวอย่างกับ HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Jackson, West Grove, Pa) เจือจาง 1:1,000 และ 4-CN/ H_2O_2 chromogenic substrate (Sigma) เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนของ IgG ที่เกิดขึ้นเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

3.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ MAb 4D1 ด้วยวิธี immunoblotting และ indirect ELISA

การทดสอบความจำเพาะของ MAb 4D1 ต่อ *P. marneffei* CYA นั้น นำตัวอย่าง cytoplasmic mold antigen (CMA) และ CYA ของเชื้อราชนิดต่างๆ ที่สกัดได้ ใช้วิธี SDS-PAGE และ immunoblotting มาทำการศึกษา โดยวิธีการได้อธิบายไว้ในข้อ 3.1 ในส่วนของการทดสอบ indirect ELISA ทำการเคลือบ Maxisorp 96 well microtiter plate (Nunc) ด้วย CMA และ CYA ของเชื้อราแต่ละชนิด ซึ่งเจือจางใน 0.06 M carbonate buffer (pH 9.6) เข้มข้น 2.5 µg/ml ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลานำ plate มาล้างด้วย PBS-0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง แล้ว block plate ด้วย 5% BSA

(Sigma) เมื่อล้าง plate แล้ว เติม MAb 4D1 เข้มข้น 1.25 µg/ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาทำการล้าง plate จำนวน 3 ครั้งจากนั้นเติม HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibodies แล้วนำไป incubate นาน 1 ชั่วโมง ทำการล้าง plate เมื่อครบเวลา จากนั้นเติม TMB/H_2O_2 chromogenic substrate (BioFX Laboratories SurModics®) นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 2M H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่า OD ที่ 450 nm

3.3 การทดสอบ immuno-reactivity ของ MAb 4D1 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence staining (IFA)

3.3.1 นำโคนิเดียของเชื้อ *P. marneffei* CBS 119456 จำนวน $1x10^8$ conidia/ml มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1% bacteriological peptone agar (Oxoid®) นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมด้วย MAb 4D1 ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงและล้างออกด้วย PBS-0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้งจากนั้นย้อมต่อด้วย Alexa Fluor 488 conjugated goat anti- mouse IgG antibodies (molecular probes®) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างออก 3 ครั้งนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Nikon eclipse 50i)

3.3.2 ทำการกระตุ้น THP-1 human acute monocytic leukemia cell line ด้วย phorbol myristate acetate (PMA) เข้มข้น 100 ng/ml ใน complete RPMI 1640 (Gibco™) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บน treated glass cover slip ใน 6 well tissue culture plate จากนั้นทำการ infection เซลล์ THP-1 จำนวน $2x10^6$cells/ml ด้วยโคนิเดีย ของเชื้อ *P. marneffei* CBS 119456 ในขนาด MOI เท่ากับ 2 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรึงเซลล์บนแผ่น glass cover slip ด้วย 3.7% formaldehyde และ permeabilized ด้วย 0.2% Triton-X 100 จากนั้นทำการย้อมเซลล์โดยวิธี indirect immunofluorescence staining เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.1 และย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Nikon eclipse 50i

4. การทดสอบ indirect inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect Inh-ELISA)

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *P. marneffei* CYA และ MAb 4D1 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี block titration

ทำการเคลือบ Maxisorp 96 well microtiter plate ด้วย CYA ซึ่งเจือจางใน 0.06 M carbonate buffer (pH 9.6) โดยการเจือจาง CYA แบบ two-fold dilution ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 - 2.5 µg/ml เติมแต่ละความเข้มข้น ลงใน microtiter plate แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้าง plateด้วย PBS-0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้น block plate ด้วย 5% BSA เมื่อครบเวลานำ plate ไปล้าง จากนั้นเติม MAb 4D1 ที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.5 - 0.625 µg/ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการล้าง plate จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibodies ที่เจือจาง 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการล้าง plate จากนั้นเติม TMB/H_2O_2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 2M H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่า OD ที่ 450 nm

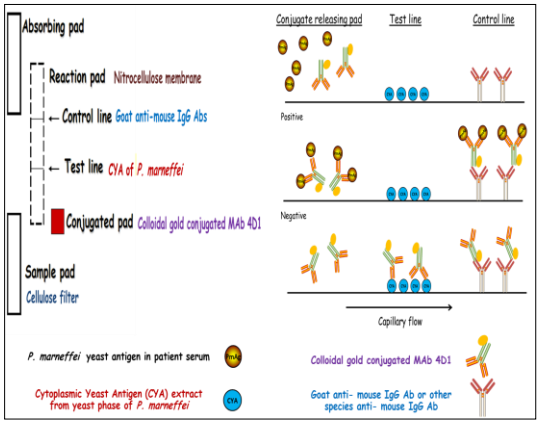
4.2 การทดสอบ Indirect Inh-ELISA

ในการทดสอบ Indirect Inh-ELISA จะใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Gómez และคณะ ค.ศ. 1997 โดยนำ *P. marneffei* CYA เจือจางใน normal human AB serum (Sigma) ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 115 µg/ml - 30 ng/ml เติมลงใน 96-well round bottom microtiter plate (Nunc) จากนั้นเติม MAb 4D1 ที่เจือจางใน diluting buffer ที่ความเข้มข้น 1.25 µg/ml นำไป incubate บน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 25 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เรียกขั้นตอนนี้ว่าการเตรียม incubation plate เพื่อให้เกิด *P. marneffei* CYA - MAb 4D1 immune complex จากนั้นนำส่วนผสม ที่ได้ ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ต่อไป โดยใช้ *P. marneffei* CYA เข้มข้น 2.5 µg/ml ในการ coat plate เพื่อนำไปใช้เป็นค่ามาตรฐาน โดยคำนวณจากค่า % relative binding (%B/B_0) (Sathe *et.al.* 2012)

5. หลักการของการทดสอบ Inh-ICA strip test

การทดสอบ Inh-ICA strip เพื่อตรวจหาแอนติเจนที่อยู่ในซีรั่มผู้ป่วยโดยใช้ MAb 4D1 มาติดฉลากกับอนุภาคของ gold nanoparticle ขนาด 40 nm เรียกว่า colloidal gold conjugated MAb 4D1 หากในซีรั่มที่ทำการทดสอบมี yeast antigen ของเชื้อ *P. marneffei* ปรากฏอยู่ก็จะเกิดการทำปฏิกิริยากับ colloidal gold conjugated MAb 4D1 เกิดเป็น yeast antigen - colloidal gold conjugated MAb 4D1 immune complex ซึ่งหากในซีรั่มมีปริมาณ yeast antigen อยู่สูงมาก colloidal gold conjugated MAb 4D1 จะถูกใช้ไปจนหมด ไม่เหลือ free colloidal gold conjugated MAb 4D1 อยู่ หลังจากนั้น yeast antigen - colloidal gold conjugated MAb 4D1 immune complex ทั้งหมดจะถูกทำให้เคลื่อนที่ไปด้วย capillary flow จากการดึงดูดด้วย absorbing pad ซึ่งอยู่ที่ส่วนปลายสุดของแผ่น strip ไปถึงตำแหน่งที่เป็น test line ซึ่งจะถูกเคลือบเอาไว้ด้วย *P.marneffei* CYA จะไม่เกิดการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ถูกเคลือบเอาไว้ ดังนั้น immune complex ดังกล่าว ก็จะเคลื่อนที่ต่อไปจนถึงตำแหน่งของ control line ซึ่งเป็น anti-immunoglobulin isotype antibody ส่วนของ colloidal gold conjugated MAb 4D1 ก็จะถูกจับเอาไว้ทำให้ปรากฏแถบสีของ colloidal gold conjugated MAb 4D1 ซึ่งจะปรากฏเป็นแถบสีเพียงแถบเดียวบน reaction pad (analytical nitrocellulose membrane) ในทางตรงกันข้าม หากในซีรั่มทดสอบไม่มี yeast antigen ของเชื้อ *P. marneffei* ปรากฏอยู่ หรือมีในระดับที่ต่ำกว่า lower limited of detection ของการทดสอบนี้ colloidal gold conjugated MAb 4D1 ซึ่งเป็น free MAb จะมาทำปฏิกิริยากับ *P. marneffei* CYA ที่ test line แทน และที่ control line ก็จะปรากฏแถบสีด้วยเช่นกัน ซึ่งจะปรากฏเป็นแถบสี 2 แถบบน reaction pad (รูปที่ 1)



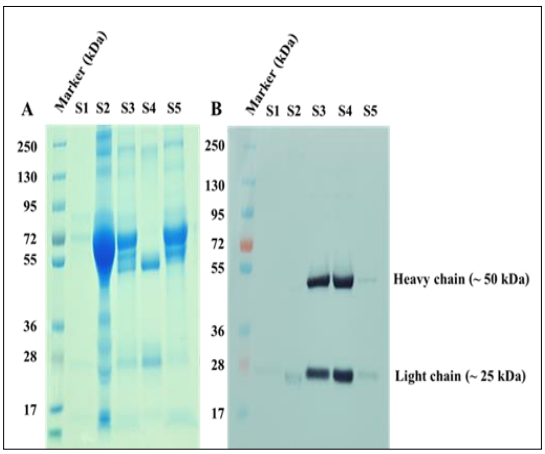
รูปที่ 1 แสดงแผนภาพและหลักการของการเตรียมชุดตรวจสอบ inhibition lateral-flow immunochromatographic assay (Inh-ICA strip) ด้วย MAb 4D1 เพื่อตรวจหา *P. marneffei* yeast phase antigen ในซีรั่มของผู้ป่วย (ดัดแปลงจาก Khamta *et.al.* 2009)

ผลการวิจัย

1. ผลการเตรียม purified MAb 4D1, *P. marneffei* CYA และการทดสอบ immuno-reactivity

เมื่อทำการ concentrate และ purify MAb 4D1 แล้วเสร็จจึงนำแต่ละ pool fraction มาทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting พบว่า purified MAb 4D1 มีความบริสุทธิ์อยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันอื่นๆได้ (S3 และ S4 รูปที่ 2A) เมื่อเทียบกับ concentrated supernatant ก่อนที่จะทำการ purify ออกมา (S2 รูปที่ 2A) โดยขนาดของ IgG ในสภาวะ reducing condition มีขนาดของ heavy chain และ light chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุล อยู่ที่ประมาณ 50 และ 25 kDa ตามลำดับซึ่งผล

นี้สอดคล้องกับผลการทดสอบ immunoblotting ที่ย้อมด้วย HRP conjugated goat anti-mouse IgG Ab (S3 และ S4 รูปที่ 2B) ผลการวัดและคำนวณความเข้มข้นจากค่า molar extinction coefficient ของ IgG บริสุทธิ์ที่ค่า 1 หน่วยของการดูดกลืนแสงที่ OD 280 nm คือ 1.35 (Harlow et.al, 1988) ได้ค่าความเข้มข้นของ MAb 4D1 คือ 1.05 mg/ml และเมื่อนำ MAb 4D1 ไปทดสอบด้วยวิธี immunoblotting พบว่าแอนติบอดีนี้ทำปฏิกิริยาได้กับโปรตีนของ *P. marneffei* ในระยะยีสต์เท่านั้น โดยลักษณะของ band ที่ปรากฏจะมีลักษณะเฉพาะของ glycosylated protein band เป็นลักษณะที่เรียกว่า "broad high molecular mass smear" มีขนาดระหว่าง 50-150 kDa โดยไม่พบการทำปฏิกิริยากับโปรตีนของ *P. marneffei* ในระยะ mold และ mycelium และโปรตีนของเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ (รูปที่ 3 B) ซึ่งผลการทดลองนี้ก็ให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ด้วยวิธี indirect ELISA (รูปที่4) ส่วนผลการทดสอบ immuno-reactivity ของ MAb 4D1 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence staining (IFA) พบว่า MAb 4D1 สามารถทำปฏิกิริยากับได้กับ *P. marneffei* ในระยะยีสต์ทั้งสภาวะที่เพาะเลี้ยงใน 1% peptone agar (in vitro) และ ในสภาวะที่เชื้อเจริญอยู่ภายในไซโตพลาซึมของ THP-1 human macrophage cell line ทั้งนี้พบว่าแอนติบอดีชนิดนี้ทำปฏิกิริยาได้เป็นอย่างดี (strongly reactivity) กับ antigenic determinant เป้าหมายบนผนังเซลล์ของ *P. marneffei* ในระยะยีสต์ (รูปที่ 5)



รูปที่ 2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purities) ของ MAb 4D1 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น mouse IgG ทั้งก่อนและหลังจากที่ผ่าน HiTrap™ Protein G HP affinity chromatography column โดยวิธี SDS-PAGE (A) และทดสอบยืนยันชนิดของ mouse IgG ด้วยวิธี immunoblotting (B)

Marker แถบโปรตีนมาตรฐาน (Thermo Scientific)

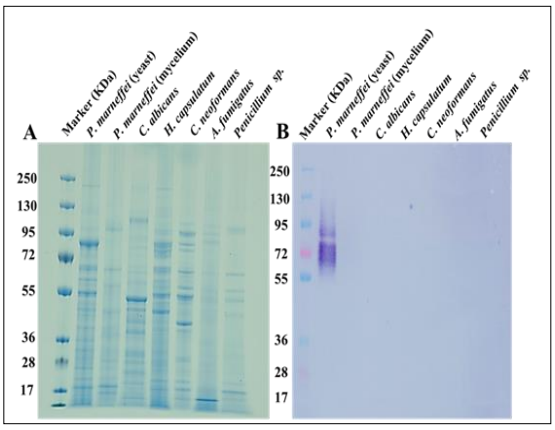
S1, MAb 4D1 hybridoma supernatant (ก่อน concentrate)

S2, MAb 4D1 hybridoma supernatant (หลัง concentrate)

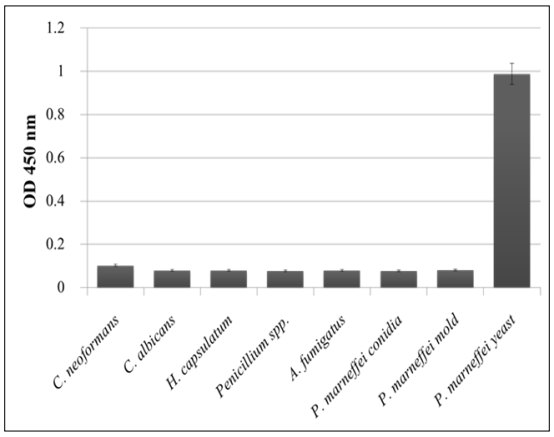
S3, Eluate & dialysis MAb 4D1 fraction 1

S4, Eluate & dialysis MAb 4D1 fraction 2

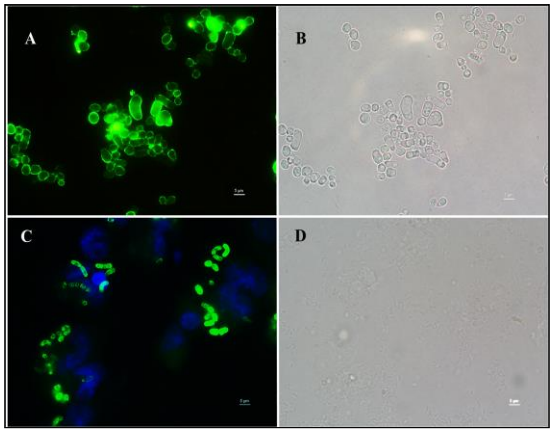
S5, Non purified MAb 4D1 ใช้เป็น positive control



รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ MAb 4D1 ต่อ CYA ของเชื้อ *P. marneffei* (A) การนำ CYA และ CMA ของเชื้อราชนิดต่างๆ มาแยกขนาดด้วย วิธี SDS-PAGE (B) แสดงภาพของ immunoblotting โดยการใช้ MAb 4D1 ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อราชนิดต่างๆ



รูปที่ 4 ผลการทดสอบ immuno-reactivity ของ MAb 4D1 ด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อพิสูจน์ความจำเพาะ (specificity) โดยการวัดค่า OD ที่ 450 nm เปรียบเทียบกับเชื้อราชนิดต่างๆ (error bar แสดงค่า mean OD ± SD ของการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง)



รูปที่ 5 ผลการทดสอบ immuno-reactivity ของ MAb 4D1 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence staining (IFA) พบว่า MAb 4D1 สามารถทำปฏิกิริยากับได้กับ *P. marneffei* ในระยะยีสต์ทั้งสภาวะที่เพาะเลี้ยงใน 1% peptone agar (A และ B) และ ในสภาวะที่เชื้อเจริญอยู่ภายในไซโตพลาซึมของ THP-1 human macrophage (C และ D)

2. ผลการทดสอบ indirect inhibition ELISA

จากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง MAb 4D1 และ *P. marneffei* CYA ด้วยวิธี block titration สำหรับวิธี indirect ELISA โดยสร้างกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแอนติบอดีและแอนติเจนกับค่า OD ที่ 450 nm โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่จะใช้ทำปฏิกิริยาเป็นค่า OD ของความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เริ่มขนานกับแกน X หรือ ค่า OD ที่ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต่ำที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

จากผลการไตเตรตพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MAb 4D1 เท่ากับ 1.25 µg/ml และ *P. marneffei* CYA เท่ากับ 2.5 µg/ml เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของทั้ง MAb 4D1 และ *P. marneffei* CYA สำหรับการทดสอบ indirect ELISA แล้วจึงนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect inhibition ELISA โดยการนำ *P. marneffei* CYA เจือจางใน normal human AB serum ที่ความเข้มข้น 115.2 µg/ml - 30 ng/ml จากนั้นคำนวณค่า % relative binding (%B/B_0 value) โดยใช้สัมพันธ์ $\%B/B_0 = (A-A_{ex}/A_0-A_{ex}) \times 100$

ซึ่งกำหนดให้

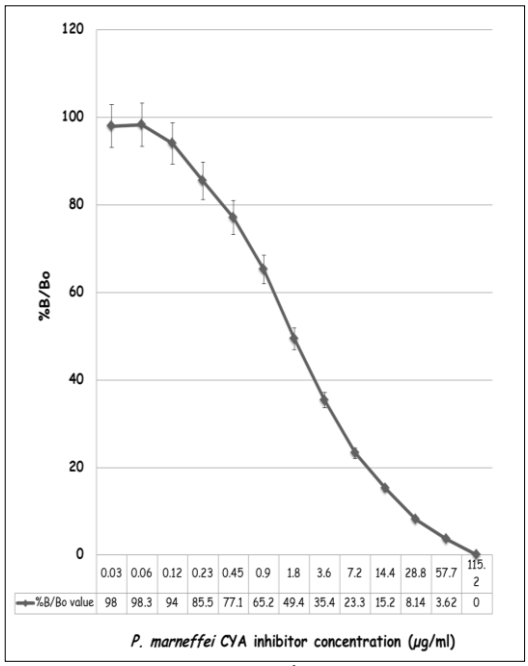
A คือ ค่า OD ของแอนติเจนในแต่ละความเข้มข้น

A_0 คือ ค่า OD ของ *P. marneffei* CYA โดยที่ *P. marneffei* CYA นี้ไม่ได้ถูกยับยั้ง ด้วยแอนติเจนใน inhibition plate (ให้ค่า OD สูงที่สุด)

A_{ex} คือ ค่า OD ของ *P. marneffei* CYA ที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด ที่ทำปฏิกิริยา กับ MAb 4D1 ใน inhibition plate (ให้ค่า OD ต่ำที่สุด)

เมื่อพิจารณาจากกราฟ (รูปที่ 6) จะพบว่า ที่ความเข้มข้นที่สูงที่สุดของ *P. marneffei* CYA inhibitor ที่ MAb 4D1 สามารถจับได้ทั้งหมด คือ ให้ผลของ %B/B_0 value ที่ 0 % binding คือ *P. marneffei* CYA inhibitor เข้มข้น 115.2 µg/ml ในขณะที่ *P. marneffei* CYA inhibitor เข้มข้น 52.7 และ 28.8 µg/ml จะให้ผลของ %B/B_0 value ประมาณ 3.64 และ 8.14 % binding ตามลำดับ จากผลการทดสอบ indirect inhibition ELISA นี้สามารถนำไปใช้ ประมาณค่าของความเข้มข้นของ *P.*

marneffei CYA inhibitor ไปทดสอบ หาช่วงของ limited



of detection ของวิธี Inh-ICA ซึ่งคาดว่าอยู่ในช่วง 10-50 µg/ml ต่อไป

รูปที่ 6 กราฟแสดงการ inhibit ของ *P. marneffei* CYA inhibitor โดยการทดสอบ indirect inhibition ELISA แกน X แสดงค่าความเข้มข้นของ *P. marneffei* CYA inhibitor แกน Y แสดงค่าค่า % relative binding (%B/B_0 value) โดยใช้สัมพันธ์ %B/B_0 = (A-A_{ex}/A_0-A_{ex}) x 100 (error bar แสดงค่า mean OD ± SD ของการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *P. marneffei* ทางห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธีการเพาะเชื้อจากเลือดในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะ fungemia หรือ disseminated penicilliosis อย่างไรก็ตามพบว่าการเพาะเชื้อจากเลือดรวมทั้งการวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อนั้นจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการวินิจฉัยอย่างน้อย 1-2 สัปดาห์ ซึ่งอาจไม่ทันต่อการให้การรักษาผู้ป่วย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางวิทยาภูมิคุ้มกันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความรวดเร็วในการวินิจฉัย จึงมีความพยายามพัฒนาวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. marneffei* โดยมุ่งเน้นการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเป็นหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันเทคนิค rapid ICA strip test ได้รับความนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป โดยการใช้เป็นขั้นตอนการตรวจคัดกรอง (screening) เพื่อหาแอนติเจนของเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ซึ่งในกรณีของ เชื้อราก่อโรคได้แก่การใช้เทคนิคดังกล่าว ตรวจหาแคปซูลของเชื้อ *C. neoformans* ซึ่งเป็นส่วนของ glucuronoxylomannan antigen (Hansen *et al.,* 2013) ทำให้สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ชุดทดสอบสามารถใช้งานได้ง่าย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการวางแผนรักษาผู้ป่วย การศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบการทดสอบ rapid ICA strip test โดยใช้หลักการ inhibition ICA ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถประเมินระดับแอนติเจนของ เชื้อ *P. marneffei* จากตัวอย่างตรวจได้ในระดับหนึ่ง จากการทดสอบ limit of detection (LOD) ของ strip test จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เมื่อทำการ concentrate และ purify MAb 4D1 แล้วเสร็จนำมาทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting พบว่า purified MAb 4D1 มีความบริสุทธิ์ อยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี indirect inhibition ELISA และ inh- ICA strip ได้ และเมื่อนำ MAb 4D1 ไปทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี immunoblotting และ indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีนี้ทำปฏิกิริยาได้กับโปรตีนของ *P. marneffei* ในระยะยีสต์เท่านั้น โดยไม่พบการทำปฏิกิริยากับ โปรตีนของ *P. marneffei* ในระยะราสาย (mold phase) และโปรตีนของเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ จากผล immunoblotting พบว่าแถบของ immunogenic protein มีลักษณะของ“broad high molecular mass smear” ที่มีขนาดระหว่าง 50-150 kDa ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า antigenic determinant ที่เป็นเป้าหมายของ MAb 4D1 นั้น เป็น N-linked mannosylated glycoproteins (Rafferty Ph.D. thesis, 2004) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีการแยก mannoprotein จากผนังเซลล์ของ *P. marneffei* เรียกว่า Mp1p protein ซึ่งมีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่าง ระยะราสาย และระยะยีสต์ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 kDa พบว่า mannoprotein

ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อ *P. marneffei* สูงไม่พบการทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้แก่ *C. albicans*, *H. capsulatum* และ *C. neoformans* (Cao *et al.*, 1988) ลักษณะของ mannosylated glycoproteins นั้นมีคุณสมบัติเป็น immunodominant epitope สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี ซึ่งปัจจุบันได้มีการจำแนกชนิดของ mannoprotein ในเชื้อราก่อโรคหลายชนิดได้แก่ *C. neoformans, C. albicans, A. fumigatus* และ *A. flavus* และพิสูจน์แล้วว่า mannosylated glycoproteins มีคุณสมบัติเป็น immunogen สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (Mansour *et al.*,2003)

จากผลการทดสอบ immuno-reactivity ด้วยวิธี indirect immunofluorescence staining (IFA) พบว่า MAb 4D1 สามารถทำปฏิกิริยากับ *P. marneffei* ในระยะยีสต์ที่ 37 องศาเซลเซียส ทั้งสภาวะที่เพาะเลี้ยงใน 1% peptone (*in vitro*) และ ในสภาวะที่เชื้อเจริญอยู่ภายในไซโตพลาซึม ของ THP-1 macrophage ในส่วนของการทดสอบ indirect inhibition ELISA จากกราฟมาตรฐานจากค่า relative binding (B/B_0) พบค่าความเข้มข้นของ CYA ของ *P. marneffei* ที่ใช้ในการยับยั้งอยู่ในช่วง 10-50 µg/ml เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนการพัฒนา Inh-ICA strip ต่อไป ซึ่งขั้นตอนต่อไป เป็นการนำ MAb 4D1 ไปติดฉลากด้วย อนุภาคของ colloidal gold และทดสอบระบบด้วยวิธี direct dot-blot immunoassay และ inhibition direct dot blot immunoassay โดยการนำค่าความเข้มข้น *P. marneffei* CYA ที่ได้จากการทดสอบ indirect inhibition ELISA นี้ไปใช้ในการหาความเข้มข้นของตัวยับยั้งเพื่อหา limit of detection ของ strip test ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. สิริดา ยังฉิม และ ศ.ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัยและสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Browne SK, Burbelo PD, Chetchotisakd P, Suputtamongkol Y, Kiertiburanakul S, Shaw PA, Kirk JL, Jutivorakool K *et.al.* Adult onset immunodeficiency in Thailand and Tai wan. *N. Engl. J. Med*. 2012; 367: 725-734.

Cao L, Chan CM, Chen D, Vanittanakom N, Lee C, Sirisanthana T, *et al.* Detection of cell wall mannoprotein Mp1p in culture supernatants of *Penicillium marneffei* and in sera of Penicilliosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 981–986.

Chaiyaroj SC, Chawengkirttikul R, Sirisinha S, Watkins P, Srinoulprasert Y. Antigen detection assay for identification of *Penicillium marneffei* infection. *J. Clin. Microbiol*. 2003; 41: 432-434.

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.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A, *et al.,* Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2618–2622.

Hansen J, Slechta ES, Gates-Hollingsworth MA, Neary B, Barker AP, Bauman S. *et al.* Large-scale evaluation of the immune-mycologics lateral flow and enzyme linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(1): 52-55.

Harlow E, Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Jeavons L, Hamilton AJ, Vanittanakom N, Ungpakorn R, Evans EGV, Sirisanthana T, *et al.* Identification and purification of specific *Penicillium marneffei* antigens and their recognition by human immune sera. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36: 949–954.

Kaufman L, Standard PG, Anderson SA, Jalbert M, Swisher BL. Development of specific fluorescent antibody test for tissue form of *Penicillium marneffei*. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 2136–2138.

Kawila R, Chaiwarith R, Supparatpinyo K. Clinical and laboratory characteristics of penicilliosis marneffei among patients with without HIV infection in Northern Thailand: a retrospective study. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 464.

Khamta Y, Pattarawarapan M, Nangola S, Tayapiwatana C. Development of immunochromatographic assay for the on-site detection of salbutamol. *J.Immunoassay Immunochem*. 2009; 30: 441-456.

Mansour MK, Levitz SM. Fungal mannoproteins: the sweet path to immunodominance. *ASM News.* 2003; 69: 595-600

Panichakul T, Chawengkirttikul R, Chaiyaroj SC, Sirisinha S. Development of a monoclonal antibody based enzyme-linked immuno-sorbent assay for the diagnosis of *Penicillium marneffei* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67: 443-447.

Pornprasert S, Dettrairat S, Vongchan P, Apichatpiyakul C. Production of a monoclonal antibody against a yeast secreted antigen of *Penicillium marneffei*. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Heath.* 2005; 36: 966-969.

Rafferty K. *Penicillium marneffei*: Immunological responses to infection the development of novel diagnostic method. Ph.D. thesis. The University of London, 2004.

Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, Varga J, Frisvad JC. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud Mycol.* 2011; 70: 159 –183.

Sathe M. Direct hapten-linked competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (CIELISA) for the detection of O-pinacolyl methylphosphonic acid. *Analyst*. 2012; 137: 406–413

Supparatpinyo K, Kwamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in Southeast Asia. *Lancet.* 1994; 344: 1739–1743.

Vanittanakom N, Cooper CR Jr, Fisher MC, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clin. Microbiol. Rev*. 2006; 19: 95-110.

Wong SYN, Wong KF. *Penicillium marneffei* infection in AIDS. *Patholog. Res. Int.* 2011; 1-10.