



**3836845 SCMI/D : MAJOR : MICROBIOLOGY; Ph.D. (MICROBIOLOGY)**

**KEY WORDS : *PENICILLIUM MARNEFFEI*/MONOCLONAL  
ANTIBODY/ PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS**

**MAJ. SOMPONG TREWATCHAREGON: PRODUCTION OF  
MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *PENICILLIUM MARNEFFEI* ANTIGENS  
AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *PENICILLIUM MARNEFFEI*  
INFECTION IN THAILAND. THESIS ADVISORS: STITAYA SIRISINHA, Ph.D.;  
SANSANEE C. CHAIYAROJ, Ph.D.; CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D.; ANGKANA  
CHAIPRASERT, Dr.rer.nat. 167 p. ISBN 974-664-591-9**

Penicilliosis marneffeii, a disease caused by dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*, is currently the third most prevalent opportunistic infection in AIDS patients in northern Thailand. Incorrect diagnosis and delayed treatment contribute to its relatively high mortality rate. Clinical manifestations of penicilliosis marneffeii closely resemble tuberculosis, histoplasmosis, cryptococcosis and other systemic fungal infections, therefore, specific and reliable diagnosis methods are needed.

Four MAbs specific for *P. marneffeii*, 3C2, 8C3, 8B11 and 3B9, were produced from hybridomas raised from BALB/c mice immunized with crude culture filtrate (CCF) prepared from mycelial phase of growth. The hybridomas were screened and characterized using different fungal antigens by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting and immunofluorescent staining. In the immunoblots, MAb 3C2 (IgG1 subclass) reacted specifically with a denatured form of 38-kDa antigen whereas MAbs 8B11 and 3B9 (IgM subclass) reacted most strongly with high molecular weight components (>200 kDa) produced during either mycelial or yeast phase of growth. The immunoreactive epitopes for these MAbs were most likely associated with carbohydrate moieties, judging from their susceptibility to periodate treatment and concanavalin A binding. This is in contrast to the immunoreactive epitopes for MAbs 8C3 (IgM subclass) and 3C2 which were resistant to periodate treatment. In immunofluorescent staining, the three IgM MAbs could react strongly with both mycelial and yeast phase of *P. marneffeii*, but not with the yeast phase of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* whose morphology are closely similar to *P. marneffeii*. Thus, these MAbs showed diagnostic potential. They could be used to identify *P. marneffeii* in culture and biopsy specimens by immunofluorescent staining.

For genomic epidemiology study of 67 *P. marneffeii* isolates using PFGE, 2 macrorestriction patterns (MPs) and 9 MP subgroups were generated by *Not I* digestion of 67 *P. marneffeii* isolates. Of the 64 human isolates, 42 isolates (65.6%) were of MPI and belonged to subgroups MPIa (8 isolates), MPIb (11 isolates), MPIc (10 isolates), MPId (3 isolates), MPIe (5 isolates) and MPIf (3 isolates). Whereas 22 isolates (34.4%) were of MPIO and belonged to subgroups MPIOa (6 isolates), MPIOb (4 isolates) and MPIOc (7 isolates). Two bamboo rat isolates belonged to subgroup MPIa and one isolate was of subgroup MPIc. No significant correlation between the MP of *P. marneffeii* isolates and geographical region nor specimen sources was observed. Notably, isolates obtained before 1995 were of MPI and we have seen increased incidence of infection with MPIO isolates since then. However, further studies are necessary to confirm this finding.

3836845 SCMI/D: สาขาวิชา: จุลชีววิทยา; ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

พ.ด. สมพงศ์ ศรีวัชรกร: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อเพนิซิลเลียม มาร์เนฟฟีไอ และระบาดวิทยาาระดับโมเลกุลของเชื้อเพนิซิลเลียม มาร์เนฟฟีไอ ในประเทศไทย (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *PENICILLIUM MARNEFFEI* ANTIGENS AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *PENICILLIUM MARNEFFEI* INFECTION IN THAILAND) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สถิตย์ สิริสิงห (Ph.D.), ศันสนีย์ ไชยโรจน์ (Ph.D.), ชื่นจิตต์ บุญเจิด (Ph.D.), อังคณา ฉายประเสริฐ (Dr.rer.nat), 167 หน้า. ISBN 974-664-591-9

โรคเพนิซิลลิโอซิส มาร์เนฟฟีไอ เป็นโรคหายากที่พบมากเป็นอันดับที่ 3 ในผู้ป่วยโรคเอดส์ ทางตอนเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อราสองรูป *Penicillium marneffeii* การให้การวินิจฉัยโรคที่ไม่ถูกต้องและการรักษาที่ล่าช้าทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในอัตราที่สูง เนื่องจากลักษณะอาการแสดงของโรคเพนิซิลลิโอซิส มาร์เนฟฟีไอ คล้ายคลึงกับผู้ป่วยวัณโรค histoplasmosis, cryptococcosis รวมทั้งโรคติดเชื้อราทั้งระบบอื่นๆ ทำให้มีความต้องการวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความจำเพาะและเชื่อถือได้ ดังนั้น monoclonal antibody (MAb) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. marneffeii* คือ 3C2, 8C3, 8B11 และ 3B9 จึงได้ถูกผลิตขึ้นจากเซลล์ลูกผสมที่ได้จากหนู BALB/c ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน "crude culture filtrate" ที่เตรียมจากเชื้อในรูปปราสาย จากนั้นทำการตรวจกรองและตรวจสอบเซลล์ลูกผสมที่ได้โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อราอื่นๆ โดยวิธี ELISA, immunoblotting และ immunofluorescent staining จากการตรวจสอบ MAbs ที่ได้ด้วยวิธี immunoblotting พบว่า 3C2 ซึ่งเป็น IgG, subclass ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ denatured form ของ 38-kDa แอนติเจน ในขณะที่ 8B11 และ 3B9 ซึ่งเป็น IgM subclass ทำปฏิกิริยากับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (มากกว่า 200 kDa) ที่ถูกผลิตจากเชื้อทั้งในรูปปราสายและสำได้ ดี และพบว่า immunoreactive epitopes ของ 8B11 และ 3B9 น่าจะเป็นส่วนของ carbohydrate โดยพิจารณาจากการที่บริเวณดังกล่าวถูกย่อยได้ด้วย Concanavalin A และไวต่อการทำ ปฏิกิริยากับ periodate ซึ่งตรงข้ามกับ immunoreactive epitopes ของ 8C3 ซึ่งเป็น IgM subclass และ 3C2 ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อทำปฏิกิริยากับ periodate เมื่อตรวจสอบ MAbs ด้วยวิธี immunofluorescent staining พบว่า MAbs ชนิด IgM ทั้ง 3 ตัว ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *P. marneffeii* ทั้งในรูปปราสายและสำได้ดี แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Histoplasma capsulatum* ในรูปสำและเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. marneffeii* มาก ดังนั้น MAbs เหล่านี้จึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้พัฒนาวิธีทดสอบเพื่อใช้วินิจฉัยโรคเพนิซิลลิโอซิส มาร์เนฟฟีไอ ดังเช่นการตรวจหาเชื้อ *P. marneffeii* ใน culture และ tissue biopsy specimens โดยวิธี immunofluorescent staining

สำหรับการศึกษาระบาดวิทยาจากพันธุกรรมของเชื้อ *P. marneffeii* จำนวน 67 สายพันธุ์ โดยการ ใช้เทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถจำแนกเชื้อที่ตรวจสอบออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (macrorestriction pattern, MP) และ 9 กลุ่มย่อย (MP subclass) หลังจากการย่อยสารพันธุกรรมของเชื้อด้วย เอนไซม์ *NotI* จากจำนวนเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 64 สายพันธุ์ พบว่า 42 สายพันธุ์ (65.6%) อยู่ในกลุ่ม MPI แบ่งออกเป็น MPIa 8 สายพันธุ์, MPIb 11 สายพันธุ์, MPIc 10 สายพันธุ์, MPId 3 สายพันธุ์, MPIe 5 สายพันธุ์ และ MPIf 3 สายพันธุ์ ในขณะที่ 22 สายพันธุ์ (34.4%) อยู่ในกลุ่ม MPII แบ่งออกเป็น MPIIa 6 สายพันธุ์, MPIIb 4 สายพันธุ์ และ MPIIc 7 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อที่แยกได้จากตัวอ่อนนั้น 2 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่มย่อย MPIa และอีก 1 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่มย่อย MPIc ผลการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุกรรมของเชื้อที่ถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ โดยวิธี PFGE กับภูมิภาคหรือชนิดของตัวอย่างจากผู้ป่วย แต่มีข้อสังเกตคือพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้ก่อนปี พ.ศ. 2538 จะเป็น MPI ทั้งหมด ส่วนสายพันธุ์ในกลุ่ม MPII ค่อยๆ พบเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากเวลานั้น เป็นต้นมา อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลทางระบาดวิทยาจากพันธุกรรมของเชื้อที่จะนำไปใช้นี้จะต้องมีการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อเพิ่มเติมต่อไป