Thesis Title	Development of Inhibition Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Penicillium marneffei* Infection by Using 4D1 Monoclonal Antibody
Author	Ms. Kanittha Prakit
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim Advisor Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Co-advisor

ABSTRACT

Penicillium marneffei is the only thermally dimorphic species in genus *Penicillium* that can cause disseminated mycosis called penicilliosis marneffei. The conventional diagnosis of *P. marneffei* infection relies on the direct culture of fungus from clinical specimens by identification of its morphology and thermal dimorphism. This method is often time-consuming which effects on delayed treatment in patients. To solve this problem, monoclonal antibody 4D1 (MAb 4D1) against 60-100 kDa of cytoplasmic yeast antigen (CYA) of *P. marneffei* by Western blot analysis was incorporated to develop an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (inh-ELISA). The test has been proved to be useful for the detection of antigenemia in all 45 (100%) patients infected with *P. marneffei*, with a mean antigen concentration of 4.2 µg/ml. No cross-reactivity in this assay was found in all 44 patients with other fungal infections such as *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Candida albicans and 44 patients with bacterial infections such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Streptococcus suis*. This method was also negative in 31 HIV positive patients without any fungal infections and 113 healthy controls in endemic areas. To investigate the potential of the inh-ELISA, 12 patients in the placebo group with relapses of *P. marneffei* infection (without antifungal treatment) were monitored at regular intervals of 1 month for 6-9 months. The results have shown an increase of antigen concentrations in 7 patients that *P. marneffei* was recovered from their blood culture. In contrast, the antigenemia of the other 5 relapses was decreased although *P. marneffei* was isolated from blood culture. Therefore, the inh-ELISA assay was successful to provide a novel method in the diagnosis of penicilliosis marneffei and standardized quantitative assay for the detection of *P. marneffei* antigen concentrations. In conclusion, the inh-ELISA assay has been proved to be useful not only for diagnostic purposes but also as a tool to evaluate the fungal burden during treatment.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธี Inhibition Enzyme-linked Immunosorbent Assay เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *Penicillium marneffei* โดยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด 4D1

ผู้เขียน นางสาวกนิษฐา ประกิจ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สิริดา ยังฉิม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Penicillium marneffei เป็นเชื้อราสองรูปเพียงสปีชีส์เดียวในสกุล *Penicillium* ที่เป็นสาเหตุของโรค penicilliosis marneffei ซึ่งเป็นการติดเชื้อแบบแพร่กระจายทั่วร่างกาย ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา *P. marneffei* อาศัยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ โดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนรูปตามอุณหภูมิ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานานอาจทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาช้า ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาการตรวจโดยวิธี inhibition-enzyme linked immunosorbent assay (inh-ELISA) เพื่อใช้ในการตรวจหาระดับแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ในซีรั่มของผู้ป่วย โดยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด 4D1 ที่มีความจำเพาะต่อ cytoplasmic yeast antigen (CYA) ของเชื้อ *P. marneffei* ที่มีขนาด 60 ถึง 100 กิโลดัลตันโดยการศึกษาด้วยวิธี Western blot เมื่อนำวิธี inh-ELISA มาตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนในซีรั่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* จำนวน 45 ราย มีปริมาณแอนติเจนในซีรั่มเฉลี่ยเท่ากับ 4.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรั่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อราอื่นๆ จำนวน 44 ราย เช่นเชื้อ *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* รวมทั้งซีรั่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 44 ราย เช่น *Mycobacterium tuberculosis* และ *Streptococcus suis*, ซีรั่มของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ เอช ไอ วี ที่ไม่ติดเชื้อราใดๆ จำนวน 31 ราย และซีรั่มของคนที่มีสุขภาพดีที่อาศัยอยู่ในแหล่งระบาดของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน 113 ราย พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรั่มดังกล่าว จากการศึกษาด้วยวิธี inh-ELISA พบผู้ป่วยจำนวน 12 ราย ที่มีการกลับมาเป็นโรค penicilliosis marneffei อีก ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา และได้รับการตรวจทุกเดือนเป็นเวลา 6 ถึง 9 เดือน ผลจากการศึกษาพบผู้ป่วยจำนวน 7 ราย มีระดับแอนติเจนในซีรั่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสามารถตรวจพบเชื้อรา *P. marneffei* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วยที่เหลืออีกจำนวน 5 ราย มีระดับแอนติเจนในซีรั่มลดลง ดังนั้นการพัฒนาวิธี inh-ELISA ร่วมกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด 4D1 ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* แสดงให้เห็นถึงประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรค penicilliosis marneffei ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งสามารถตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนในซีรั่มของผู้ป่วยได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการติดตามรักษาในผู้ป่วยต่อไป ดังนั้นจึงสรุปว่าวิธี inh-ELISA ได้พิสูจน์แล้วว่าไม่เพียงแต่มีประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรค penicilliosis marneffei ยังเป็นเครื่องมือในการตรวจวัดระดับแอนติเจนในซีรั่มระหว่างการรักษาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved