Thesis Title Immunoblot Analysis of Extracellular Proteins Secreted from Mold- and Yeast-forms of *Penicillium marneffei*

Author Ms. Malee Mekaprateep

M.Sc. Microbiology

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom	Chairman
Dr. Nopporn Sittisombut	Member
Assoc. Prof. Dr. Parimondh Khanjanasthiti	Member
Assoc. Prof. Dr. Thira Sirisanthana	Member

ABSTRACT

Penicilliosis, caused by *Penicillium marneffei,* is a systemic mycosis involving the entire reticuloendothelial system. It is an important emerging mycosis among AIDS patients and considered as an AIDS defining illness in the endemic areas especially Southeast Asia and China. In northern Thailand, this mycosis is the third most common infection in AIDS patients after tuberculosis and cryptococcosis. Because of mostly unspecified symptoms and a high mortality rate of *P.marneffei*-infected AIDS patients, the early and definite laboratory diagnosis is important to adjudicate the infection. Presumptive diagnosis could be made by microscopic examination of Wright's stained smears. The definite diagnosis is based on isolation of the fungus, the mold-to-yeast conversion and histologic examination. Serodiagnosis, however, needs to be established to provide the rapid diagnosis and supplement the conventional means. The immunodiffusion test (exoantigen test) and indirect immunofluorescent antibody test were developed to detect antibody in patients' sera, however, the suitable antigens of *P.marneffei* still should be studied. In the present study, the crude extracellular proteins of *P.marneffei* secreted during growth of yeast- and mold-forms were analyzed by SDS-PAGE and immunoblot assays. During growth of the yeast-form, large quantity of immunogenic proteins were secreted. Profiles of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

secreted yeast proteins stained with coomassie brilliant blue demonstrated over 20 components and at least 10 IgG binding components ranging in molecular mass from 200 to 39 kDa were identified with pooled sera from 28 AIDS patients infected with *P. marneffei*. Of these proteins, four different patterns were observed : 1) no band was recognized at lag phase ; 2) at exponential phase, the two proteins of 88 and 50 kDa appeared ; 3) at deceleration and early stationary phase, the four strong reactive proteins of 200, 88, 54 and 50 kDa were presented (both of high molecular mass gradually decreased ,whereas, both of low molecular mass increased in their intensities) ; 4) at late stationary phase, only two proteins of 54 and 50 kDa were intensely observed. The pooled yeast proteins secreted during deceleration and early stationary phase of growth were selected to react with individual sera derived from 32 AIDS patients with penicilliosis marneffei, 39 non-*P.marneffei* infected AIDS-and non AIDS-patients, 18 microbiology laboratory personnels and 84 healthy blood donors. One patient with other disease was finally included in the *P.marneffei* infected AIDS group. No strong reactivity to the four major proteins (200, 88, 54 and 50 kDa) were found in all healthy subjects, either in laboratory personnels or blood donors, however, the 200 and 88 kDa proteins were reacted weakly in high percentages. The IgG antibodies in 31 out of 33 sera of AIDS patients with penicilliosis marneffei recognized one or more of the four major proteins. About half of them had strong reactivities to the 88, 54 and 50 kDa proteins, whereas, only a few of non-*P.marneffei* infected patients strongly recognized these proteins. In a remarkable case, the 88, 54 and 50 kDa proteins were strongly detected by serum derived from an AIDS patient who had pulmonary tuberculosis with fever and generalized lymphadenopathy and was diagnosed as penicilliosis marneffei from the culture about 2 months later. Thus, at least two proteins of 54 and 50 kDa secreted from the yeast-form of *P.marneffei* are highly immunogenic and specific in AIDS patients with penicilliosis marneffei. Profiles of yeast-form proteins from coomassie staining or from immunoblots were similar in 5 human and 2 natural isolates of *P.marneffei*, but the variation in intensity of some proteins were observed. Proteins secreted from mold-form were of lower yield and gave weaker signal in immunoblot assays. Further studies of the purification and characterization of these antigens are needed to improve the immunodiagnosis and study the immunology of this disease.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์โปรตีนที่ปล่อยสู่ภายนอกของเชื้อรา เพนนิซิเลียม มาเนฟฟิไอ ในรูปราสายและรูปส่าด้วยวิธีอิมมูโนบล็อท

ผู้เขียน นางสาวมาลี เมฆาประทีป

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม	ประธานกรรมการ
นพ. นพพร สิทธิสมบัติ	กรรมการ
รศ.ดร. ปริมณฑ์ กาญจนัษฐิติ	กรรมการ
รศ.นพ. ธีระ ศิริสันธนะ	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อรา *Penicillium marneffei* กำลังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างมากในผู้ป่วยโรคเอดส์ทางภาคเหนือของประเทศไทย และยังนับว่าโรคนี้เป็นโรคหนึ่งที่ช่วยบ่งชี้ภาวะการเป็นโรคเอดส์ของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อรา *P.marneffei* มักมีอาการไม่เฉพาะเจาะจงทำให้การวินิจฉัยโรคทำได้ยากและจะสามารถวินิจฉัยโรคนี้ได้ต่อเมื่อผู้ป่วยอยู่ในระยะแพร่กระจายของโรค ผู้ป่วยโรคติดเชื้อรานี้มีอัตราการตายสูงถ้าไม่ได้รับการรักษาทันท่วงที การชันสูตรโรคที่ถูกต้องจึงจำเป็นต้องอาศัยผลจากห้องปฏิบัติการ วิธีที่ใช้กันอยู่ในขณะนี้คือการเพาะแยกเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจ การยืนยันชนิดของเชื้อราด้วยการทำให้เชื้อเปลี่ยนจากรูปราสาย (mold-form) เป็นรูปส่า (yeast-form) และ การใช้เทคนิคการย้อมชิ้นเนื้อจากรอยโรค ซึ่งล้วนเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลา อย่างไรก็ตามอาจจะวินิจฉัยเบื้องต้นอย่างคร่าวๆได้ด้วยการย้อมดูตัวเชื้อในสิ่งส่งตรวจที่แตะบนสไลด์โดยตรงด้วย Wright's stain ปัจจุบันแม้จะมีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเทคนิค immunodiffusion และ indirect immunofluorescent antibody เพื่อใช้ทดสอบตรวจหาแอนติบอดีย์ในซีรั่มผู้ป่วยทำให้สามารถชันสูตรโรคนี้ได้อย่างรวดเร็วขึ้นและใช้ประกอบการวินิจฉัยร่วมกับวิธีอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาและวิเคราะห์ถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชนิดของโปรตีนและอิมมูโนเจนของเชื้อราชนิดนี้เลย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้เตรียมโปรตีนที่เชื้อรา *P.marneffei* ทั้งในรูปราสายและรูปส่าสร้างและปล่อยสู่ภายนอกในระหว่างที่เชื้อกำลังเจริญเติบโต แล้วจำแนกและวิเคราะห์โปรตีนนั้น ด้วย SDS-PAGE และ immunoblot assay พบว่า ในระหว่างการเจริญเติบโต เชื้อรา *P.marneffei* รูปส่าสร้างและปล่อยโปรตีนสู่ภายนอกในปริมาณมาก เมื่อแยกโปรตีนเหล่านั้นบน acrylamide gel แล้วย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue พบว่า มีโปรตีนมากกว่า 20 แถบ ในจำนวนนี้มีโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติบอดีย์ชนิด IgG ในซีรั่มรวมของผู้ป่วยเอดส์ 28 รายที่ติดเชื้อ *P.marneffei* ได้ อย่างน้อย 10 ชนิด ซึ่งมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 39 ถึง 200 kDa ในระยะต่างๆที่เชื้อกำลังเจริญเติบโต พบว่าเชื้อมีการสร้างโปรตีนเหล่านี้แยกตามชนิดและจำนวนได้เป็น 4 รูปแบบ คือ 1) ในระยะที่เชื้อพักตัว (lag phase) ไม่พบโปรตีนชนิดใดเลย 2) ในระยะที่เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างมาก (exponential phase) พบโปรตีน 2 ชนิด ที่พบในปริมาณมากซึ่งมีขนาดโมเลกุล 88 และ 50 kDa 3) ในระยะที่อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อลดลงและเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (deceleration and early stationary phase) พบโปรตีน 4 ชนิด ที่มีปริมาณมากกว่าชนิดอื่นๆซึ่งมีขนาดโมเลกุล 200, 88, 54 และ 50 kDa โดยที่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 200 และ 88 kDa มีปริมาณค่อยๆลดลงตามระยะเวลา ในขณะที่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 54 และ 50 kDa มีปริมาณเพิ่มขึ้น 4) ในระยะคงที่ช่วงท้าย (late stationary phase) ยังคงมีเพียงโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 54 และ 50 kDa เท่านั้น ที่พบในปริมาณมาก เมื่อเลือกใช้โปรตีนรวมของเชื้อรูปส่า ที่ปล่อยออกมาในระยะ deceleration and early stationary มาทำปฏิกริยาโดยวิธี immunoblot กับซีรั่มผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P.marneffei* จำนวน 32 ราย ผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยทั่วไป จำนวน 39 ราย เจ้าหน้าที่และนักศึกษาภาควิชาจุลชีววิทยาจำนวน 18 ราย และผู้บริจาคโลหิตจำนวน 84 ราย มีผู้ป่วยเอดส์ทั่วไปรายหนึ่งในภายหลังพบว่าติดเชื้อ *P.marneffei* และได้รวมเข้าอยู่ในกลุ่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อรานี้รวมเป็น 33 ราย ในการศึกษานี้พบว่าแอนติบอดีย์ชนิด IgGในซีรั่มผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P.marneffei* จำนวนถึง31รายจาก 33 ราย สามารถทำปฏิกริยากับโปรตีนอย่างน้อย 1 ชนิดในจำนวน 4 ชนิดที่พบในปริมาณมาก (200, 88, 54 และ 50 kDa)และในจำนวน 31 รายนี้ มีผู้ป่วยประมาณครึ่งหนึ่งที่ตรวจพบแอนติบอดีย์ในปริมาณสูงต่อโปรตีนที่มีขนาด 88, 54 และ 50 kDa แต่ตรวจพบเพียงไม่กี่รายในผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยทั่วไปที่เป็นโรคอื่นๆ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ป่วยเอดส์รายหนึ่ง ซึ่งเป็นวัณโรคปอด ที่มีไข้และมีต่อมน้ำเหลืองโตทั่วร่างกาย (fever and generalized lymphadenopathy) สามารถตรวจพบแอนติบอดีย์ ซึ่งทำปฏิกริยากับโปรตีนที่มีขนาด 88, 54 และ 50 kDa ได้ดีมาก ซึ่งต่อมาภายหลังจากนั้น 2 เดือน ผู้ป่วยรายนี้ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคติดเชื้อ *P.marneffei* จากการเพาะเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจ ในซีรั่มคนปกตินั้นแม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะตรวจพบแอนติบอดีย์ต่อโปรตีนของเชื้อรูปส่าได้ แต่ไม่ชัดเจนนัก (weak reaction) โดยพบว่าซีรั่มคนปกติจำนวนมากมีแอนติบอดีย์ต่อโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 200 and 88 kDa แต่พบเพียงไม่กี่รายที่ตรวจพบแอนติบอดีย์ที่มีขนาด 54 และ 50 kDa ดังนั้นจึงอาจจะพอสรุปได้ว่า มีโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิดซึ่งมีขนาดโมเลกุล 54 และ 50 kDa ที่เชื้อรา *P.marneffei* ในรูปส่าสร้างและปล่อยออกมาในขณะที่กำลังเจริญเติบโต มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนที่ค่อนข้างจำเพาะในผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P.marneffei* นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบโปรตีนแอนติเจนที่เชื้อรารูปส่าสร้างและปล่อยออกมา ในระยะ deceleration and early stationary จากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P.marneffei* จำนวน 5 สายพันธุ์ และแยกได้จากธรรมชาติ (อ้นและดินจากรูอ้น) อีกจำนวน 2 สายพันธุ์ พบว่ามีแบบแผนชนิดของโปรตีนและอิมมูโนเจนคล้ายกันแต่ยังคงมีความเข้มของแถบโปรตีนบางชนิดต่างกัน ส่วนโปรตีนของเชื้อในรูปราสาย ที่ถูกสร้างและปล่อยออกมาในระหว่างการเจริญเติบโตนั้นมีปริมาณน้อย รวมทั้งตรวจพบแอนติบอดีย์ในซีรั่มรวมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P.marneffei* ที่ทำปฏิกริยากับโปรตีนเหล่านี้ได้น้อยด้วยเช่นกัน ในการศึกษาต่อเนื่อง จึงน่าจะทำการแยกและทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ที่เชื้อรารูปส่าสร้างและปล่อยออกมา เพื่อใช้ประโยชน์ทางการชันสูตรโรคทางอิมมูโนวิทยาและทางการศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาของโรค penicilliosis marneffei ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved