รายงานการวิจัย

เรื่อง

เปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อแอนติเจนของเชื้อราเพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ในรูปที่ปล่อยจากเชื้อและรูปที่ได้จากการแตกเชื้อ

สาคร พรประเสริฐ

มงคล โชตยาภรณ์

รณชัย ปรารถนาผล

ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปี 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
รายการตารางประกอบ	ง
รายการภาพประกอบ	จ
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการวิจัย	19
ผลการวิจัย	25
อภิปรายผลการวิจัย	35
บทสรุป	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	43
ประวัติการศึกษาและประสบการณ์	47

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ต่อแอนติเจนของเชื้อราเพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ ในรูปที่ปล่อยจากเชื้อและรูปที่ได้จากการแตกเชื้อ

สาคร พรประเสริฐ[1*] มงคล โชตยาภรณ์[1] รณชัย ปรารถนาผล[2] ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว[3]
[1]ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก [2]ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก [3]ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ของคนปกติต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ ในรูปที่ปล่อยจากเชื้อและรูปที่ได้จากการแตกเชื้อ

วิธีการ: นำโมโนนิวเคลียร์เซลล์ของคนปกติจำนวน 16 ราย มากระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ สายพันธุ์ 673H ที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อและจากการแตกเชื้อ วัดการแบ่งเซลล์ด้วยวิธี ลิมฟ์โฟซัย ทรานฟอร์เมชั่นเทคนิค

ผลการวิจัย: โมโนนิวเคลียร์เซลล์ของคนปกติ 5 ใน 16 ราย (31.25%) และ 2 ใน 16 ราย (12.50%) แบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วย 100% และ 70% แอมโมเนียม ซัลเฟต ตามลำดับ ขณะที่ 1 ใน 16 ราย (6.25%) ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อ และความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วย 100% แอมโมเนียม ซัลเฟต จะลดลงเมื่อถูกทำให้บริสุทธ์

สรุป: โปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 673H ด้วย 100% แอมโมเนียม ซัลเฟต สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงอาจนำมาใช้ช่วยบ่งชี้ว่าในกลุ่มคนปกติทั่วไปเคยสัมผัสกับเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ มาก่อนและมีระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้อยู่ภายในร่างกาย และโปรตีนแอนติเจนชนิดนี้อาจนำไปใช้แทนพีพีดีและบีซีจีในการทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีได้

คำรหัส: เพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ, ภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์

*ผู้เขียน ที่อยู่: [1]ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200 โทร (053) 945066, 945078

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Comparision of cell mediated immune response to *Penicillium marneffei* antigen in secreted form and sonicated form

Sakorn Pornprasert[1*], Mongkol Chotayaporn[1], Ronachai Pratanaphon[2], Khajornsak Tragoolpua[3]

[1]Department of Clinical Microscopy, [2]Department of Clinical Immunology, [3]Department of Clinical Microbiology; Faculty of Associated Medical Sciences; Chiang Mai University.

Abstract

Objective: To compare cell mediated immune response of healthy person againt *P. marneffei* protein antigens in secreted and sonicated form.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells from 16 healthy persons were stimulated with crude secreted and crude sonicated form of protein antigens from *P. marneffei* strain 673H. Cell proliferation was detacted by lymphocyte transformation technic.

Results: Five of 16 (31.25%) and 2/16 (12.50%) healthy persons showed proliferative response to crude secreted form of *P. marneffei* protein antigens that precipitated with a hundred and seventy percent ammonium sulfate; respectively, whereas only one of 16 healthy persons (6.25%) response to sonicated form. The result also showed that ability of secreted form of protein antigens that precipitated with a hundred percent ammonium sulfate was decreased when it was purified.

Conclusion: The crude secreted form *P. marneffei* protein antigens that precipitated with a hundred percent ammonium sulfate strongly induce cell proliferation. This may use to indicate that general healthy persons have been exposed to *P. marneffei* and have memory cell mediated immune response against this fungi. Moreover, this crude protein antigens can be used instead of PPD and BCG to determine the immune response in HIV infected patients.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Key words: *Penicillium marneffei*, cell mediated immunity

***Coresponding author:** Department of Clinical Microscopy; Faculty of Associated Medical Sciences; Chiang Mai University. Chiang Mai 50200 Phone: (053) 945066, 945078.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเพราะได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงานและบุคคลหลายๆ ฝ่าย ซึ่งคณะผู้วิจัยรู้สึกสำนึกในบุญคุณของท่านทั้งหลายเหล่านี้อยู่เสมอดังนั้นจึงขอกล่าวคำขอบคุณไปยังหน่วยงานและบุคคลต่างๆ ดังนี้คือคือ

ขอบคุณอาจารย์ ประสิทธ์ ชนะรัตน์ (หัวหน้าภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก) คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาฯ ทุกท่านที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี เพื่อทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ได้เสียสละตัวอย่างศึกษา (เลือด) เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. ชัชวาลย์ อภิชาติปิยกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ให้โปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 391H และ F947 พร้อมกันนี้ขอขอบคุณ คุณจันทนา คำวรรณ หัวหน้าห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ให้เชื้อ *P. marneffei* สายพันธุ์ LN124 และ F947

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุญาตให้ใช้เครื่อง Automatic cell harvester และเครื่อง β-counter

ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ ให้เวลาและกำลังใจแก่ผู้วิจัยอยู่เสมอมา

การทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจาก งบประมาณแผ่นดิน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยรู้สึกสำนึกในความกรุณาเป็นอย่างยิ่งและต้องขอกล่าวคำขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	แสดงปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี	25
2	การหาปริมาณความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง	26
3	การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง	27
4	การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA-P, PPD และ BCG	29
5	การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*	32
6	การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่กระตุ้นด้วย fraction protein antigen ของเชื้อรา *P. marneffei*	33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	กราฟแสดงการหาปริมาณความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง	26
2	กราฟแสดงการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง	28
3	กราฟแสดงการตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA-P, PPD และ BCG	30
4	กราฟแสดงการตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*	33
5	กราฟแสดงการแยก fraction protein antigen ของเชื้อรา *P. marneffei*	34
6	การฟแสดงการตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่กระตุ้นด้วย fractions protein antigen ของเชื้อรา *P. marneffei*	34

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทนำ

ประวัติการค้นพบเชื้อรา *Penicillium marneffei*

Penicillium marneffei จัดเป็นราสองรูป (dimorphic fungus) เพียงชนิดเดียวในจำนวน Penicillium หลายร้อย species ตัวเชื้อสามารถทำให้เกิด mycosis ได้ทั้งในคนและในสัตว์ พบเชื้อครั้งแรกในปี ค.ศ. 1956 โดย Capponi และคณะในประเทศเวียตนาม โดยทำให้เกิดโรคในสัตว์แทะ คือ อ้น หรือ bamboo rat (Rhizomys sinensis)[1] Capponi และ Sureau แยกเชื้อได้ครั้งแรกจากตัวอ้น 3 ตัว ที่ตายด้วยสาเหตุของ reticuloendothelial mycosis เชื้อรานี้ได้ถูกค้นพบและตั้งชื่อเป็น species ใหม่โดย Segretain [2] ราชนิดนี้ก่อโรคได้สูงในหนู hamsters หนู mice และอ้น แต่ไม่ก่อให้เกิดโรคในกระต่ายและหนูพุก ซึ่งทำให้เกิด reticulosis คล้ายกับ histoplasmosis หรือ leishmaniasis

Segretain ได้รายงานการติดเชื้อในคนเป็นครั้งแรก เป็นการได้รับเชื้อจากอุบัติเหตุในห้องปฏิบัติการที่ทำการแยกเชื้อ โดยตัวเขาเองถูกเข็มที่มีเชื้อแทงที่นิ้ว และเพาะเชื้อได้จากตุ่มหนองที่เกิดขึ้น[2] ในปี ค.ศ. 1973 Dislva และคณะได้รายงานการติดเชื้อตามธรรมชาติเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยผู้ป่วยชาวอเมริกันอายุ 61 ปี ซึ่งเป็น Hodgkin' s disease และมีประวัติว่าเคยเดินทางมาอยู่ที่ประเทศเวียตนาม[3] ในปี ค.ศ. 1984 Pantler และคณะได้รายงานว่ามีการติดเชื้อ *P. marneffei* ในผู้ชายอายุ 59 ปี มีประวัติเคยเดินทางไปตะวันออกไกล ในระยะแรกมีอาการไอเป็นเลือด (hemoptysis) ซึ่งเป็นๆ หายๆ ต่อมาเกิดอาการร่วมกับโรคหลอดลมอักเสบ (bronchitis) และโรคหลอดลมพอง (bronchiec tasis) เมื่อทำ pneumonectomy พบ granuloma ร่วมกับ unicellular นอกจากนี้ยังพบ yeast - like cell ของ *P. marneffei* ที่มีการแบ่งตัวแบบ binary fission และสามารถแยกเชื้อได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ[4] หลังจากนั้นมีรายงานพบโรคนี้ในประเทศไทย[5,6] จีน[7,8] ฮ่องกง[9] ในประเทศไทยพบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อรานี้ครั้งแรกที่โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพมหานคร ในช่วงปี ค.ศ. 1974-1982 จำนวน 5 ราย [5] โดยผู้ป่วยทั้งหมดเป็นชาวต่างจังหวัด นอกจากนี้ในช่วงปี ค.ศ. 1987-1989 พบผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทยอีก 5 ราย[6]

ภายหลังจากมีการแพร่ระบาดของเชื้อ HIV พบผู้ป่วย AIDS ที่ติดเชื้อราชนิดนี้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นโดยพบผู้ป่วยจากประเทศสหรัฐอเมริกา 1 ราย[10] เนเธอร์แลนด์ 3 ราย[11] ออสเตรเลีย 1 ราย [12] ฝรั่งเศส 5 ราย[13] และ อิตาลี 1 ราย[14] ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีรายงานผู้ป่วยเอดส์ที่เป็น Penicilliosis marneffei ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 [15] สำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศพบการติดเชื้อรา *P. marneffei* ในผู้ป่วยเอดส์เป็นจำนวนเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และผู้ป่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนใหญ่จะเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ จากการศึกษาของ Vithayasai พบว่าภายในระยะเวลาประมาณ 14 เดือน (มิถุนายน ค.ศ. 1990 – สิงหาคม ค.ศ. 1991) มีผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่เป็นจำนวนทั้งสิ้น 35 ราย [16] ในช่วงระยะเวลาอีก 10 เดือนต่อมา (มิถุนายน ค.ศ. 1992) เพิ่มขึ้นเป็น 86 ราย [17] นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อราชนิดนี้ในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อเอชไอวีอีกจำนวน 5 ราย[18] เมื่อถึงปี ค.ศ. 1994 มีรายงานพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อ *P. marneffei* ทั้งหมดจำนวน 550 ราย [19] และจนกระทั่งถึงปี ๕.ศ. 1995 มีรายงานจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัวกว่าโดยคิดเป็นจำนวนทั้งหมด 1,300 ราย[20] จะเห็นได้ว่าในประเทศไทยโดยเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศการติดเชื้อรา *P. marneffei* กำลังมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในผู้ป่วยเอดส์การติดเชื้อฉวยโอกาสชนิด *P. marneffei* จะพบได้บ่อยเป็นอันดับ 4 รองจาก tuberculosis, cryptococcal meningitis และ pneumosistic carinii pneumonia[21]

ระบาดวิทยา : ศึกษาจากสัตว์และดิน

หลังจาก 30 ปีที่มีการค้นพบเชื้อรา *P. marneffei* จากอ้น หรือ bamboo rat (*R. sinensis*) [1] ในประเทศเวียตนามได้มีการสำรวจหาตัวเชื้อในตัวอ้น และดินบริเวณรูซึ่งเป็นที่อยู่ของอ้น จากการศึกษาถึงการติดเชื้อ *P. marneffei* ที่จับได้บริเวณ Guangxi Zhuang ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีน พบว่าตัวอ้น *R. sinensis* มีอัตราการติดเชื้อน้อยกว่า *R. pruinosus* โดยสามารถแยกเชื้อ *P. marneffei* ได้จากอวัยวะภายในของ *R. pruinosus* จำนวนถึง 18 ตัวจากที่จับได้ทั้งหมด 19 ตัว[22] ในประเทศไทยมีนอกจากจะมีอ้นขนาดใหญ่ (*R. sinensis* และ *R. pruinosus*) แล้วยังมีอ้นขนาดเล็กชนิด bay bamboo rat *Cannomys basius* ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทยและประเทศพม่า มีรายงานว่าสัตว์เหล่านี้เป็นโฮสต์ของ *P. marneffei* เนื่องจากสามารถที่จะแยกเชื้อรานี้ได้จากอวัยวะภายในของอ้นชนิด *R.. pruinosus* ถึง 75%[23] *R.. sumatrensis* 92.8% และ *C. badius* 30% [19] Deng ได้ทำการทดลองแยกหาเชื้อ *P. marneffei* จากดินบริเวณรังอ้นในประเทศจีนพบว่าสามารถแยกเชื้อได้จากดินที่เป็นโพรงของอ้น *R. pruinosus* จำนวน 3 โพรง[8] นอกจากนี้ Vanittanakom ได้เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรังอ้น 28 ตัวอย่าง และจากบริเวณที่อยู่อาศัยของผู้ป่วยติดเชื้อ *P. marneffei* 67 ตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่มาตรวจแยกหาเชื้อราชนิดนี้ พบว่าสามารถแยกเชื้อได้จากดิน 1 ตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณรังของอ้น *R. sumatrensis* แต่ไม่พบเชื้อจากดินบริเวณบ้านผู้ป่วย[19] Deng ได้เสนอแนวคิดที่ว่าการติดเชื้อ *P. marneffei* ทั้งในอ้นและคน เกิดมาจากการหายใจเอาสปอร์หรือเซลล์เชื้อที่มีอยู่ทั่วไปทั้งในอากาศและในดินเข้าสู่ร่างกาย สำหรับการติดเชื้อจากอ้นมาสู่คนเป็นไปได้น้อยมากเพราะจากประวัติของผู้ป่วยส่วนใหญ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะอาศัยอยู่ในเมืองไม่เคยเห็นหรือบริโภคเนื้ออ้นมาก่อน[22] ขอสนับสนุนแนวคิดนี้ได้แก่การการศึกษาของ Vithayasai ที่พบว่าสามารถตรวจเชื้อ *P. marneffei* ได้จากโพรงจมูกและเสมหะของผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่เป็น penicilliosis marneffei[24]

ลักษณะโครงสร้างและการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei*

P. marneffei เป็นราสองรูป (dimorphic fungus) ชนิดหนึ่งเจริญได้ทั้งอุณหภูมิ 25 °C (อุณหภูมิห้อง) และอุณหภูมิ 37 °C กล่าวคือ Mycelial phase (mold form) จะเจริญได้ดีบน Sabouraud's dextrose agar ที่ 25-28 °C สามารถเห็นโคโลนีได้ภายในใน 3 วัน โคโลนีเป็นแบบ velvety, radial fold มีสีขาวในระยะแรก เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสี grayish pink ด้านหลังโคโลนีจะมีสีแดงเข้มตรงกลาง และให้ soluble pigment สีแดงออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ จะเป็นสายราใสมีผนังกั้นที่ปลายของ hyphae มี phialides ประมาณ 3-7 phialides ซึ่งจะผลิต ellipsoidal (conidia ที่ต่อกันเป็นสาย) Yeast-like phase เจริญได้ดีบน Brain heart infusion agar (BHA) ที่อุณหภูมิ 37 °C โคโลนีมีสีขาวในระยะแรก เมื่ออายุของเชื้อมากขึ้น จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและผิวโคโลนีย่น ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์รูปร่างกลมรี ขนาดประมาณ 3 ไมโครเมตร เซลล์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission ทำให้ลักษณะของเซลล์บางเซลล์มีผนังกั้นเซลล์ (Cross wall) ไม่พบการ budding ของเชื้อ อาจพบสายราสั้น ๆ จำนวนเล็กน้อย[21]

การเกิดโรค

การติดชื้อ *P. marneffei* จากธรรมชาติ หรือ จากสัตว์มาสู่คนยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน การที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีรอยโรคที่ปอดและบางรายสามารถแยกเชื้อ *P. marneffei* จากโพรงจมูกและเสมหะ[24] ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อโดยการหายใจเอาสปอร์หรือชิ้นส่วนของเชื้อเข้าไป การได้รับเชื้อโดยตรงทางบาดแผลที่ผิวหนังอาจทำให้เกิดโรคได้ Segretain ได้ทำเข็มที่มีเชื้อทิ่มนิ้วมือตนเองในขณะแยกเชื้อ หลังจากนั้นเกิดเป็นตุ่มแผลขึ้นที่บริเวณที่เชื้อเข้าไป และมีต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้โต[2] การติดเชื้อ *P. marneffei* โดยการกินมีความเป็นไปได้ต่ำ แต่ก็ควรคำนึงถึงเนื่องจากเชื้อมีอยู่ในสัตว์ *Rhizmys spp.* ซึ่งมีผู้นิยมรับประทานเป็นอาหาร โดยมีการปรุงทั้งแบบสุกหรือสุกๆ ดิบๆ และในผู้ป่วยชาวจีน พบ 2 รายมีรอยโรคในลำไส้ร่วมด้วย[7] ผู้ที่ป่วยด้วยโรค penicilliosis มักมีความผิดปกติของระบบภูมิต้านทานของร่างกายหรือเป็นโรคอื่นๆ อยู่ก่อนแล้ว ได้แก่ ผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ผู้ป่วยวัณโรค ผู้ป่วยมะเร็งปอด ผู้ป่วย systemic lupus erythrematosus (SLE) ผู้ป่วย lymphoproliferative disorder โรค Hodgkin's disease เป็นต้น ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชาย พบได้ในหลายอาชีพแต่พบค่อนข้างสูงในคนที่มีอาชีพทำไร่ทำนา เป็นได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาการทางคลินิก

อาการของผู้ป่วยโรค penicilliosis marneffei มีความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความต้านทานของร่างกายผู้ป่วย หรืออาจขึ้นกับทางที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย ปริมาณของเชื้อหรือความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อซึ่งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ต้องทำการศึกษาต่อไป อาการของ penicilliosis marneffei ในผู้ป่วยโรคเอดส์มีอาการร่วมที่สำคัญ คือ เป็นการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย ผู้ป่วยมีไข้ ไอ น้ำหนักลด พบการติดเชื้อที่ต่อมน้ำเหลือง ไขกระดูก ตับและม้ามโต ซีด เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวน และมีรอยโรคเป็นตุ่มที่ผิวหนังแบบแพร่กระจาย[21,24,25,26] มีหลายรายที่มีลักษณะตุ่มแบบบุ๋มตรงกลาง (umbilicated papules) ตรงกลางมักเป็นแผลเนื้อตาย (Central necrosis) รอยโรคที่พบที่ผิวหนัง พบได้ในผู้ป่วยเกือบทุกราย (พบประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วย) พบได้ทั้งที่ผิวหน้า แขนขาและลำตัว นอกจากนี้อาจพบรอยโรคได้ที่ไต กระดูก เยื่อหุ้มหัวใจ อวัยวะเพศ ผู้ป่วยที่มีรอยโรคแบบแพร่กระจายมีอาการรุนแรงถึงตายถ้าไม่ได้รับการรักษา การติดเชื้อแบบแพร่กระจายจนถึงแก่ชีวิตนี้นอกจากพบในผู้ป่วยเอดส์แล้วยังพบในผู้ป่วยวัณโรค ผู้ป่วย systemic lupus erythematosus ผู้ป่วย lymphoproliferative disorder[5] ในผู้ป่วยรายแรกซึ่งมีโรคแฝงคือ Hodgkin's disease รายนี้โรค penicilliosis marneffei เป็นแบบไม่แพร่กระจายพบรอยโรคเฉพาะที่ม้ามและผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยวิธีตัดม้าม[3] ในผู้ป่วยบางรายซึ่งไม่พบโรคแฝงใดใด อาการของโรคมักเป็นแบบไม่รุนแรง และหายได้เมื่อได้รับการรักษา

ลักษณะอาการทั่วไปของ penicilliosis marneffei ในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานบกพร่องโดยเฉพาะผู้ป่วยเอดส์ จะคล้ายคลึงกับลักษณะอาการในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานปกติ คือมีไข้ ซีด น้ำหนักลด ไอ lymphadenopathy ตับและม้ามโต (มักพบในผู้ป่วยเด็ก)[18] มีรอยโรคที่ผิวหนัง ท้องร่วงรุนแรง และมีเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) สำหรับอาการ septicemia จะพบได้บ่อยในผู้ป่วยเอดส์ นอกจากนี้ในผู้ป่วยเอดส์ ส่วนใหญ่จะไม่พบรอยโรคที่กระดูก[10]

การรักษา

การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. marneffei* ใช้ antifungal drugs เป็นหลักสำหรับการรักษาภายในร่างกาย เช่น systemic mycoses แต่การรักษาจะใช้เวลานาน ยาที่ใช้บ่อยได้แก่ nystatin มีคุณสมบัติเป็น polyene macrolide antibiotic ละลายน้ำได้เล็กน้อยแต่จะแตกตัวและสลายตัวในน้ำและพลาสม่า มีความคงตัวดี ในรูปของ dry form mystatin ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวได้ เมื่อทดสอบในหลอดทดลองจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราหลายชนิด และต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดการติดเชื้อภายในร่างกาย (deep mycosis) มีรายงานเมื่อทดสอบ *P. marneffei* ในหลอดทดลองพบว่า *P. marneffei* สามารถตอบสนองต่อ nystatin ในปริมาณ 0.65 µg/ml ในรูปแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ semi – synthesis medium ที่ 24 ชั่วโมง และในปริมาณ 0.32 µg/ml เป็นเวลา 4 วัน สำหรับการทดลองในหนู hamsters ที่มีการติดเชื้อ *P. marneffei* แล้วรักษาด้วยยา nystatin จากการสังเกตการมีชีวิตของหนู hamsters ในเวลา 20 วัน พบว่า 50% ของหนูที่ได้รับการรักษาด้วยยา nystatin เสียชีวิต Segretain เป็นคนแรกที่ติดเชื้อ *P. marneffei* และรักษาด้วยยา nystatin เนื่องจาก nystatin ไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต จึงเหมาะสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนังเท่านั้น [2] Amphotericin B เป็นยาชนิดแรกที่สามารถรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ได้สำเร็จในปี ค.ศ. 1973 [7] Van cutsem ได้รายงานถึงการให้หนูพุก (guinea pig) ที่มีการติดเชื้อ *P. marneffei* ในกระแสเลือดกินยา itraconazole พบว่าภูมิคุ้มกันที่ลดลงของหนูพุกจะเพิ่มสูงขึ้นภายหลังจากได้รับยา itraconazole ที่ความเข้มข้นต่ำ[22] Sekhon และคณะได้ศึกษาการยับยั้ง mycelial และ yeast form ของ *P. marneffei* ในหลอดทดลองด้วย amphotericin B, 5 – fluorocytosine , fluconazole และ itraconazole พบว่ามีค่า MIC สูง โดย MIC ของ 5 – fluorocytozine ใน yeast form จะมีค่าต่ำกว่า mycelium form อย่างไรก็ตามค่า MIC ที่สูงนี้ไม่เป็นที่ยอมรับในบาง case[27] Drouhet ได้ศึกษา Sensitivity ของเชื้อรา *P. marneffei* 10 strains ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอดส์ 6 ราย และผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อเอดส์ 4 ราย ต่อยา amphotericin B, 5 – fluorocytosine, ketoconazole และ fluconazole พบว่าทุก strains มีความไวต่อ antifungal drugs ทุกตัว ยกเว้น fluconazole[21] Supparatpinyo และคณะพบว่าความสามารถของยา miconazole, itraconazole, ketoconazole และ 5- fluorocytosin จะยับยั้งเชื้อรา *P. marneffei* ได้แบบ susceptibility ขณะที่ยา amphotericin B สามารถยับยั้งเชื้อได้แบบ intermediate susceptibility[28] ในทางคลินิก ยา itraconazole หรือ ketoconazole ถือได้ว่าเป็น drug of choice ที่ใช้ในการรักษาอาการของการติดเชื้อ *P. marneffei* ผู้ป่วยที่มีไข้สูงจะได้รับการฉีด amphotericin B ทาง intravenous ก่อน และตามด้วยการรับประทานยา itraconazole หรือ ketoconazole จนกระทั่งผลการ culture ไม่พบเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยหลายราย ที่กลับมาเป็นโรคอีกหลังจากที่ได้รับการรักษาแล้ว สำหรับกรณีนี้จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยา itraconazole หรือ ketoconazole ต่อไป[28]

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจพบเชื้อที่รูปร่างคล้ายยีสต์จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยตรงจะช่วยวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว โดยตัวอย่างตรวจอาจเป็นเลือด สะเก็ดแผลที่ผิวหนัง ไขกระดูก ชิ้นเนื้อบริเวณตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง น้ำเจาะข้อ เสมหะ หนองจากแผล วิธีการตรวจจะนำตัวอย่างตรวจมาเสมียร์บนแผ่นกระจกแล้วย้อมสี Wright หรือสี Giemsa ถ้าเป็นชิ้นเนื้อจะย้อมด้วย Gomori methenamine silver (GMS) หรือย้อม Periodic acid schift (PAS) จะพบเชื้อเป็นเซลล์คล้ายยีสต์รูปร่างรีมีผนังกั้นแบ่งเป็นสองภายในเซลล์ เชื้อมีขนาดประมาณ 3 ไมครอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อยู่ภายในไซโตพลาสมของเซลล์ macrophage เชื้อที่อยู่ภายนอกจะมีรูปร่างยาวรีคล้ายไส้กรอก (sausage shape) ขนาดประมาณ 8x4 ไมครอน ปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์ร่างกายเป็นแบบ granulomatous imflammation[21]

2. การเพาะเชื้อ

เชื้อ *P. marneffei* ในตัวอย่างตรวจเจริญเร็วบน sabouraud's dextrose agar ที่อุณหภูมิ 28 °C ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เชื้อเป็น mold มีลักษณะโคโลนีที่พบบ่อยเป็น velvety หรือ powdery บางสายพันธุ์เป็นชนิด grabrous ขณะที่เชื้ออ่อนให้โคโลนีสีขาวอมเทาอมชมพู เมื่อเชื้อสร้างสปอร์ผิวหน้าโคโลนีมักมีสีเขียวอมเหลือง สร้าง pigment สีแดงกระจายลงในอาหาร เมื่อแก่ขึ้นโคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีแดงเข้มหรือสีน้ำตาลแดงและอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีแดงเข้มทั่วทั้งหลอด ลักษณะเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบสายราที่มีผนังกั้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 ไมครอน ก้านชูสปอร์มีลักษณะเป็น penicillus ซึ่งมักพบหลายๆ แบบในเชื้อสายเดียวกัน penicillus ประกอบด้วยก้าน phialide คล้ายนิ้วมือมีจำนวนตั้งแต่ 3-5 อาจพบได้มากถึง 10 หรือมากกว่านี้ เรียงเป็นวง 1 ชั้น (monoverticulate) ที่เรียงเป็นวง 2 ชั้น มี 2 แบบ คือ symmetric biverticulate ตัวอย่างตรวจเจริญเร็วบน sabouraud's dextrose agar ที่อุณหภูมิ 28 °C ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เชื้อเป็น mold มีลักษณะโคโลนีที่พบบ่อยเป็น velvety หรือ powdery บางสายพันธุ์เป็นชนิด grabrous ขณะที่เชื้ออ่อนให้โคโลนีสีขาวอมเทาอมชมพู เมื่อเชื้อสร้างสปอร์ผิวหน้าโคโลนีมักมีสีเขียวอมเหลือง สร้าง pigment สีแดงกระจายลงในอาหาร เมื่อแก่ขึ้นโคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีแดงเข้มหรือสีน้ำตาลแดงและอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีแดงเข้มทั่วทั้งหลอด ลักษณะเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบสายราที่มีผนังกั้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 ไมครอน[21]

3. การตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของเชื้อรา *P. marneffei*

วินิจฉัยการติดเชื้อโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ยังมีข้อด้อยคือต้องอาศัยเวลานานทำให้บางครั้งไม่ทันต่อการรักษา ดังนั้นจึงได้มีการนำความรู้ทางภูมิคุ้มกันวิทยามาพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อราชนิดนี้เพิ่มขึ้นเช่น การศึกษาของ Estrada และคณะพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อราทุกชนิดจะประกอบด้วย polysaccharide เป็นส่วนใหญ่ และเชื้อที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันมักมีส่วนประกอบบางอย่างคล้ายคลึงกัน สำหรับเชื้อ *P. marneffei* จะมีส่วนประกอบของผนังเซลล์เป็นสารจำพวก galactomannan และมี epitope บางส่วนที่คล้ายกับผนังเซลล์เชื้อ *Aspergillus fumigatus* ดังนั้นจึงสามารถใช้ monoclonal antibody (EB-A1) ที่จำเพาะต่อ galactomannan ของเชื้อ *A. fumigatus* มาตรวจหาตัวเชื้อหรือ แอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ที่ถูกเซลล์เม็ดเลือดขาวจับกิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้าไปได้ โดยอาศัยหลักการย้อม immunohistochem จะเห็นเชื้อในรูปยีสต์และส่วนประกอบของเชื้อ *P. marneffei* อยู่ในซัยโตพลาสมของเซลล์ที่กินเชื้อราเข้าไปติดสีชัดเจนขึ้น[29] นอกจากนี้ยังสามารถใช้ monoclonal antibody ชนิดนี้ (EB-A1) ตรวจหาแอนติเจน (galactomannan) ของเชื้อรา *P. marneffei* ในซีรั่มผู้ป่วยโดยวิธี latex agglutination ได้[30] นอกจากตรวจหาตัวเชื้อหรือแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ตามที่กล่าวแล้วยังได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อ *P. marneffei* ในซีรั่มผู้ป่วย โดยในปี ค. ศ. 1994 Yuen ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อ *P. marneffei* ในซีรั่มผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อราชนิดนี้ด้วยวิธี indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) โดยใช้ germinating conidia และ yeast cell ของเชื้อ *P. marneffei* เป็นแอนติเจน พบว่าซีรั่มผู้ป่วยจำนวน 8 รายใน 103 ราย (7.77%) มีแอนติบอดีชนิด IgG ต่อแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ใน titer ที่สูงกว่า 160 ขณะซีรั่มของคนปกติและผู้ป่วยโรคอื่นๆ (tuberculosis, typhoid fever, melioidosis, disseminated cryptococcosis, candidaemia, intraabdominal sepsis, autoimmune disease และ lymphoreticular cancer) มี titer ที่ 10 – 40[31] Vanittanakom และคณะ ได้ใช้ crude extracellular protein ที่ปล่อยออกมาจากเชื้อรา *P. marneffei* ที่อยู่ในรูปยีสต์ มาตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อราชนิดนี้โดยวิธี immunoblot assay พบว่า 45% ของซีรั่มผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* มีแอนติบอดีชนิด IgG ที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับโปรตีนแอนติเจนทั้งขนาด 54 และ 50 กิโลดัลตัน อย่างไรก็ตามซีรั่มของคนปกติและของผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่ติดเชื้อ *P. marneffei* บางรายสามารถเกิดปฏิกิริยาแบบอ่อนได้กับโปรตีนแอนติเจนทั้งสองขนาดนี้[32]

ได้มีการพยายามศึกษาหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *P. marneffei* เพื่อที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อราชนิดนี้ได้อย่างถูกต้องและใช้เวลาในการตรวจสั้นลง Cao และคณะได้ใช้ Mp1p ซึ่งเป็น mannoprotein ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ *P. marneffei* มาตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อในซีรั่มผู้ป่วยด้วยวิธี ELISA พบว่าซีรั่มผู้ป่วย penicilliosis marneffei จำนวน 14 ราย ใน 17 ราย (80%) ให้ผลบวกกับการทดสอบขณะที่ซีรั่มของคนปกติ ซีรั่มผู้ป่วยไข้ไทฟอยด์และวัณโรค ให้ผลลบ [33] ในปีถัดมา Cao และคณะได้ผลิต anti-Mp1p antibody ขึ้นมาและนำไปใช้ตรวจหา mannoprotein ในซีรั่มผู้ป่วย penicilliosis marneffei ด้วยวิธี ELISA พบว่าซีรั่มผู้ป่วยจำนวน 17 รายใน 26 ราย (65%) ให้ผลบวกกับการทดสอบ ขณะที่ซีรั่มคนปกติและโปรตีนที่ได้จากการแตกเซลล์ของเชื้อ *C. albicans H. capsulatum* และ *C. neoformans* ไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิดนี้ [34] ในปี ค.ศ. 2000 Trewatcharegon และคณะได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ mycelial culture filtrate ของเชื้อรา *P. marneffei* และสามารถนำมาตรวจหา yeast cell ของเชื้อรา *P. marneffei* ใน biopsy tissue section ของผู้ป่วย penicilliosis marneffei โดยวิธี immunofluoresent staining ได้ [35]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (Cell – mediated immunity ; CMI) ของร่างกาย[36,37]

เมื่อมีแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย แอนติเจนนอกจากจะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีหรือระบบภูมิคุ้มกันชนิด humoral mediated immunity (HMI) แล้วยังไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิด Cell – mediated immunity (CMI) การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิด CMI นี้มี helper T- lymphocytes ($CD4^+$ cells) เป็นศูนย์กลางในการทำงานและมีเซลล์ชนิดต่างๆ หลายชนิดมาทำงานร่วมกันในการทำลายสิ่งแปลกปลอม ระบบ CMI นี้มีบทบาทมากในการทำลายแบคทีเรียชนิด intracellular bacteria ไวรัส เซลล์มะเร็ง และปฏิกิริยาปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (transplantation reaction)

T–lymphocyte Activation

การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิด CMI เริ่มต้นด้วยการกระตุ้น T-lymphocytes ชนิด helper cells หรือ $CD4^+$cells โดย exogenous antigen (เรียกการกระตุ้นนี้ว่า T–lymphocyte activation) ปกติ $CD4^+$cells จะล่องลอยอยู่ทั่วไปในกระแสเลือด และอยู่ใน lymphoid organs ต่าง ๆ เซลล์เหล่านี้มีที่สำหรับจับแอนติเจนอยู่บนผิวเซลล์ เรียกว่า T-cell receptor (TCR) ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดหนึ่ง ๆ เท่านั้น การกระตุ้น $CD4^+$cells เริ่มที่เมื่อมีแอนติเจนชนิด exogenous antigen เข้าสู่ร่างกาย แอนติเจนจะถูกจับและ process โดย antigen presenting cells (APC) จากนั้น antigen presenting cells จึงส่ง (present) peptide – class II MHC complex ไปให้ $CD4^+$cells ที่มี TCR ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ การกระตุ้น $CD4^+$cells นี้จะทำให้มีการส่งสัญญาณ (signal transduction) เข้าไปในเซลล์และทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง เช่น มีการสร้างโปรตีนหลายชนิดขึ้นมาใหม่บนผิวเซลล์ ทำให้ $CD4^+$cells เกิดการแบ่งตัว (proliferation) และมีการสร้างสาร lymphokines ชนิดต่างๆ ออกมามากมาย lymphokines ชนิดต่างๆ ที่ปล่อยออกมาจาก activated $CD4^+$cells นี้มีผลต่อเซลล์ต่างๆ มากมายและผลของ lymphokines เหล่านี้เองที่ก่อให้เกิดการทำลายสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย

Mediators of cell–mediated immunity

เมื่อฉีดแอนติเจนเข้าในผิวหนังของคนหรือสัตว์ที่เคยได้รับแอนติเจนชนิดนั้นมาก่อนภายใน 24 – 48 ชั่วโมง จะเกิดปฏิกิริยาอักเสบที่เรียกว่า delayed type hypersensitivity (DTH) เกิดขึ้นในตำแหน่งที่เกิดการอักเสบนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cell) อยู่เป็นจำนวนมาก แต่จากการศึกษาพบว่ามีเซลล์อยู่ไม่มากที่ถูกกระตุ้นได้อย่างจำเพาะเจาะจง (specificelly sensttized) ด้วยแอนติเจนที่ใช้ฉีด เซลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วยแอนติเจนนี้เป็นจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การอักเสบ โดยสร้างสารต่างๆ ไปชักนำเซลล์อื่นมาชุมนุมในตำแหน่งที่ฉีดแอนติเจนและก่อให้เกิดการอักเสบขึ้น สารที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดปฏิกิริยาอักเสบนี้เรียกว่าสารออกฤทธิ์ (mediator) ของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ สารออกฤทธิ์นี้สร้างโดยเซลล์หลายชนิด สารออกฤทธิ์ที่สร้างโดยลิมโฟซัยท์เรียกว่าลิมโฟไคน์ (lymphokines) และสารที่ออกฤทธิ์ที่สร้างโดยโมโนซัยท์หรือมาโครฟาจเรียกว่าโมโนไคน์ (monokines) และอาจเรียกโดยรวมว่าซัยโตไคน์ (cytokines) สารออกฤทธิ์ของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์นี้ สร้างขึ้นในปริมาณน้อยแต่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงมาก และมีผลต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น T และ B lymphocytes, macrophage และเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่น ๆ

การศึกษาในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ามีซัยโตไคน์หลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุม (regulatory molecules) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน สารดังกล่าวทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของเซลล์ชนิดต่างๆ การทำงานของซัยโตไคน์ดังกล่าวทำหน้าที่เหมือนสัญญาณติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ชนิดต่างๆ จึงเรียกชื่อซัยโตไคน์เหล่านี้ว่าอินเตอร์ลิวคิน (interleukin) ซึ่งปัจจุบันพบอยู่ 15 ชนิด (interleukin 1 – 15)

สารออกฤทธิ์บางชนิดที่สร้างโดยลิมโฟซัยท์

A. Mediator Affecting Macrophages

1. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

มีผู้พบว่าถ้านำชิ้นส่วนของม้าม (spleen fragment) จากหนูที่ฉีดด้วยเชื้อวัณโรค (tubercle bacilli) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติเจนของเชื้อวัณโรค (old tuberculin) อยู่เซลล์จะไม่เคลื่อนที่ออกจากม้าม แต่ถ้าเป็นม้ามของหนูปกติเซลล์จะไม่ถูกยับยั้งการเคลื่อน ปัจจุบันเราสามารถตรวจวัดการสร้าง MIF ในสัตว์ทดลองที่มีภูมิคุ้มกันได้โดยใช้เซลล์จากช่องท้อง (peritoneal exudate cell) ซึ่งประกอบด้วยมาโครฟาจ 70 – 80 % และลิมโฟซัยท์ 10 – 20 % ใส่ลงในหลอดแคปิลลารี่ (capillary tube) นำไปปั่นแล้วตัดตรง cell – fluid interface นำส่วนที่มีเซลล์มาวางในจานเลี้ยงเซลล์ (culture dish) แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติเจนหรือไม่มีแอนติเจนลงไป นำไปอบที่ 37 °C นาน 18 – 24 ชั่วโมง ในจากเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจนจะสังเกตเห็นการเคลื่อนที่ออกจากหลอดแคปิลลารี่ไปตามพื้นของจานเลี้ยงเซลล์เป็นรูปคล้ายพัด ส่วนจานเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติเจน เซลล์จะไม่เคลื่อนที่ออกจากหลอดแคปิลลารี่ พื้นที่การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ด้วยเครื่องวัดพื้นที่ (planimeter) แล้วคำนวนค่า migration inhibition โดยใช้สูตรคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{migration inhibition} = \left[\frac{\text{พื้นที่การเคลื่อนที่ของเซลล์เมื่อมีแอนติเจน}}{\text{พื้นที่การเคลื่อนที่ของเซลล์เมื่อไม่มีแอนติเจน}} \right] \times 100$$

ถ้ามีค่ามากกว่า 20% migration inhibition ถือว่าให้ผลการยับยั้ง MIF นอกจากจะเกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนแล้วยังเกิดจาก nonspecific reaction เช่น การกระตุ้นลิมโฟซัยท์ด้วยไมโตเจน

2. Macrophage Activation Factor (MAF)

มาโครฟาจจากสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เช่นสามารถยึดเกาะติดผิวแก้วได้ดี มีความสามารถในการกิน และฆ่าเชื้อโรคและเซลล์มะเร็งดีขึ้นถ้านำมาโครฟาจจากคนหรือสัตว์ปกติไปกระตุ้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้นลิมโฟซัยท์ด้วยแอนติเจนหรือไมโตเจน จะทำให้มาโครฟาจนั้นเปลี่ยนรูปร่างและหน้าที่ไป สารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นมาโครฟาจนี้เรียกว่า MAF ซึ่งมีผลต่อแมคโครฟาจหลายประการ เช่นเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะผิว เพิ่มความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม เพิ่มการใช้น้ำตาลและการสังเคราะห์โปรตีน เพิ่มประสิทธิภาพและการหลั่งน้ำย่อยจากไลโซโซมและเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อโรคและเซลล์มะเร็ง

3. Macrophage (monocyte) Chemotactic Factor (MCF)

ในตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา deleyed type hypersensitivity (DTH) หลังการฉีดแอนติเจน จะมีเซลล์แทรกซึมอยู่เป็นจำนวนมากซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวก nonsensitive mononeuclear cell และพบว่ามีลิมโฟซัยท์ส่วนน้อยที่ไว (sensitive) ต่อแอนติเจนที่ฉีด จึงอาจเป็นไปได้ว่าลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนนี้สร้างสารชักนำให้มาโครฟาจจากบริเวณอื่นมาชุมนุมกันอยู่ในบริเวณที่ฉีดแอนติเจน การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าลิมโฟซัยท์ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนเช่น PPD หรือ ไมโตเจนเช่น PHA สามารถสร้างสารชักนำมาโครฟาจ (MCF) รวมทั้งสารที่ชักนำเซลล์อื่น ๆ ได้

B. Mediators Affecting Polymorphonuolear Cell

1. Leukocyte – migration Inhibitory Factor (LIF)

การทดสอบ LIF ทำได้เช่นเดียวกับการทดสอบ MIF แต่ถ้าใช้เม็ดเลือดขาว (leukocyte) แทนมาโครฟาจ LIF สร้างโดยลิมโฟซัยท์ที่กระตุ้นโดยแอนติเจนหรือไมโตเจน LIF แตกต่างจาก MIF โดยพบว่า MIF ไม่มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Chemotatic Factors for Neutrophils, Basophils and Eosinophils

ลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นสามารถสร้างสารชักนำ (Chemotactic factors) สำหรับ polymorphoneuclear leukocyte ทั้ง 3 ชนิด แต่ยังไม่ทราบว่ามีเพียง factor เดียวสำหรับเซลล์ทุกชนิด หรือมีแต่ละ factor สำหรับเซลล์แต่ละชนิด

C. Mediators Affecting lymphocytes

1. Factors Affecting Antibody production

ภายหลังการกระตุ้นโดยแอนติเจนจำเพาะ sensitized lymphocytes จะสร้าง soluble factors ที่ช่วยในการสร้างแอนติบอดี ในคนพบว่าสารนี้จะช่วยให้ B–cell แบ่งตัว มีการสร้างโปรตีน และ IgG เพิ่มมากขึ้น

2. Lymphocyte Mitogenic Factor

ภายหลังการกระตุ้นโดยแอนติเจนจำเพาะ sensitized lymphocytes จะสร้าง soluble factor อย่างหนึ่งในอาหารที่เลี้ยง ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น mitogenic activity ต่อ non–sensitized lymphocytes โดยสารนี้สามารถชักนำให้ลิมโฟซัยท์ปกติเกิด blast transformation

3. Transfer factor

เป็น dialyzable materials ที่ได้จาก sensitized lymphocytes ที่สามารถเปลี่ยน normal เป็น sensitized individual ได้ คือ สารนี้สามารถทำให้ non–sensitized lymphocytes เปลี่ยนเป็น sensitized lymphocytes

D. Mediators Affecting Other cell types

1. Cytotoxic Factors (Lymphotoxin)

Immune lymphocytes อาจจะไปทำให้มีการแตกของ susceptible target cells ได้ 2 แบบ ด้วยกันคือ แบบแรก ลิมโฟซัยท์ไปเกาะติด (attach) และทำลาย target cells โดยตรง เรียกว่า direct lymphocyte mediated cytolysis และแบบที่สอง คือ ลิมโฟซัยท์ปล่อยสาร lymphotoxin ออกมาทำลาย target cells

2. อินเตอร์เฟอรอน

ไวรัสหลายชนิดสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างอินเตอร์เฟอรอนได้ พบว่าลิมโฟซัยท์อาจให้สารที่คล้ายอินเตอร์เฟอรอน (ปัจจุบันเรียกว่า gamma interferon ; IFN-γ) ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไวรัสหรือสารชักนำอื่น ๆ เราสามารถตรวจพบ IFN–γ ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงลิมโฟซัยท์ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระตุ้นด้วยแอนติเจน หรือไมโตเจนได้ การสร้าง IFN–γ ในกรณีที่มี immunologic reaction มีความสำคัญต่อร่างกายอย่างมากในการป้องกันการติดเชื้อ

อินเตอร์ลิวคินส์ (Interleukins)

1. interleukin 1 (IL–1)

IL–1 อาจเรียกในชื่ออื่น ๆ เช่น leukocyte–activating factor (LAF), B cell–activating factor (BAF), endogenous pyrogen, catabolin และ haematopoetin IL–1 สร้างโดยโมโนซัยท์หรือมาโครฟาจและเซลล์ที่มีนิวเคลียสอื่น ๆ การกระตุ้นมาโครฟาจให้สร้าง IL–1 ทำได้โดยใช้สารกระตุ้นพวก adjuvants เช่น LPS (Lipopolysaccharide) หรือ MDP (muramyly dipeptide) หรือสารอื่นเช่น calcium ionophore หรือ silica particles IL–1 ควบคุมการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูป (growth and differentiation) ของเซลล์หลายชนิด และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยควบคุมทั้ง T และ B cell และออกฤทธิ์ของการเกิดการอักเสบอีกด้วย IL–1 ช่วยในการเปลี่ยนแปลงรูปของลิมโฟซัยท์และกระตุ้น T cells ให้เพิ่มการสร้างลิมโฟไคน์ เช่น IL–2, CSF, B –cell growth factor (BCGF), IFN และ Chemotactic factor นอกจากนี้ยังช่วยในการทำงานของ cytotoxic T lymphocytes (CTL) และ NK cells รวมทั้งกระตุ้นให้ B cells แบ่งตัว เปลี่ยนรูป และสร้างแอนติบอดี การตรวจวัด IL–1 อาศัยคุณสมบัติของ IL–1 ที่ทำให้ ลิมโฟซัยท์เปลี่ยนแปลงรูป และแบ่งตัวเมื่อกระตุ้นด้วย PHA (Thymocyte co – stimulator assay) หรือการสร้าง IL – 2 จาก IL – 1 sensitive cell line ที่สร้าง IL–2 ได้เมื่อกระตุ้นด้วย IL – 1 กับ calcium ionophore

2. Interleukin–2 (IL–2)

IL–2 หรือเรียกว่า T cell growth factor (TCGF) เป็นสารที่สร้างโดย activated T-cellss IL–2 มีความสำคัญในการช่วยรักษาการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น T- cells, B-cells, NK-cells และ LAK (lymphokine – activated killer) cells และช่วยให้มีการหลั่งลิมโฟไคน์อื่น ๆ เช่น Interferon และ BCGF ลิมโฟไคน์ที่ช่วยในการแบ่งตัวเช่น lymphocyte mitogenic factor ก็คือ IL–2 IL–2 สร้างโดย helper cells เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนหรือไมโตเจน การตรวจวัด IL–2 อาศัยคุณสมบัติของ IL–2 ที่ช่วยในการเจริญและแบ่งตัวของ activated T cell โดยใช้ Cell line ที่ต้องอาศัย IL–2 ในการเจริญ (IL–2 dependent cell line) เช่น CTLL หรือใช้ activated T–cell blast ที่กระตุ้นด้วย PHA หรือ Con A เป็นเซลล์ตรวจวัด

3. Interleukin–3 (IL-3)

เป็นลิมโฟซัยท์ที่มีผลต่อเซลล์พวก progenitor stem–cells จึงมีความจำเป็นในการรักษาระบบภูมิคุ้มกัน IL–3 มีหน้าที่คล้ายกับ CSF มาก สร้างโดยโมโนซัยท์และ T cells มีคุณสมบัติเป็นสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชักนำ (chemoattractant) ต่อนิวโทรฟิล ช่วยในการเจริญของอีโอซิโนฟิล แกรนูโลซัยท์ มาโครฟาจ และเซลล์ mixed pluripotent progenitors ส่งเสริมการปล่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงออกจากไขกระดูก ช่วยในการจับกลุ่ม (colony stimulation) ของเมกาคาริโอซัยท์ (megakaryocyte) และมาสท์เซลล์ (mast cells) การตรวจวัด IL–3 อาศัยคุณสมบัติของ IL–3 ในการช่วยการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์พวกโมโนซัยท์ และ polymorphonuclear cells โดยวิธี colony – forming assays หรือวัดการเจริญ (IL – 3 dependent cell lines) เช่น doned mast – cell line MC/9

4. Interleukin–4 (IL–4)

IL–4 มีชื่อเรียกอื่นว่า B–cell stimulatiation factor (BCSF–1), B cell growth factor 1 (BCGF–1) และ B–cell differentiation factor (BCDF) IL–4 สร้างโดย T–cells มีผลต่อทั้ง B–cells, T–cells และมาโครฟาจ และอาจมีความจำเป็นในการคงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย IL–4 มีผลต่อ B–cells หลายอย่างเช่นชักนำให้เปลี่ยนการสร้าง IgM ไปเป็น IgG เพิ่มระดับอิมมูโนโกลบุลินใน B–cells ที่ถูกกระตุ้น ช่วยในการแบ่งตัวของ T–cells และการเกิด cytotoxic T lymphocyte นอกจากนี้ IL–4 ยังสามารถกระตุ้นมาโครฟาจและแกรนูโลซัยท์ได้เช่นเดียวกับ MAF และ CSF การตรวจวัด IL–4 ทำได้โดยวัดผลของ IL–4 ในการช่วยให้ B–cells แบ่งตัว (proliferalation of B-cells) โดยใช้ B cells จากม้ามของหนูเป็นเซลล์ตรวจวัด

5. Interleukin–5 (IL–5)

IL–5 อาจเรียกว่า TRF (T–cell replacing factor) หรือ EDF (Eosinophil differentiation factor) เป็นสารที่ช่วยในการเจริญของ B-cells และชักนำให้มีการหลั่ง IgM IL–5 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอีโอซิโนฟิล จึงเชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อหนอนพยาธิ การตรวจวัด IL–5 อาศัยคุณสมบัติในการชักนำให้ B-cells มีการหลั่ง IgM และตรวจวัดโดยวิธี reverse plaque – forming cell assay for IgM

6. Interleukin–6 (IL–6)

IL – 6 อาจเรียกว่า B – cell differentiation factor 2 (BCDF–2) หรือ interferon B_2 (IFN – B_2) IL–6 มีหน้าที่หลายประการ เช่นชักนำการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ B-cells เพิ่มการแสดงออกของ IgM บนเซลล์ ส่งเสริม cytotoxic T lymphocytes ช่วยในการเจริญของ myeloid cells IL–6 ยังกระตุ้นให้ hepatocyte สร้างสาร acute–phase reactant proteins จึงมีบทบาทสำคัญในการอักเสบ และยังมีฤทธิ์เป็น nerve growth factor like activity อีกด้วย การตรวจวัด IL–6 อาศัยคุณสมบัติที่ทำให้ IL–6 responsive cell line หลั่งอิมมูโนโกลบุลิน แล้วตรวจวัดโดยวิธี ELISA หรือ reverse plaque forming cell assay

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. Interleukin–7 (IL–7)

เป็นสารที่สร้างโดย stroma cells ในไขกระดูกและกระตุ้นทั้ง pro– และ pre–B lymphocyte ให้แบ่งตัว หน้าที่อื่น ๆ ยังไม่ทราบแน่ชัด

8. Interleukin–8 (IL–8)

เป็นโปรตีนที่สร้างโดยโมโนซัยท์และเซลล์อื่น ๆ มีผลในการชักนำการเคลื่อนที่ของนิวโตร-ฟิล (neutrophil chemotactic peptode)

9. Interleukin–9 (IL–9)

เป็น lymphokine ที่สร้างจาก TH2 cell ทำหน้าที่ในการกระตุ้น T–cell proliferation

10. Interleukin–10 (IL–10)

เป็น lymphokine ที่สร้างจาก TH2 cells และ B cells ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ TH1 cells

11. Interleukin–11 (IL–11)

เป็นสารที่สร้างโดย stromal cells มีผลในการกระตุ้น B–cells

12. Interleukin–12 (IL–12)

สร้างโดย macrophages หรือ B – cells มีผลเกี่ยวข้องกับ TH1 cells และ NK cells

13. Interleukin–13 (IL–13)

เป็น lymphokines ที่สร้างโดย TH2 cells มีหน้าที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้น B–cell proliferation และ immunoglobulin secretion โดยไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา cell–mediated immunity และ delayed hypersensitivity

14. Interleukin–14 (IL –14)

สร้างโดย B –cells มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ B–cells

15. Interleukin–15 (IL–15)

สร้างโดย mononuclear cells ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ T–cells

Clinical Significance

จากการศึกษาพบว่าการสร้างสารออกฤทธิ์ (mediator) โดยลิมโฟซัยท์ในคนปกติมีความสัมพันธ์กับสถานะภาพของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ของร่างกายคือสารเหล่านี้จะไม่มีการสร้างถ้าพบว่า delayed type skin test ให้ผลลบ ลิมโฟซัยท์จากผู้ป่วยบางคนที่มี depressed CMI จะไม่สามารถสร้างสารเหล่านี้ เช่นผู้ป่วยที่เป็น Digeorge syndrome ดังนั้นเราอาจใช้ MIF assay ในการหา sensitized lymphocytes ในผู้ป่วยบางคนที่มีความผิดปกติทางระบบภูมิคุ้มกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารออกฤทธิ์เป็นตัวสำคัญที่ก่อให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ดังนี้ คือเมื่อ sensitized lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนจำเพาะจะได้ activated lymphocytes แล้วจะเริ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว chemotactic factors จะทำให้เม็ดเลือดขาว mononuclear leukocytes และ polymorphonuclear leukocytes มารวมกันอยู่ที่ reaction site และถูกทำให้อยู่กับที่โดย MIF และ LIF มาโครฟาจถูกกระตุ้นด้วย activating factor จะกินเชื้อโรคได้ดีมาก ส่วนลิมโฟซัยท์ปกติในบริเวณนั้นจะถูกกระตุ้นด้วย mitogenic factor จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างมาก แล้วถูก transfer factor ทำให้กลายเป็น sensitized lymphocytes ก็จะเริ่มสร้างสารออกฤทธิ์อีก จะเห็นว่าเป็นการเพิ่มปฏิกิริยาของร่างกาย (amplify initially small reaction) เมื่อ inflammatory cells ถูกกระตุ้นจะมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือเซลล์มะเร็ง

การทดสอบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์

1. Delayed Hypersensitivity skin test

การทดสอบ delayed hypersensitivity skin test ซึ่งทำได้โดยการฉีดสารเข้าในผิวหนัง (intradermal) เป็นวิธีทดสอบที่ง่ายและมีประโยชน์โดยใช้วัด cutaneous hypersensitivity ต่อแอนติเจน ซึ่งมีประโยชน์มากในแง่ระบาดวิทยา การมี skin test negative ต่อ common skin antigens หลายชนิด เรียกว่า " Anergy " อาจเกิดจากภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคติดเชื้อบางชนิด การทำ skin tests อาจจะทำได้ 2 วิธีด้วยกัน คือ Intradermal skin test โดยมากใช้ทดสอบแอนติเจนชนิดต่างๆ และ Contact sensitivity โดยมากใช้ทดสอบพวกสารเคมี เช่น dinitrochlorobenzene (DNCB)

2. Lymphocyte Activation

เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในการศึกษาภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ภูมิต้านทานตนเอง โรคติดเชื้อ และโรคมะเร็ง

2.1 Lymphocyte transformation test

วิธีนี้ทำได้โดยการกระตุ้นลิมโฟซัยท์ของผู้ป่วยด้วย ไมโตรเจน เช่น PHA (Phytohemagglutinin) Con A (concavalin A) หรือโดยใช้แอนติเจนแล้วเพาะเลี้ยงลิมโฟซัยท์นั้นในอาหารเลี้ยงเซลล์นาน 72 ชั่วโมง (สำหรับไมโตรเจน) หรือ 5 – 7 วัน (สำหรับแอนติเจน) นำมาตรวจหา blast transformation (นับจำนวนลิมโฟซัยท์) แต่วิธีนี้ง่ายและแม่นยำกว่าคือการเติม ^{3}H–TdR (Tritiated thymidine) แล้ววัดจำนวน ^{3}H–Tdr (Tritiated thymidine) ที่ถูกนำเข้าไปใน DNA ของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Test

การทดสอบหาสารออกฤทธิ์ที่เรียกว่า MIF ทำได้โดยนำลิมโฟซัยท์จากผู้ป่วยมากระตุ้นด้วยไมโตรเจนหรือแอนติเจนจำเพาะ ถ้าลิมโฟซัยท์นั้นปกติก็จะปล่อยสารที่ออกฤทธิ์ออกมาซึ่งมี MIF รวมอยู่ด้วย ทดสอบหา MIF โดยใช้มาโครฟาจของหนูตะเภา (guinea pig macrophage) เป็นเซลล์ทดสอบ (indicator cell) โดยบรรจุมาโครฟาจของหนูตะเภาไว้ในหลอดแคปิลลารีแล้ววางในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ media supernate จากการกระตุ้นลิมโฟซัยท์ของผู้ป่วยอยู่ด้วย ถ้าในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มี MIF มาโครฟาจจะเคลื่อนที่ออกจากหลอดแคปิลลารีเห็นเป็นลักษณะรูปพัด แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเซลล์มี MIF มาโครฟาจของหนูตะเภาจะไม่มีการเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่น้อยมาก

2.3 Mixed lymphocyte Culture

การทดสอบ Mixed lymphocyte Culture (MLC) ทำได้โดยนำเอาลิมโฟซัยท์จากคนหนึ่งมาเพาะเลี้ยงร่วมกับลิมโฟซัยท์ของอีกคนหนึ่ง จะเห็นว่าเป็นการกระตุ้นด้วยแอนติเจนโดยลิมโฟซัยท์จะตอบสนองต่อ foreign histocompatibility antigen ของลิมโฟซัยท์ของอีกคนหนึ่ง ดังนั้นวิธี MLC จึงแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ “one way” และ “two way assay”

2.3.1 one – way MLC ทำได้โดยการนำ stimulating cells มาทำ irradistion (ประมาณ 2000 R) หรือ treat ด้วย mitomycin ซึ่งเป็นสารที่ป้องกันมิให้มี DNA synthesis โดยมิได้ฆ่าเซลล์ ดังนั้นถ้ามีการสร้าง DNA ใน MLC จะต้องเกิดจาก non – irradiated หรือ non mitomycin – treated cells

2.3.2 two – way MLC ทำได้โดยการผสมลิมโฟซัยท์ทั้งสองฝ่ายเข้าด้วยกัน จะเห็นว่า DNA synthesis ทั้ง 2 ฝ่ายซึ่งเป็นผลรวม

3. Assays for Human T and B lymphocytes

ตามที่ทราบแล้วว่าลิมโฟซัยท์แบ่งออกเป็นชนิดใหญ่ ๆ ได้ 2 ชนิด คือ T (Thymus derived) และ B (Bursa – derived) และทราบว่า T cells มีหน้าที่สำคัญในระบบ CMI ส่วน B cells มีหน้าที่สำคัญในระบบ HMI ดังนั้นการหาปริมาณของ T และ B cells จึงมีประโยชน์ในการช่วยตรวจดูสภาพภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ก่อนที่จะทำการนับปริมาณของ T และ B cells จะต้องเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดียวให้ได้เสียก่อน โดยนำเลือดมาเติมบน Ficoll – Hypaque solution แล้วนำไปปั่นจะได้ PBML (Peripheral Blood Mononuclear Leukocytes; Lymphocytes และ Monocytes) อยู่ระหว่างชั้นของพลาสมากับ Ficoll – Hypaque solution PBMLs ที่แยกได้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดียวมากกว่า 90 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 T lymphocyte assay

T-cells ของคนสามารถจับเม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cells) แล้วเกิด rosette formation ได้ marker อันนี้เรียกว่า E (erythrocyte) rosette เราทำ E – rosette test ได้โดยนำเม็ดเลือดแดงแกะมาผสมกับ PBML ด้วยอัตราส่วน 50:1 – 100:1 หลังจากอบที่ 37 °C 15 – 60 นาที จึงนำไปไว้ที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมงแล้วนำมาตรวจหาปริมาณ E – rosette ซึ่งคนปกติจะมี 60 – 70 %

3.2 B lymphocyte Assay

3.2.1 Surface Immunoglobulin ลิมโฟซัยท์ที่มีอิมมูโนโกลบุลินอยู่ที่ผิวเซลล์จะเป็น B-cells ซึ่งตรวจหาได้โดยการย้อมลิมโฟซัยท์ด้วย Fluorescein – labeled antihuman immunoglobulin ในคนปกติจะมี B–cells 16 – 28 %

3.2.2 EAC rosette (Erythrocyte – Antibody – Complement rosette) วิธีนี้อาศัยหลักที่ว่า B cells จะมี C3b receptor อยู่ที่ผิวเซลล์ และทดสอบได้โดยใช้เม็ดเลือดแดงวัว (OX RBC) ที่จับด้วย IgM antibody ต่อเม็ดเลือดแดงวัวและเติมคอมพลีเมนท์จำนวนน้อย ๆ จะได้ Erythrocyte – Ab – Complement complex เรียกว่า EAC นำ EAC มาอบร่วมกับลิมโฟซัยท์จะได้ EAC rosette การหา B cells โดยวิธีนี้จะได้ค่าปกติ 10 – 19 %

ระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อรา *P. marneffei*

ระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านเชื้อรามักเป็นหน้าที่ของ cell mediated immunity ซึ่งจะทำให้เกิด type IV hypersensitivity นอกจากนั้นยังอาจทำงานร่วมกับ macrophages และ neutrophils ในปี ค.ศ. 1996 Kudeken และคณะพบว่าเมื่อให้ conidia ของเชื้อ *P. marneffei* ทางหลอดลมของหนู mice ทั้งกลุ่มที่ตัดและไม่ตัดต่อมไทมัส จะพบว่าหนูที่ไม่ได้ตัดต่อมไทมัสจะมีเชื้ออยู่ที่ปอดแล้วจึงกระจายไปที่ตับและม้าม อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อที่อวัยวะเหล่านี้จะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งต่างจากหนูกลุ่มที่ตัดต่อมไทมัส ซึ่งจะมีเชื้ออยู่จำนวนมากในอวัยวะดังกล่าว นอกจากนั้นหนูยังแสดงอาการของโรคให้เห็นได้อย่างชัดเจน และเมื่อให้ T-cells จากม้ามของหนูที่ไม่ได้ตัดต่อมไทมัสแก่หนูที่ตัดต่อมไทมัส จะพบว่าจำนวนเชื้อ *P. marneffei* ที่ปอด ตับ และม้าม ลดลงอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองจะแสดงให้เห็นว่า ระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ โดยเฉพาะ T-cells มีบทบาทสำคัญยิ่งในการป้องกันการติดเชื้อ *P. marneffei*[38]

ในปี ค.ศ. 1998 Kudeken ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการทำลายเชื้อ *P. marneffei* ในรูป yeast cells และ conidia โดยใช้ macrophage ของหนู พบว่าในสภาวะที่ macrophage ถูกกระตุ้นด้วย IFN-γ ร่วมกับ yeast cells ของเชื้อ *P. marneffei* จะมีการผลิต NO ขึ้นมาทำลายเชื้อได้มากกว่าการกระตุ้น macrophage ด้วย IFN-γ ร่วมกับ conidia และพบว่า macrophage สามารถทำลาย yeast

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cells ได้ แต่ไม่สามารถทำลายส่วนของ conidia ได้ ความสามารถในการทำลาย yeast cells จะลดลงหากการสังเคราะห์ NO ถูกยับยั้ง[39] และในปีถัดมาพบว่าการกระตุ้น human neutrophils ด้วย GM-CSF จะชักนำให้ neutrophils สามารถทำลาย yeast cells ของเชื้อ *P. marneffei* ได้เพิ่มมากขึ้น โดยกลไกการนี้ไม่อาศัย supperoxide anion แต่อาศัยสารพิษที่อยู่ในเม็ด gramules ซึ่งอาจเป็น cationic protein, lysosome, lactoferrin, acid phosphatase, β-glucuronidase และ esterase ซึ่งสารเหล่านี้จะสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อนและการปล่อยสารออกจากเม็ด granules จะถูกยับยั้งได้โดย colchicine[40]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ของคนปกติส่วนใหญ่ (> 90%) มีการตอบสนองโดยเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 391H ซึ่งการตอบสนองนี้จะลดลงอย่างมากในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีระยะไม่แสดงอาการ และจะไม่มีการตอบสนองปรากฏเห็นในผู้ป่วยเอดส์ทั้งที่ติดและไม่ติดเชื้อรา *P. marneffei* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคนปกติทั่วไปอาจเคยสัมผัสกับเชื้อราชนิดนี้มาก่อน และร่างกายมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อทั้งทาง HMI และ CMI ดังนั้นจึงไม่แสดงอาการของโรค แต่ในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะถูกทำลาย โดยเฉพาะ memmory $CD4^+$ T cells ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ดังนั้นจึงมีโอกาสแสดงอาการของโรค penicilliosis marneffei ได้ง่ายกว่าคนปกติ[41]

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็น recall antigen ของโปรตีนที่เชื้อ *P. marneffei* ปล่อยออกมา และที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อ พร้อมทั้งนำโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้มาสำรวจหาจำนวนกลุ่มประชากรที่คาดว่าเคยสัมผัสกับเชื้อ *P. marneffei* มาก่อน และมีระบบภูมิคุ้มกันที่จดจำต่อแอนติเจนของเชื้ออยู่ภายในร่างกาย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากผลการทดลองคือทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจวัดระดับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี แทนการใช้ PPD และ BCG

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัสดุและวิธีการวิจัย

ตัวอย่างศึกษา

คนปกติที่มีภูมิลำเนาอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 16 ราย แบ่งเป็นผู้ชาย 5 ราย ผู้หญิง 11 ราย อายุเฉลี่ย 23 ปี (ระหว่าง 21-31 ปี) ทุกรายมีสุขภาพดีขณะทำการเจาะเก็บเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียม peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

เจาะเก็บเลือดทาง venous blood 10 ml. ใส่ลงใน sterized test tube ที่มี heparin 500 IU/ml (Novo Industrail Corenhagen, Denmark) บรรจุอยู่ 0.1 ml.ผสม fresh heparinized blood กับ steriles PBS ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร นำเลือดที่เจือจางแล้วมา overlayer บน Ficoll-Hypaque (F-H) โดยใช้อัตราส่วน F-H ต่อเลือดเท่ากับ 1 : 3 นำเลือดไปปั่นด้วยความเร็ว 200 xg เป็นเวลา 30 นาที ใช้ pasture pipette ค่อย ๆ ดูด PBMCs ที่อยู่เหนือชั้นของ Ficoll – Hypaque มาใส่อีกหลอดหนึ่ง จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วย sterile PBS ที่ความเร็ว 200 xg นาน 15 นาที และปั่นล้างครั้งที่ 2 ด้วย RPMI – 1640 ความเร็ว 200 xg นาน 10 นาที ปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1.5 x 10^6 cells/ml ด้วย complete RPMI – 1640 (10% FCS RPMI –1640) PBMCs ที่เตรียมได้ต้องมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 90 % ซึ่งทดสอบโดยวิธี trypan blue dye exclusion test

การเตรียมตัวเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium marneffei*

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรค penicilliosis marneffei บน Brain heart infusion (BHI) agar slant ที่ 37 °C จนกระทั่งเชื้อในรูป mycelial form เปลี่ยนเป็นรูป yeast form จึงทำการ subculture เชื้อลงบน brain heart infusion agar slant หลอดใหม่เลี้ยงที่ 37 °C จนกว่าเชื้อเจริญเต็มผิวหน้า slant (ใช้เวลาประมาณ 4 – 5 วัน) เติม sterile 0.85% NaCl (Normal Saline Solution , NSS) 5 ml ลงไปในหลอดที่เพาะเชื้อ ใช้ loop ขูดเชื้อเบา ๆ จนหลุดจากผิวหน้า slant เทเชื้อที่ขูดได้ลงใน flask ขนาด 250 ml ที่บรรจุ Brain heart infusion broth (BHB) 100 ml จำนวน 5 flasks โดยเทเชื้อลงไปในอัตราส่วน 1 หลอดต่อ 1 flask เลี้ยงเชื้อในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเขย่า fasks ตลอดเวลาที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลานาน 4 วัน จากนั้นปั่นแยกเก็บเซลล์เชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 1,500 xg นาน 10 นาที สำหรับเซลล์เชื้อจะทำการปั่นล้างด้วย sterile NSS 3 ครั้งที่ความเร็ว 1,500 xg นาน 10 นาที ครั้งสุดท้ายดูด supernatant ทิ้งให้หมด แล้ว suspension เชื้อใน 5 ml sterile NSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมโปรตีนแอนติเจนโดยการแตกเซลล์เชื้อ *P. marneffei*[41]

ทำการแตกเซลล์ของเชื้อ *P. marneffei* ที่เตรียมได้ด้วยเครื่อง ultrasonicator ที่ 200 วัตต์ 30 วินาที โดยทำซ้ำกัน 6 ครั้ง การควบคุมความร้อนที่เกิดขึ้นโดยใช้น้ำแข็งใส่รอบ ๆ beaker หลังจากดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อแตกหมด จึงนำไปปั่นที่ 1,500 xg นาน 15 นาทีเพื่อเก็บ supernatant เจือจาง supernatant ด้วย sterile NSS ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จากนั้นนำไป dialyzed ด้วย 0.1% NaCl solution ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน 0.1% NaCl ทุก ๆ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 10 นาที แล้วดูด supernatant มากรองผ่าน 0.2 µm millipore membrane filter วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry' s method พร้อมทั้งทดสอบ sterility โดยนำไปเพาะเชื้อใน Blood agar plate ภายหลังการทดสอบ sterility แล้วพบว่าปราศจากเชื้อ จึงแบ่งเก็บโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้เป็นปริมาตรน้อย ๆ เก็บที่ – 20 °C จนกว่าจะใช้งาน

การเตรียมโปรตีนแอนติเจนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei*[42]

นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน ส่วนแรกนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย 100% ammonium sulfate ส่วนที่สองตกตะกอนด้วย 70% ammonium sulfate ปั่นเก็บตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 1,500 xg นาน 10 นาที แล้วละลายด้วย 10 ml sterile NSS จากนั้นนำไป dialyzed ด้วย 0.1% NaCl solution ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน 0.1% NaCl ทุก ๆ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 10 นาที แล้วดูด supernatant มากรองผ่าน 0.2 µm millipore membrane filter วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry' s method พร้อมทั้งทดสอบ sterility โดยนำไปเพาะเชื้อใน Blood agar plate ภายหลังการทดสอบ sterility แล้วพบว่าปราศจากเชื้อ จึงแบ่งเก็บโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้เป็นปริมาตรน้อย ๆ เก็บที่ – 20 °C จนกว่าจะใช้งาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนโดยวิธี Lowry's method

หลักการ

เป็นการหาความเข้มข้นของโปรตีนโดย peptide nitrogen จะทำปฏิกิริยากับ copper (II) ion ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH 10-10.5) และ Folin & Ciocal teu's phenol reagent จะถูก reduce ไปเป็น heteropolymolibdinum blue โดย copper-catalyzed oxidization ของ aromatic acid

วิธีทดลอง

1. เจือจาง 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) และโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้ในแต่ละวิธีเป็น two fold dilution ด้วยน้ำกลั่น โดยมี undilution ตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:256
2. เติม BSA และ โปรตีนแอนติเจน ที่เจือจางแล้วลงใน microplate หลุมละ 20 µl
3. เติม solution D (ภาคผนวก) หลุมละ 180 µl
4. incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
5. เติม 1 N dilute Folin & Ciocal teu's phenol reagent (ภาคผนวก) หลอดละ 15 µl
6. ผสมให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm
8. นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นต่างๆ ของ BSA (standard) ไปเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve)
9. หาความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้ในแต่ละวิธีจากกราฟมาตรฐาน

การหาปริมาณความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง

นำ 1.5 x 10^6 cells/ml PBMCs ของอาสาสมัครจำนวน 4 ราย (ผู้ชาย 1 ราย ผู้หญิง 3 ราย) จำนวน 100 µl เติมลงในแต่ละหลุมของ microculture plate (NUNCLON , DELTA) ที่มี และ PHA-P ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.25, 5.0, 12.5, 17.5 และ 25.0 µg/ml ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 200 µl ด้วย complete RPMI-1640 ในแต่ละความเข้มข้นของ PHA-P จะทำสามหลุมซ้ำกัน (trypicate) เพาะเลี้ยง PBMCs ที่ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ความชื้นมากกว่า 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมงก่อน การเก็บเซลล์เติม tritiated – thymidine ความเข้มข้น 0.2 µCi/well (5.0 Ci/mmol; Amersham) ในแต่ละหลุม เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง automatic cells harvester ลงบน glass microfiber filter แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเติม scintillation fluid 5.0 ml และวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter ในหน่วย cpm

การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง

นำ 1.5 x 10^6 cells/ml PBMCs ของอาสาสมัคร 1 ราย จำนวน 100 µl เติมลงในแต่ละหลุมของ microculture plate (NUNCLON, DELTA) ที่มีโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา (ตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ) หรือรูปที่ได้จากการแตกเชื้อ ความเข้มข้น 0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 4.8 และ 9.6 µg/well จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 200 µl ด้วย complete RPMI-1640 แต่ละความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน จะทำสามหลุมซ้ำ นำ microculture plate ไป incubate ที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ความชื้นมากกว่า 95% เป็นเวลา 7 วัน และ 18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่วโมงก่อน การเก็บเซลล์เติม tritiated – thymidine ความเข้มข้น 0.2 μCi/well (5.0 Ci/mmol; Amersham) ในแต่ละหลุม เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง automatic cells harvester ลงบน glass microfiber filter แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเติม scintillation fluid 5.0 ml และวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter ในหน่วย cpm

การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วย (PHA-P)

นำ 1.5 x 10^6 cells/ml PBMCs ของคนปกติ 100 μl จำนวน 16 ราย มากระตุ้นด้วย PHA-P ความเข้มข้น 0.25 μg/ml และ 0.5μg/ml จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 200 μl ด้วย complete RPMI-1640 แต่ละความเข้มข้นของPHA-P จะทำสามหลุมซ้ำ นำ microculture plate ไป incubate ที่ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ความชื้นมากกว่า 95% เป็นเวลา 7 วัน และ 18 ชั่วโมงก่อน การเก็บเซลล์เติม tritiated – thymidine ความเข้มข้น 0.2 μCi/well (5.0 Ci/mmol; Amersham) ในแต่ละหลุม เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง automatic cells harvester ลงบน glass microfiber filter แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเติม scintillation fluid 5.0 ml และวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter ในหน่วย cpm

การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*

นำ 1.5 x 10^6 cells/ml PBMC ของคนปกติ 100 μl จำนวน 16 ราย มากระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ในรูปที่เชื้อปล่อยออกมาและที่เตรียมได้การแตกเชื้อสายพันธุ์ 673H ความเข้มข้น 0.8, 1.6, 2.4 μg/well สำหรับสายพันธุ์ LN 124 จะใช้เฉพาะความเข้มข้นที่ 1.20 μg/well โปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 391 H และ F947 ที่ความเข้มข้น 1.28 μg/well จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 200 μl ด้วย complete RPMI-1640 แต่ละความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน จะทำสามหลุมซ้ำ นำ microculture plate ไป incubate ที่ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ความชื้นมากกว่า 95% เป็นเวลา 7 วัน และ 18 ชั่วโมงก่อน การเก็บเซลล์เติม tritiated – thymidine ความเข้มข้น 0.2 μCi/well (5.0Ci/mmol; Amersham) ในแต่ละหลุม เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง automatic cells harvester ลงบน glass microfiber filter แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเติม scintillation fluid 5.0 ml และวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter ในหน่วย cpm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วย PPD และ BCG

นำ 1.5 x 10^6 cells/ml PBMCs ของคนปกติ 100 µl จำนวน 4 ราย มากระตุ้นด้วย PPD และจำนวน 12 ราย มากระตุ้นด้วย BCG ที่ความเข้มข้น0.75 µg/ml จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 200 µl ด้วย complete RPMI-1640 แต่ละความเข้มข้นจะทำสามหลุมซ้ำ นำ microculture plate ไป incubate ที่ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ความชื้นมากกว่า 95% เป็นเวลา 7 วัน และ 18 ชั่วโมงก่อนการเก็บเซลล์เติม tritiated – thymidine ความเข้มข้น 0.2 µCi/well (5.0 Ci/mmol; Amersham) ในแต่ละหลุม เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง automatic cells harvester ลงบน glass microfiber filter แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเติม scintillation fluid 5.0 ml และวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter ในหน่วย cpm

การแยก fractions โปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*

นำโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H ที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 100% ammonium salfate (มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้ PBMCs คนปกติแบ่งเซลล์ได้มากกว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีอื่น) มาแยก fractions โดยวิธี column chromatography ซึ่งใช้ Sephadex G-100 gel filtration (pore size 40 - 120 µm) เป็นตัวคัดแยกโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 4,000-510,000 สำหรับ column ที่ใช้มีเส้นผ่านจุดศูนย์กลาง 1.5 cm ยาว 53 cm อัตราการไหลของสารละลายจะถูกปรับให้อยู่ที่ระดับ 3 ml/10 min fractions ที่แยกได้ในแต่ละหลอดจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer (UV-1201; Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 280 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน fractions กับค่าการดูดกลืนแสง พร้อมทั้งรวม protein fractions ที่อยู่ตรงยอดกราฟเข้าด้วยกัน นำไป lyophilized จนเป็นผงแห้ง แล้วละลายด้วย 1 ml sterile distiled water กรองผ่าน 0.2 µm millipore membrane filter วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry' s method พร้อมทั้งทดสอบ sterility โดยนำไปเพาะเชื้อใน Blood agar plate ภายหลังการทดสอบ sterility แล้วพบว่าปราศจากเชื้อ จึงแบ่งเก็บโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้เป็นปริมาตรน้อย ๆ เก็บที่ – 20 °C จนกว่าจะใช้งาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่กระตุ้นด้วย fractions โปรตีนแอนติเจน

นำ 1.5 x 10^6 cells/ml PBMCs ของคนปกติ 100 µl จำนวน 7 ราย (5 รายตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย crude secreted form protein antigen 2 รายไม่ตอบสนอง) มากระตุ้นด้วย fractions โปรตีนแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.8, 1.6, 2.4 µg/well ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 200 µl ด้วย complete RPMI-1640 แต่ละความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน จะทำสามหลุมซ้ำ นำ microculture plate ไป incubate ที่ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ความชื้นมากกว่า 95% เป็นเวลา 7 วัน และ 18 ชั่วโมงก่อน การเก็บเซลล์เติม tritiated – thymidine ความเข้มข้น 0.2 µCi/well (5.0 Ci/mmol; Amersham) ในแต่ละหลุม เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์ด้วยเครื่อง automatic cells harvester ลงบน glass microfiber filter แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเติม scintillation fluid 5.0 ml และวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter ในหน่วย cpm

การแสดงผลการตอบสนองของเซลล์

การแสดงผลการตอบสนองของเซลล์ภายหลังจากถูกกระตุ้นด้วย mitogen และ แอนติเจนชนิดต่างๆ จะแสดงเป็นค่า Stimulating Index (SI) ซึ่งคำนวณได้ดังนี้คือ

$$SI = \frac{\text{ค่า cpm ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้น}}{\text{ค่า cpmในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น}}$$

ในการทดลองนี้จะกำหนดค่า Stimulating Index ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า เป็นค่าที่ถือว่ามีการตอบสนองต่อการกระตุ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการวิจัย

การหาความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนโดยวิธี Lowry's method

จากการทดลองหาความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้จากการแตกเซลล์เชื้อและการตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี Lowry's method พบว่าแต่ละวิธีและเชื้อแต่สายพันธุ์ จะได้ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่แตกต่างกัน กล่าวคือโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 100% และ 70% ammonium sulfate จะมีความเข้มข้นสูงกว่าที่เตรียมได้จากการแตกเซลล์เชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี

วิธีเตรียมโปรตีนแอนติเจน	ความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน (μg/ml)
แตกเชื้อสายพันธุ์ 673H	800
ตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 673H ด้วย 100% ammonium sulfate	24,400
ตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ 673H ด้วย 70% ammonium sulfate	22,300
แตกเชื้อสายพันธุ์ LN124	1,500
ตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ LN124 ด้วย 100% ammonium sulfate	30,000
แตกเชื้อสายพันธุ์ 391H	4,740
แตกเชื้อสายพันธุ์ F947	960

การหาปริมาณความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง

จากการทดลอง กระตุ้น PBMCs ของคนปกติ จำนวน 4 รายด้วย PHA-P ที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.25, 5.0, 12.5, 17.5 และ 25.0 μg/ml เป็นเวลานาน 3 วัน พบว่า PHA-P ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 ถึง 12.5 μg/ml สามารถกระตุ้น PBMCs ของคนปกติให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูง (17.5 และ 25.0 μg/ml) การแบ่งเซลล์จะลดน้อยลง ดังแสดงในตารางที่ 2 และ

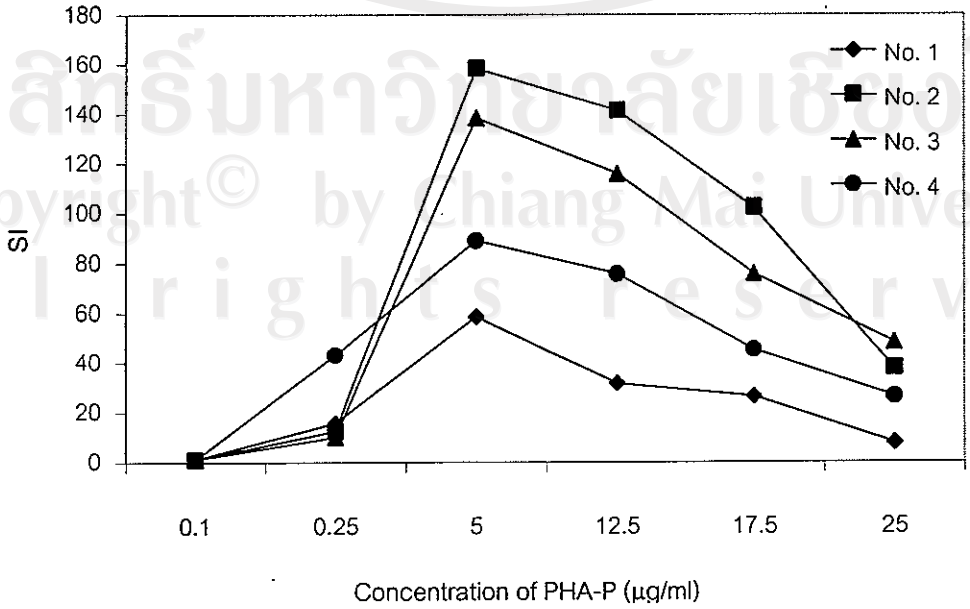
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีภาวะความเป็นพิษของ PHA-P เกิดขึ้น ในการทดลองครั้งนี้จะทำการกระตุ้น PBMCs ด้วย PHA-P ควบคู่ไปกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นจะนานถึง 7 วัน ดังนั้นความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นที่ต้องใช้เวลานานกว่าปกติ (3วัน) จึงต้องเลือกใช้ความเข้มข้นที่ suboptimal โดยตลอดการทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้นของ PHA-P ที่ 0.25 และ 0.5 μg/ml เป็น suboptimal dose

ตารางที่ 2 การหาปริมาณความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง

No. of test	Stimulating Index					
	Concentration of PHA – P (μg/ml)					
	0.1	0.25	5.0	12.5	17.5	25.0
1	1.1	15.7	58.6	31.9	26.5	7.7
2	1.0	12.5	158.3	141.4	102.5	38.1
3	1.1	10.1	138.3	116.0	76.1	48.6
4	1.0	43.1	89.2	75.9	45.6	26.5
Mean	1.05	20.35	111.10	91.30	62.68	30.23
SD	0.06	15.34	45.47	47.91	33.50	17.52

กราฟที่ 1 การหาปริมาณความเข้มข้นของ PHA-P ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง

จากการทดลองกระตุ้น PBMCs ของคนปกติด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ทั้งในรูปที่เชื้อปล่อยออกมา และ ได้จากการแตกเชื้อ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 4.8 และ 9.6 µg/well พบว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้ในแต่ละวิธีสามารถกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติแบ่งเซลล์ได้ โดยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 ถึง 4.8 µg/well จะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะให้ค่า stimulating index ที่ต่ำสุดเท่ากับ 5 เท่า และสูงสุดเท่ากับ 19.4 เท่า ขณะที่ความเข้มข้น 9.6 µg/well ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์จะลดต่ำลงโดยมีค่า stimulating index ที่ต่ำกว่า 4 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 2 ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงเลือกใช้โปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี ในระดับความเข้มข้น 0.8 µg/well เป็น suboptimal dose และความเข้มข้น 1.6 และ 2.4 µg/well เป็น optimal dose

ตารางที่ 3 การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง

Conccentration of *P. marneffei* protein antigens (µg/well)	**Stimulating Index**				
	[1]Secreted 100 %	**[2]Secreted 70 %**	**[3]Sonicated**	**Mean**	**SD**
0.2	3.8	4.6	5.8	4.73	1.01
0.4	5.4	7.8	10.2	7.80	2.40
0.8	7.5	5.3	5.0	5.93	1.37
1.6	11.6	17.7	7.5	12.27	5.13
2.4	19.4	7.4	6.1	10.97	7.33
4.8	8.0	11.2	7.8	9.00	1.91
9.6	3.5	2.9	3.1	3.17	0.31
Mean	8.43	8.09	6.51		
SD	5.58	5.00	2.25		

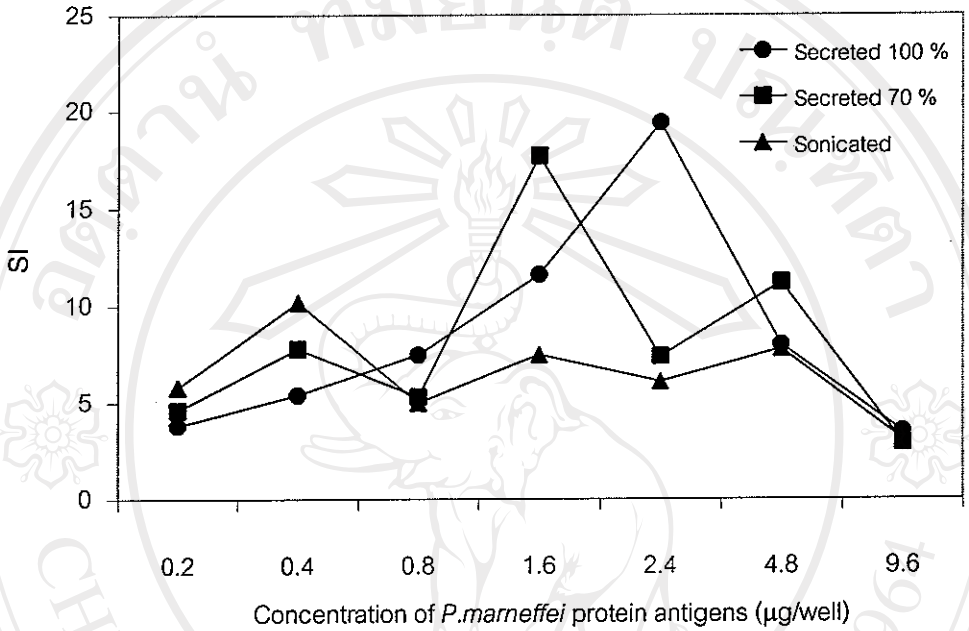
[1]Secreted 100 % = Secreted form protein precipitation with 100 % ammonium salfate

[2]Secreted 70 % = Secreted form protein precipitation with 70 % ammonium salfate

[3]Sonicated = Sonicated form protein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กราฟที่ 2 การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตลอดการทดลอง



การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA-P, PPD และ BCG

จากการทดลองกระตุ้นPBMCs ของคนปกติด้วย PHA-P ที่มีความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 µg/ml จำนวน 16 ราย PPD ที่มีความเข้มข้น 0.75 µg/ml จำนวน 4 ราย และ BCG ที่มีความเข้มข้น 0.75 µg/ml จำนวน 12 ราย พบว่า PHA-P สามารถกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติแบ่งตัวได้เป็นจำนวนมากโดยที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml จะให้ค่า stimulating index อยู่ในช่วงตั้งแต่ 7.5 ถึง 73.1 เท่า (Mean ± SD = 28.81 ± 19.83) และที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml จะให้ค่า stimulating index อยู่ในช่วงตั้งแต่ 6.8 ถึง 148.1 เท่า (Mean ± SD = 31.18 ± 36.05) ดังแสดงในตารางที่ 4 รูปที่ 3 สำหรับการกระตุ้นด้วย PPD จะพบว่า PBMCs จำนวน 3 ใน 4 ราย (75%) ตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยให้ค่า stimulating index ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า (Mean ± SD = 8.43 ± 6.51) ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อกระตุ้น ด้วย BCG โดยค่า stimulating index จะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.8 เท่า (Mean ± SD = 1.57 ± 0.84) ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 3

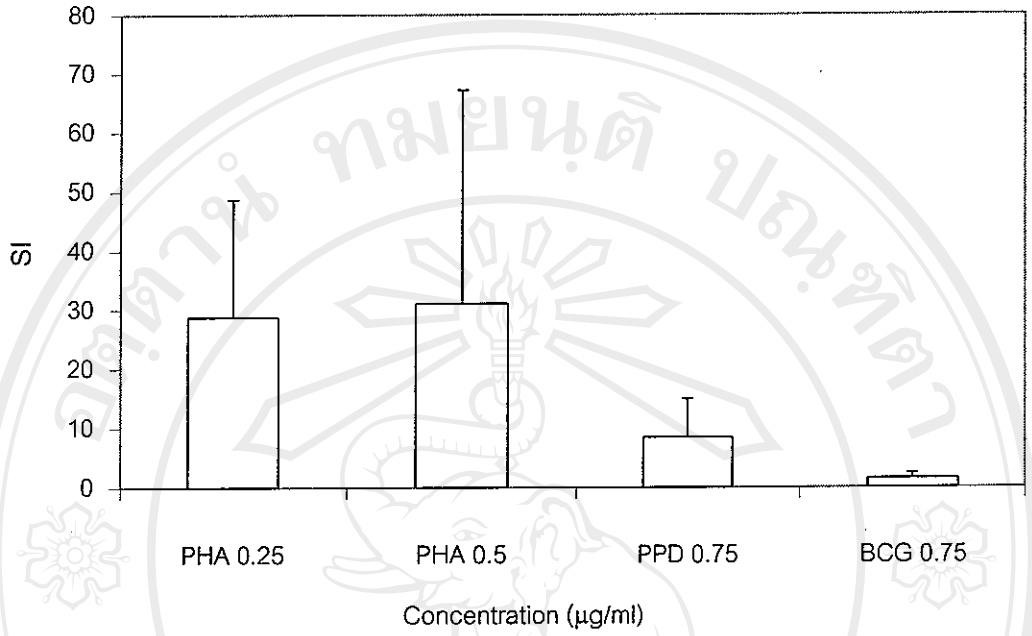
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA-P, PPD และ BCG

No. of test	Stimulating Index			
	PHA – P (μg/ml)		PPD (μg/ml)	BCG (μg/ml)
	0.25	0.5	0.75	0.75
1	19.6	13	11	ND
2	12.2	8.9	2.3	ND
3	73.1	148.1	4	ND
4	45.5	47	16.4	ND
5	45.9	45.6	ND	1.8
6	55.1	55.7	ND	2.5
7	37.1	19.5	ND	2
8	13.9	8	ND	0.5
9	10.2	6.8	ND	0.5
10	17.9	7.7	ND	1.8
11	23.4	7.7	ND	0.5
12	40.7	28	ND	2.8
13	7.5	15.8	ND	1.6
14	8.7	12.9	ND	1.9
15	40.9	58.5	ND	2.3
16	9.3	15.7	ND	0.6
Mean	28.81	31.18	8.43	1.57
SD	19.83	36.05	6.51	0.84

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กราฟที่ 3 การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA-P, PPD และ BCG



การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*

เมื่อนำ PBMCs คนปกติมากระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้จากการตกตะก่อนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อและการแตกเซลล์เชื้อ และกำหนดให้ค่า stimulating index ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า เป็นค่าที่ถือว่ามีการตอบสนองต่อการกระตุ้น จะพบว่า PBMCs ของคนปกติจำนวน 10 ใน 16 ราย (62.50 %) ; 3 ใน 6 ราย (50.00%) ; 1 ใน 10 ราย (10.00%) และ 1 ใน 16 ราย (6.25%) มีตอบสนองการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเซลล์เชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 391H, F947, LN124 และ 673H ตามลำดับ นอกจากนี้ 5 ใน 16 ราย (31.25%) และ 2 ใน 16 ราย (12.50%) มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นภายหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 673H ด้วย 100% และ 70% ammonium salfate ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจะไม่พบการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ LN124 ด้วย 100% ammonium salfate ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 4

ผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้สอดคล้องกับการจากการทดลองที่ผ่านมาคือพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเซลล์เชื้อราสายพันธุ์ 391H สามารถกระตุ้นให้ PBMCs คนปกติส่วนใหญ่ให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น และจากการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้นำโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเซลล์เชื้อราสายพันธุ์ 391H ไปทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปแยกเป็น fractions ด้วย Sephadex G-100 gel filtration Column chromatography ซึ่งจะได้กราฟของโปรตีนจำนวน 2 peaks และเมื่อนำโปรตีนแอนติเจนในแต่ละ peak ไปกระตุ้น PBMCs พบว่าความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนแอนติเจนที่ยังไม่ถูกทำให้บริสุทธิ์ จากผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 673H ด้วย 100% ammonium sulfate มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้โดยวิธีอื่น (เมื่อเปรียบเทียบในเชื้อราสายพันธุ์ชนิดเดียวกัน) ดังนั้นจึงได้นำโปรตีนแอนติเจนชนิดนี้มาแยกเป็น fractions เพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ Sephadex G-100 gel filtration Column chromatography พร้อมทั้งนำกลับไปทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ยังไม่ผ่านการแยกเป็น fractions ซึ่งผลการทดลองพบว่า ภายหลังจากที่ได้นำโปรตีนแอนติเจนดังกล่าวไปผ่าน Sephadex G-100 gel filtration Column chromatography จะได้กราฟของโปรตีนเพียง 1 peak ดังแสดงในรูปที่ 5 และเมื่อนำโปรตีนที่ยอดของกราฟ (หลอดที่ 40-47) ไปกระตุ้น PBMCs ของคนปกติจำนวน 7 ราย พบว่า 5 รายที่ตอบสนองการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนก่อนแยก fractions มีเพียง 1 รายเท่านั้นที่ให้ค่า stimulating index มากกว่า 4 เท่า (4.8 และ 15.1 เท่าที่ความเข้มข้นของ fraction protein เท่ากับ 1.6 และ 2.4 µg/well ตามลำดับ) ขณะที่ PBMCs อีก 2 รายที่ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนก่อนแยก fractions ยังคงไม่เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย fraction protein ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

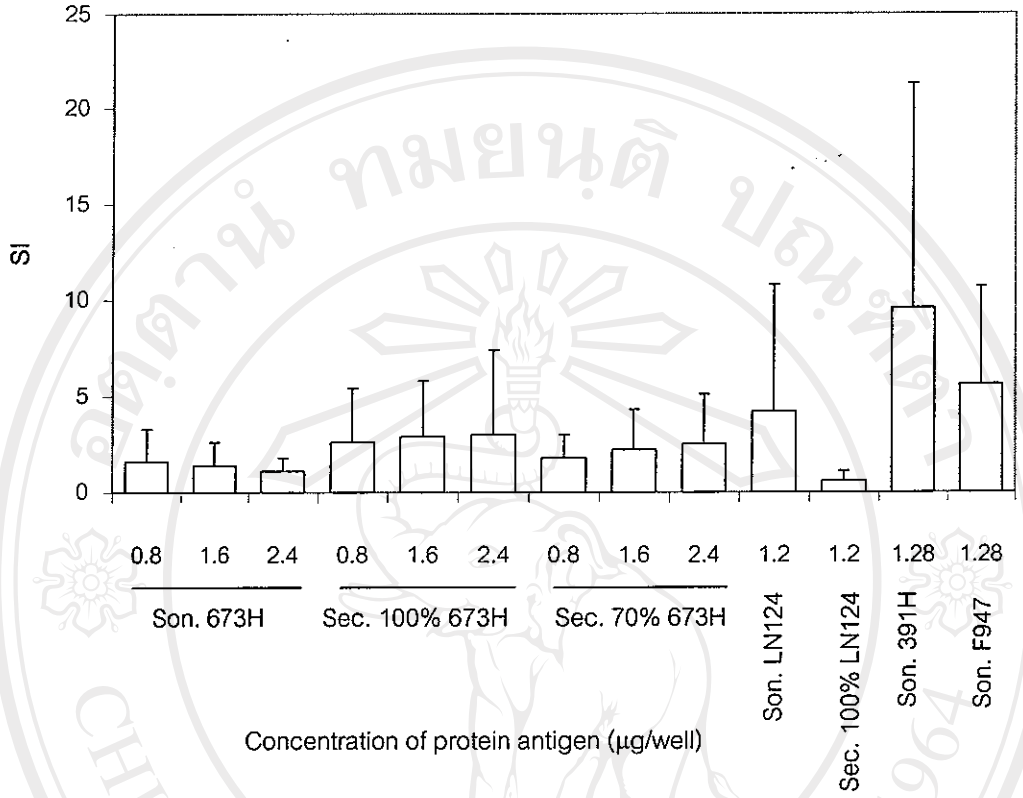
ตารางที่ 5 การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*

No. of test	Stimulating Index												
	Son. 673H (μg/well)			Sec. 100% 673H (μg/well)			Sec. 70% 673H (μg/well)			Son. LN124 (μg/well)	Sec. 100% LN124 (μg/well)	Son. 391H (μg/well)	Son. F947 (μg/well)
	0.8	1.6	2.4	0.8	1.6	2.4	0.8	1.6	2.4	1.2	1.2	1.28	1.28
1	1.4	1.2	0.7	0.9	3.6	0.7	1.7	0.9	0.6	ND	ND	**14**	**5.1**
2	1.7	1.6	2.5	**4.4**	**4**	**5.1**	3.5	3.8	**5.6**	ND	ND	**7.3**	3.1
3	1.3	1.5	1.3	**4.5**	3.5	1.4	3.8	1.6	1.2	ND	ND	**14.3**	**5**
4	3.1	3	2.7	3.7	**5.8**	**5.6**	2	3.2	3.6	ND	ND	**19.2**	**15.7**
5	1.3	0.8	0.6	1	1.5	0.7	1.4	1	0.9	ND	ND	**8.9**	1.8
6	1.1	1.3	0.9	1	1	0.9	1.2	1.4	0.8	ND	ND	3.1	2.7
7	1.5	1.6	1.5	2.1	1.3	1.1	2.4	1.8	2	1.7	0.9	**5.6**	ND
8	0.8	0.3	0.5	1.3	0.9	1.6	1.1	0.9	1.8	3.2	0.2	2.3	ND
9	0.7	1	0.5	1.8	2.9	3	2.2	3.4	2.3	1.1	0.5	**13.1**	ND
10	0.6	0.7	0.7	0.9	1.1	1.5	0.8	2	3.1	2.5	0.8	**6.5**	ND
11	0.6	0.5	0.3	0.4	0.2	0.4	0.4	0.3	0.5	3.6	0.3	0.6	ND
12	0.8	0.6	0.7	**11**	**6.2**	**5**	0.7	1.4	2.6	1.8	0.2	**6.6**	ND
13	1.8	1.2	1.3	1	1.1	1	1.6	1.3	2.6	0.9	0.9	1.6	ND
14	0.7	1.3	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	0.8	0.5	1.7	ND
15	**7.6**	**5.1**	1.5	**5.5**	**11.5**	**18.2**	**4.4**	**9.2**	**10.9**	**22.6**	1.7	**48.2**	ND
16	0.9	0.3	0.5	0.6	0.9	1.1	0.9	1.4	0.8	3.4	0.3	1.2	ND
$\bar{X}$	1.6	1.4	1.1	2.6	2.9	3.0	1.8	2.2	2.5	4.2	0.6	9.6	5.6
SD	1.7	1.2	0.7	2.8	2.9	4.4	1.2	2.1	2.6	6.6	0.5	11.7	5.1

ตัวเลขหนา = มีการตอบสนองต่อการกระตุ้น (ค่า SI ≥ 4 เท่า)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กราฟที่ 4 การตอบสนองของ PBMCs ปกติที่กระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei*



ตารางที่ 6 การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่กระตุ้นด้วย fraction protein antigen ของเชื้อรา *P. marneffei*

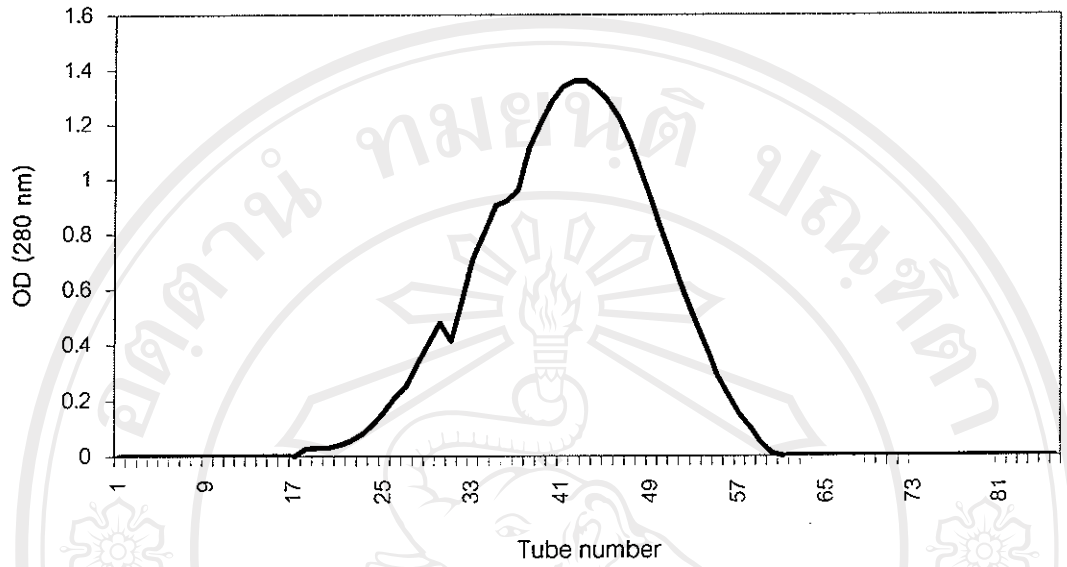
No. of test	Stimulating Index		
	Concentration of fraction protein (µg/well)		
	0.8	1.6	2.4
1*	1.2	1	1
2*	1.3	1.3	1.6
3*	0.7	0.5	0.5
4*	0.9	1	2
5*	1.2	4.8	15.1
6+	1.9	1.9	2.1
7+	2.1	2.9	3.5
Mean	1.33	1.91	3.69
SD	0.51	1.49	5.12

* = ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนก่อนแยก fraction

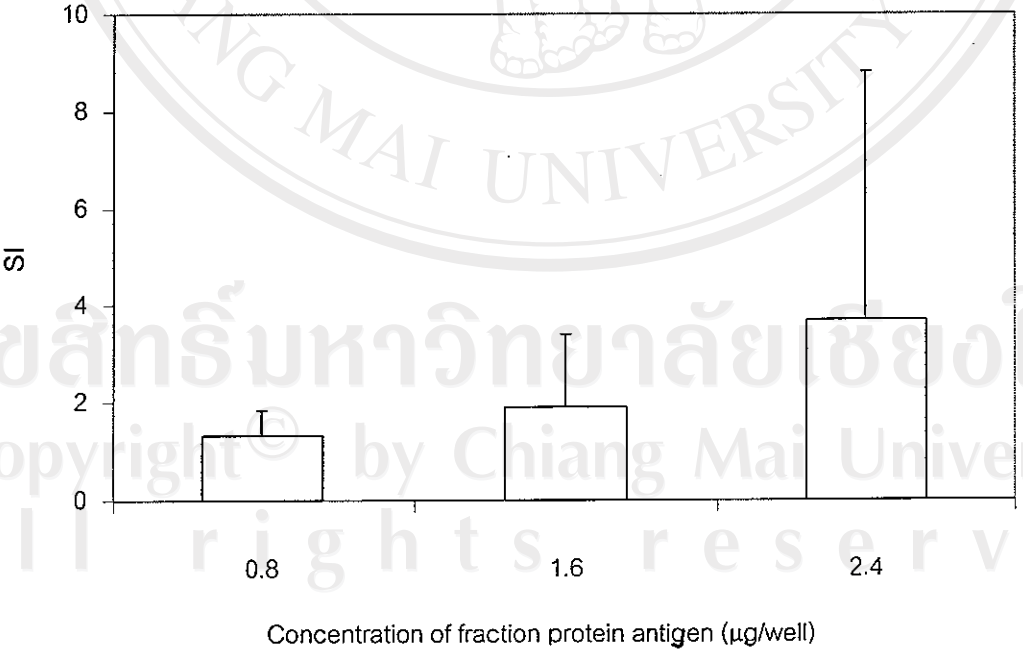
\+ = ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนก่อนแยก fraction

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กราฟที่ 5 การแยก fraction protein antigen ของเชื้อรา *P. marneffei*



กราฟที่ 6 การตอบสนองของ PBMCs ของคนปกติที่กระตุ้นด้วย fraction protein antigen ของเชื้อรา *P. marneffei*



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในคนปกติบางรายเคยสัมผัสกับเชื้อรา *P. marneffei* มาก่อน และมีระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้อยู่ภายในร่างกาย ดังนั้นเมื่อนำ PBMCs ของคนปกติเหล่านี้มากระตุ้นด้วย โปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* จึงเกิดการตอบสนองโดยมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการเซลล์ของโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี และจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีไม่เท่ากัน โดยจะเห็นว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H ที่ตกตะกอนด้วย 100% ammonium sulfate สามารถกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติแบ่งตัวได้มากกว่าโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 70% ammonium sulfate และโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อ ขณะที่โปรตีนแอนติเจนซึ่งได้จากการแตกเชื้อและการใช้ 100%ammonium sulfate ตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ LN 124 ไม่สามารถกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติเกิดการแบ่งเซลล์ได้ ขณะเดียวกันโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อราสายพันธุ์ 391H และ F947 สามารถกระตุ้นให้ PBMCs แบ่งเซลล์ได้ในระดับสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ โดยพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อราสายพันธุ์ 391H สามารถกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติเกิดการแบ่งเซลล์ได้ในระดับที่สูง และความสามารถในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนชนิดนี้จะลดลงหรือหายไปใน PBMCs ของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยเอดส์ทั้งที่ปีนและไม่เป็น penicilliosis marneffei[41] การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 673H ด้วย 100% ammonium sulfate มีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ได้จาการแตกเชื้อราสายพันธุ์ 391H โดยพบว่าทุกราย (31.25%) ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนจากน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 673H จะมีการตอบสนองต่อแอนติเจนจากการแตกเชื้อราสายพันธุ์ 391H อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์มีความสอดคล้องกันน้อยมากโดยมีเพียงส่วนน้อย (6.25%) ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อสายพันธุ์ 673H ซึ่งลักษณะการตอบสนองที่ไม่สอดคล้องกันนี้อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์สร้างโปรตีนแอนติเจนที่มีคุณสมบัติที่ไม่เหมือนกัน จากการศึกษาของ Vanittanakon และคณะพบว่าเมื่อตัด DNA ของเชื้อรา *Penicillium marneffei* จำนวนสองสายพันธุ์ [ทั้งที่แยกได้จากผู้ป่วย Penicilliosis maneffei Bamboo rats (R. sumatrensis; C. badius) และจากดินบริเวณรูของตัวอ้น] ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ(Hae III) และนำไปทำ gel electrophoresis จะสามารถแยก DNA ของเชื้อราชนิดนี้ได้เป็น 2 types[43] ดังนั้นในการทดลองครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นี้จึงเป็นไปได้ที่เชื้อราสายพันธุ์ 673H และ 391H จะมี DNA ที่ต่าง type กัน ในการทดลองครั้งนี้ได้นำโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 100% ammonium sulfate มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยนำไปผ่าน sephadex G-100 column chromatography เพื่อแยกโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 4,000 – 150,000 และมากกว่า 150,000 ดาลตันออกจากกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากการศึกษาของ Vanittanakon และคณะซึ่งได้ทำการตกตะกอนโปรตีนน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* ด้วย 70% ammonium sulfate และได้นำโปรตีนแอนติเจนดังกล่าวไปตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ในซีรั่มคนปกติและผู้ป่วยเอดส์ทั้งที่ติดและไม่ติดเชื้อ *P. marneffei* โดยวิธี western immunoblot พบว่าในซีรั่มของคนปกติและผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่เป็น penicilliosis marneffei ส่วนใหญ่ มีแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับโปรตีนแอนติเจนที่มีขนาด 200,000 ดาลตันและทำปฏิกิริยาแบบอ่อนๆ ต่อโปรตีนแอนติเจนที่มีขนาด 88, 54 และ 50 กิโลดาลตัน ขณะที่ผู้ป่วย penicilliosis marneffei จะมีแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับโปรตีนแอนติเจนเหล่านี้[32] เหตุผลที่ได้เลือกนำเอาโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 673H ด้วย 100% ammonium sulfate มาทำให้บริสุทธิ์เพราะโปรตีนชนิดนี้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้โดยวิธีอื่นเมื่อเปรียบเทียบในเชื้อราสายพันธุ์ชนิดเดียวกัน ซึ่งผลการนำโปรตีนไปผ่าน Sephadex G-100 gel filtration column chromatography จะได้กราฟของโปรตีนเพียง 1 peak ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการผ่านซีรั่มคนปกติเข้าไปใน Sephadex G-100 gel filtration column chromatography (เกิดกราฟจำนวน 2 peaks) จะพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่แยกมีมวลโมเลกุลมากกว่า 150,000 ดาลตัน และเมื่อนำไปกระตุ้น PBMCs ของคนปกติ พบว่าความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ยังไม่ถูกทำให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้โดยพบว่าเมื่อนำโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการแตกเชื้อราสายพันธุ์ 391H ไปผ่าน Sephadex G-100 gel filtration column chromatography จะได้กราฟจำนวน 2 peaks กราฟแรกจะเป็นโปรตีนแอนติเจนที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 150,000 ดาลตัน และกราฟที่สองเป็นโปรตีนแอนติเจนที่มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 4,000 - 150,000 ดาลตัน และเมื่อนำไปกระตุ้น PBMCs ของคนปกติพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่มีขนาดมวลโมเลกุลมากกว่า150,000 ดาลตัน สามารถการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าโปรตีนแอนติเจนที่มีขนาด 4,000 - 150,000 ดาลตัน อย่างไรก็ตามสามารถการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ยังไม่มากเท่ากับการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนที่ยังไม่ถูกทำให้บริสุทธิ์[41] จากผลที่ได้แสดงให้เห็นระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จดจำกับเชื้อ *P. marneffei* ที่มีอยู่ภายในร่างกายคนปกติทั่วเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่จดจำต่อแอนติเจนหลายๆ ขนาดของเชื้อ ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สอดคล้องกับความเป็นจริงที่เกิดขึ้นจากการได้รับเชื้อของร่างกายตามธรรมชาติโดยการหายใจเอาสปอร์หรือเซลล์เชื้อเข้าไปสู่ร่างกายซึ่งสปอร์หรือเซลล์เชื้อจะประกอบไปด้วยโปรตีนหลายๆ ขนาด

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถที่จะนำโปรตีนแอนติเจนที่ได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H หรือที่ได้จากการแตกเซลล์เชื้อสายพันธุ์ 391H มาช่วยบ่งชี้ว่าในกลุ่มประชากรคนปกติทั่วไปอาจเคยได้รับหรือสัมผัสกับเชื้อ *Penicillium marneffei* มาก่อนและมีระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้อยู่ภายในร่างกาย นอกจากนี้จะเห็นว่าโปรตีนแอนติเจนทั้งสองชนิดยังสามารถกระตุ้น PBMCs ให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่า PPD และ BCG ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนแอนติเจนดังกล่าวไปใช้แทน PPD และ BGC ในการทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์พร้อมทั้งใช้ตรวจเพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อ *P. marneffei* ทั้งในคนปกติและในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

การศึกษาในโอกาสต่อไปจะทำการตรวจวัด ชนิด ปริมาณ และ mRNA ของ cytokines ที่สร้างขึ้นโดย PBMCs ทั้งของคนปกติและผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ภายหลังจากถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* พร้อมทั้งศึกษาถึงคุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้ในการเป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อราชนิดนี้ในสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงกลไกของร่างกายในการป้องกันการติดเชื้อ *P. marneffei* ตลอดจนหาแนวในผลิตวัคซีนเพื่อการป้องกันการติดเชื้อราชนิดนี้ทั้งในกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทสรุป

โปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่เตรียมได้จากเชื้อในแต่ละสายพันธุ์และเตรียมได้จากวิธีที่ต่างกันจะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีไม่เท่ากันโดย โปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H ด้วย 100% amonium sulfate จะกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติเกิดการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 70% amonium sulfate หรือเตรียมจากการแตกเซลล์เชื้อ ขณะที่โปรตีนแอนติเจนของเชื้อสายพันธุ์ LN124 ทั้งที่เตรียมได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย 100% amonium sulfate และการแตกเซลล์เชื้อ พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้น้อยมาก นอกจากนี้โปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการแตกเชื้อราสายพันธุ์ 391H และ F947 สามารถกระตุ้นให้ PBMCs ของคนปกติส่วนใหญ่เกิดการแบ่งเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์จะเกิดขึ้นได้มากเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนหลายขนาดร่วมกัน โดยจะเห็นได้จากความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. marneffei* สายพันธุ์ 673H ด้วย 100% amonium sulfate จะลดลงเมื่อโปรตีนชนิดนี้ถูกทำให้บริสุทธุ์มากขึ้น ดังนั้นจึงมีทางเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนแอนติเจนของเชื้อรา *P. marneffei* ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์มาช่วยบ่งชี้ว่าในกลุ่มประชากรคนปกติทั่วไปอาจเคยได้รับหรือสัมผัสกับเชื้อ *P. marneffei* มาก่อนและมีระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ที่จดจำกับแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้อยู่ภายในร่างกาย นอกจากนี้อาจนำไปใช้แทน PPD และ BGC ในการทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์พร้อมทั้งใช้ตรวจเพื่อเฝ้าระวังการติดเชื้อ *P. marneffei* ทั้งในคนปกติและในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Caponi M, Surean P, Segretian G. Penicilliose de *Rhizomys sinensis*. Bull Soc Pathol Exot 1956; 49: 418-21.
2. Segretian G. *Penicillium marneffei* n. sp., agent d' une mycose du systeme recticuloendotelial. Mycophatol Mycol Appl 1959; 11: 327-53.
3. Disalvo AF, Fickling AM, Ajello L. Infection caused by Penicllium marneffei: description of first natural infection in man. Am J Clin Pathol 1973; 60: 259-63.
4. Pautler KB, Padhy AA, Ajello L. Improt penicilliosis marneffei in the United States; report of a second human infection. Sabouraudia. J Med Vet Mycol 1984; 29: 433-8.
5. Jayanetra P, Nitiyanant P, Ajello L, Padhye AA, Lolekha S, Atichartakarn V, *et al.* Penicilliosis marneffei in Thailand: report of five case. Am J Trop Med Hyg 1984; 33: 637-44.
6. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthummachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992; 14: 871-4.
7. Deng ZL, Cornnor DH. Progessive disseminated penicilliosis caused by *penicillium marneffei*: report of eight case and differentiation of the causative organism from *Histoplasma capsulatum.* Am J Clin Pathol 1985; 84: 323-7.
8. Deng ZL, Ribas JL, Gibson DW, Cornnor DH. Infection caused by *Penicillium marneffei* in China and Souteast Asia: review of eighteen published cases and report of four more Chinese case. Rev Infect Dis 1988; 10: 640-52.
9. So SY, Chau PY, Jones BM, Wu PC, Pun KK, Lam WK, *et al.* A case of invasive penicilliosis in Hongkong with immunologic evalution. AM Rev Respire Dis 1985; 131: 622-5.
10. Piehl MR, Kaplan RL, Harber MH. Disseminated penicilliosis in a patient with aquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med 1988; 122: 1262-4.
11. Hulshof CMJ, Van Zanten RAA, Sluiters JF, van der Ende ME, Samson RS, Zonderuan PE, *et al. Penicilliosis marneffei* infection in AIDS patients (letter). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9: 370.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. Jones PD, Sec J. *Penicillium marneffei* in patients infected with human immunodeficiency virus: late presentation in an are of nonendermicity (Correspondence). Clin Infect Dis 1992; 15: 744.

13. Hilmarsdottir I, Meynard JL, Rogeaux O, Guermonprez G, Datry A, Katlama C, *et al.* Disseminated *Penicilliosis marneffei* infection associated with human immunodeficiency virus: a report of two case and a review of 35 published case. J Acquir Immune Defic Syndr 1993; 6: 466-71.

14. Viviani MA, Tororano AM, Rizzardini G, Quirino T, Kaufman L, Padhye AA, *et al.* Treatment and serological studies on an Italian case of penicilliosis marneffei contracted in Thailand by drug addict infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Epidemiol 1993; 9: 79-85.

15. Sathapatayavongs B, Damrongkitchaiporn S, Saengditha P, Kiatboonsri S, Janyanetra P. Disseminated penicilliosis associated with HIV infection. J Infect 1989; 19: 84-5.

16. Vithayasai P, Vithayasai V. HIV infection in clinical practice Bangkok: Support The Children Foundation , 1992: 1-7.

17. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in Southeast Asia. Lancet 1994; 334: 110-3.

18. Sirisanthana V, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection in children infected with human immunodeficiency virus. Pediatr Infect Dis J 1993; 12: 1021-5.

19. Chariyalertsak S, Vanittanakom P, Nelson KE, Sirisanthana T, Vanitthanakom N. *Rhizomys sumatrensis* and *Cannomys badius*, new natural animal host of *Penicillium marneffei*. J Med Vet Mycol 1996; 34: 105-10.

20. Phillips P. *Penicillium marneffei* part of Southeast Asian AIDS. JAMA 1996; 276: 86-7.

21. Drouhet E. Penicilliosis due to *Penicillium marneffei*: a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia. J Mycol Med 1993; 4: 195-224.

22. Deng ZL, Yun M, Ajello L. Human penicilliosis marneffei and its relation to the bamboo rat (Rhizomys pruinosus). J Med Vet Mycol 1986; 24: 383-9.

23. Ajello L, Padhye AA, Sukroongreung S, Nilakul CH, Tantimavanic S. Occurrence of *Penicillium marneffei* infections among wild bamboo rats in Thailand. Mycopathol 1995; 131: 1-8.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24. Vittayasai P, vittayasai V. Atlas of HIV infection. Bangkok: Support The Children Foundation , 1994 : 9-40.

25. Chiewchanvit S, Mahanupab P, Hirsunsri P, Vittanakom N. Cutaneous maifestations of *Penicillium marneffei* mycosis in five HIV – infection patients. Mycoses 1991; 34: 245-9.

26. Vithayasai P, Vithayasai V. Clinical nanifestations of 174 AIDS cases in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. J Dermatol 1993: 20: 389-93.

27. Sekhon AS, Padhye AA, Garg AK. *In vitro* susceptibility of mycelial and yeast forms of *Penicillium marneffei* to amphotericin B (AmB), fluconazole (FLU), 5-flurocytosine (5-FC) and itraconozole (ITZ). In: Fungal dimorphism. 4th Symposium on topics in Mycology September 1-4, 1992: University of Cambridge UK Organized by H. Vanden Bossche, F. Odds, D. Kerridge, Abtrct. p41 , p248.

28. Supparatpinyo K, Nelson KE, Merz WG, Breslin BJ, Cooper CR Jr, Kamwan C, *et al.* Response to antifungal therapy by human immunodeficiency virus – infected patients with disseminated *Penicillium marneffei* infections and *in vitro* susceptibilities of isolated from clinical specimans. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2407-11.

29. Estrada JA, Stynen D, Van Cutsem J, Pierard Franchimont C, Pierard GE. Immunohistochemical identification of *Penicillium marneffei* by monoclonal antibody. Intern J Dermatol 1992; 31: 410-2.

30. Van Custem J, Meulemans L, Van Gerven F, Stynen D. Detection of circulating galactomannan by Pastorex Aspergillus in experimantation invasive aspergillosis. Mycoses 1990; 33: 61-9.

31. Yeun K, Wong SS, Tsang DN, Chan P. Serodiagnosis of *Penicillium marneffei* infection. Lancet 1994; 344: 444-5.

32. Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sittisombut N, Supparatpinyo K, Kanjanasthiti P, Nelson KE, *et al.* Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicilliu marneffei.* J Med Vet Mycol 1997; 35: 123-31.

33. Cao L, Chen DL, Lee C, Chan CM, Chan KM, Vanittanakom N, *et al.* Detection of specific antibodies to an antigenic mannoprotein for diagnosis of *Penicillium marneffei* penicilliosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 3028-31.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

34. Cao L, Chan KM, Chen D, Vanittanakom N, Lee C, Chan CM, *et al.* Detection of cell wall mannoprotein Mp1p in culture supernatants of *Penicillium marneffei* and sera of penicilliosis patients. J Clin Microbiol 1999; 37: 981-6.

35. Trewatcharegon S, Chaiyaroj SC, Chongtrakool P, Sirisinha S. Production and charaterization of monoclonal antibodies reactive with the mycelial and yeast phases of *Penicillium marneffei.* Med Mycol 2000; 38: 91-6.

36. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 2 th ed. London: Gower Medical Publishing, 1989.

37. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3 th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997.

38. Kudeken N, Kawakami K, Kusano N, Saito A. Cell-mediated immunity in host resistance against infection caused by *Penicilluim marneffei* .J Med Vet Mycol 1996; 34: 371-8.

39. Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Different susceptibilities of yeasts and conidia of *Penicillium marneffei* to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activyty of murine macrophage. Clin Exp Immunol 1998; 112: 287-93.

40. Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Machanism of the *in vitro* fungicidal effects of human neutrophils against *Penicillium marneffei* induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Clin Exp Immunol 2000; 119: 472-8.

41. Pornprasert S. Cell mediated immune respone to *Penicillium marneffei* antigen and mitogen in AIDS patients. [Thesis]-Chiang Mai: Chiang Mai University, 1997.

42. Mekaprateep M. Immunoblot analysis of extracellular proteins secreted from mold and yeast forms of *Penicillium merneffei.* [Thesis]-Chiang Mai: Chiang Mai University, 1995.

43. Vinttanakom N, Cooper CR, Chariyalertsak S, Youngchim S, Nelson KE, Sirisanthana T. Restriction endonuclease analysis of *Penicillium* marneffei. J Clin Microbiol 1996; 34: 1834-6.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมน้ำยา

1. Ficoll – Hypaque solution

A. 9% Ficoll solution

Ficoll powder	90.0	gm
Distilled water	1,000.0	ml

ผสมให้เข้ากันและเขย่าสารละลายบน Hot plate จนกระทั่งละลายเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

B. 34% Hypaque solution

Hypaque (50%)	30	ส่วน
Distilled water	14	ส่วน

ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่ 4 °C

C. Ficoll-Hypaque solution

9% Ficoll	24	ส่วน
34% Hypaque	10	ส่วน

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอนและเก็บไว้ที่ 4 °C

2. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.2

NaCl	7.65	gm
Na_2HPO_4	1.16	gm
$NaH_2PO_4\ 2H_2O$	0.315	gm
Distilled water	1,000.0	ml

ผสมให้เข้ากันและปรับ pH 7.2 ± 0.05 โดยใช้ 0.1 HCl หรือ 0.1 N NaOH ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที และเก็บไว้ที่ 4 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. RPMI – 1640 tissue culture medium

PRMI – 1640 powder	10.4	gm
$NaHCO_3$	2.4	gm
Distilled water	1,000.0	ml
Gentamicin 40 mg%	1.0	ml
12.5 mmol HEPES	1.798	gm

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 7.2 – 7.4 ด้วย 1 N HCl และกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บไว้ที่ 4 °C

4. การเตรียม tritiated – thymidine (8 μCi/ml)

^3H – thymidine (Stock 5Ci/mmol; Amersham, batch 424)	40	μl
RPMI – 1640	5	ml

ผสมให้เข้ากันและควรเตรียมใช้ครั้งต่อครั้ง หรือเก็บไว้ที่ 4 °C

5. Completed RPMI – 1640

RPMI – 1640	45	ml
Fetal calf serum	5	ml

ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ที่ 4°C

6. Brain heart infusion (BHI) agar

BHI (dehydratted)	37.0	gm
Bacto agar	15.0	gm
Distilled water	1,000.0	ml

ต้มให้ละลาย แล้วแยกใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นนำออกไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยเอียงหลอดทดลองไว้ประมาณ 45 องศา เพื่อให้ผิว agar เป็นแนวลาดเอียง เมื่อแข็งตัวจึงนำไปเก็บที่ 4 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. BHI broth

BHI	36.0	gm
Distilled water	1,000.0	ml

ต้มให้ละลาย แล้วแบ่งใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ประมาณ 100 ml นึ่งที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเก็บไว้ที่ 4 °C

8. 0.85% NaCl solution

NaCl	85.0	gm
Distilled water	100.0	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 0.04% $CuSO_4$ $5H_2O$

$CuSO_4$ $5H_2O$	0.2	gm
Distilled water	500.0	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. 0.08% Na-K Tartrate

Na-K Tartrate	0.16	gm
Distilled water	200.0	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

11. 8.0% Na_2CO_3

Na_2CO_3	8.0	gm
Distilled water	100.0	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. 0.4 N NaOH

NaOH	1.6	gm
Distilled water	100.0	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

13. Working solution for protein determination by Lowry's method

1. Reagent A

   ใช้อัตราส่วนระหว่าง 8.0% Na_2CO_3 ต่อ 0.4 N NaOH เท่ากับ 1:1

2. Reagent B

   ใช้อัตราส่วนระหว่าง 0.04% $CuSO_4$ $5H_2O$ ต่อ 0.08% Na-K Tartrate เท่ากับ 1:1

3. Working solution

   ใช้อัตราส่วนระหว่าง Reagent A ต่อ Reagent B เท่ากับ 1:1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติการศึกษาและประสบการณ์

ชื่อ-สกุล	นายสาคร พรประเสริฐ
การศึกษา	พ.ศ. 2540 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	พ.ศ. 2537 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์การทำงาน	สิงหาคม พ.ศ. 2540 – กันยายน พ.ศ. 2541 นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	ตุลาคม พ.ศ. 2541 – พฤศจิกายน พ.ศ. 2541 นักเทคนิคการแพทย์ สำนักงานควบคุมโรคติดต่อ เขต 10 จังหวัดเชียงใหม่
	ธันวาคม 2541–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานทางวิชาการ

1. Vithayasai V, Apichartpiyakul C, **Pronprasert S**, Vithayasai P. Cell mediated immune response to *Penicillium marneffei* antigen and mitogen in AIDS patients. The 20th Meddical Technology Conference. The Association of Medical Techologists of Thailand. 1996 (abstract); 96-7.
2. สาคร พรประเสริฐ กิตติพงศ์ รุ่งเรืองธนะกิจ ดวงนภา กิ่งแก้ว ฉายสุรีย์ สุภวิไล. การเตรียม internal control สำหรับการตรวจหา anti-HIV Antibody. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2542; 32: 20-4.
3. ลดาวัลย์ สาริยา รสสุคนธ์ กลิ่นหอม ธารินี ไชยวงศ์ สาคร พรประเสริฐ. การทดสอบหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อราเพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ ของกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543; 33: 172-81.
4. ธิดาดาว แหล่งอุโมงค์ สาคร พรประเสริฐ. การกดการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์คนปกติโดยพลาสมาของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อเพนนิซิเลียม มาเนฟฟีไอ. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2543; 33: 182-9.
5. พ.ศ. 2542 เขียนตำราเรื่อง "มะเร็งเม็ดเลือดขาว"

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อ-สกุล	นายมงคล โชตยาภรณ์
การศึกษา	พ.ศ. 2539 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
	พ.ศ. 2535 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์การทำงาน	พ.ศ. 2539 – ปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานทางวิชาการ

1. มงคล โชตยาภรณ์, ณัฐจีรา อินต๊ะใส, ประสิทธิ์ ชนะรัตน์. การเตรียมตะกอนปัสสาวะเพื่อใช้เป็นวัสดุการเรียนการสอน. การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 25. สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย. 2544 (บทคัดย่อ); 40.
2. ณัฐจีรา อินต๊ะใส, มงคล โชตยาภรณ์, ประสิทธิ์ ชนะรัตน์. ผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองต่อกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาว. การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 25. สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย. 2544 (บทคัดย่อ); 41.
3. พ.ศ. 2541 เขียนตำราเรื่อง "คู่มือปฏิบัติการเรื่อง Urinalysis"
4. พ.ศ. 2541 เขียนหนังสือเสริมปฏิบัติการเรื่อง "Blood cell morphology"
5. พ.ศ. 2542 เขียนตำราเรื่อง "สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือด"

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อ-สกุล	นายรณชัย ปรารถนาผล
การศึกษา	พ.ศ. 2539 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2533 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์การทำงาน	พ.ศ. 2539 – กุมภาพันธุ์ 2544 อาจารย์ประจำภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ กุมภาพันธ์ 2544–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานทางวิชาการ

1. **Pratanaphon R**, Akesowan S, Khow O, Sriprapat S, Ratanabanangkoon K. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (Naja kaothia). Vaccine 1997; 15: 1523-8.
2. **Pratanaphon R**, Tayapiwattana C, Songkrawtum N. Study on the relative affinity of monoclonal antibodies against beta hCG using thiocyanate elution. The 17th Annual Health Sciences Meeting. Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University. 1999. (abstract); 68.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส.ร. 016.079
ส 217 ป
เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ชื่อ-สกุล	นายขจรศักดิ์ ตระกูลพัว
การศึกษา	พ.ศ. 2539 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	พ.ศ. 2534 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์การทำงาน	พ.ศ. 2539 – ปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานทางวิชาการ

1. Nishikawa Y, **Tragoolpua K**, Nagasawa H. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. J Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2001. (submitted)
2. Thirach S, **Tragoolpua K**, Khamwan C, Jatisatienr C, Punjaisee S. Antifungal activity of some medical plant extracts against *Candida albicans* and *Ccryptococcus neoforman*. World Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Budapest, Hungary, 8-11 July, 2001. (abstract, submitted)
3. Mungkornasawakul P, **Tragoolpua K**, Jatisatienr C, Supyen D, Jatisatienr A. Antifungal properties of *Eugenai caryophyllus* (Spreng.) Bullock & Harrison and *Acorus calamus* Linn. Extracts. Congress of Thai medicinal plant development. Nation Research Council of Thailand. 13-14 September 2000 at Marauy Garden, Bangkok.
4. Phromnoi C, **Tragoolpua K**, Nimsung R. Purification and evaluation of bilirubin oxidase isolated from *Myrothecium verrucaria*. First National Symposium on GRAD-RESEAARCH Chiang Mai University, 10-11 June 2000 at UNISERV, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, Abstract HS-18 (p.97).
5. Mongkolputtaruksa K, **Tragoolpua K**, Nimsung R. Method for preparation of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*. 24th Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October 1998 at Queen Sirikit National Center, Bangkok, Thailand, Abstract part C (c-17)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. **Tragoolpua K**, Yoonim N. A comparison between polymerase chain reaction and standard cytologic stains in detecing *Pneumocystis carinii*. Proceeding of the Asai-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998 at Hua Hin, Prachuapkhirikhan, Thailand, p. 182-185. (poster presentation)
7. Jatisatienr C, **Tragoolpua K**. Effect of the extract from eight species of medicinnal plans on growth of selected plant pathogenic mold and dermatophytes. Proceeding International Symposium; Breeding Research on Medicin and Aromatic Plants, June 30-July 4, 1996, Quedlingurg, Germany. P. 414-7. (abstract)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved