

รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ P-13-50156

ชื่อโครงการ

(ไทย) การพัฒนาชุดวินิจฉัยโรคพิษไอซีสในคนและในสัตว์ด้วยวิธีภูมิโครมาโตกราฟี

(อังกฤษ) Multi-Host Specific Immunochromatographic Test for Diagnosis of Human and Animal Pythiosis

หัวหน้าโครงการ ดร. อลิสา (เดือนเพ็ญ) แสนดี

สังกัด ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนกำแพงเพชร 6
แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

ทุนวิจัย สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.), สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

1.2. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาชุดวินิจฉัยโรคพิษไอซิสในคนและในสัตว์ด้วยวิธีภูมิโครมาโตกราฟี” (Multi-Host Specific Immunochromatographic Test for Diagnosis of Human and Animal Pythiosis) สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานผู้มอบทุนสนับสนุนการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการให้เป็นไปอย่างราบรื่น ได้แก่ สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) โดยผ่านทางสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.), สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)

สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ โรงพยาบาลรามารักษ์

ขอขอบคุณ ผู้ร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน ทั้งจาก ห้องปฏิบัติการภูมิโครมาโตกราฟี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามารักษ์ ที่ทุ่มเทแรงกายในการลงมือปฏิบัติงาน การระดมความคิด ร่วมกันหาแนวทางแก้ปัญหา วิเคราะห์ผลการทดลองและวิจัย ตลอดทั้งโครงการอย่างมุ่งมั่น เต็มกำลังความสามารถ

ขอขอบคุณ คณะผู้วิจัยนำโดย Janio M. Santurio จาก Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, ประเทศบราซิล และ คณะผู้วิจัยนำโดย Amy M. Grooters จาก Department of Veterinary Clinical Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ความร่วมมือกันทำงานวิจัยในส่วนของการทดลองและวิเคราะห์ผลชุดทดสอบกับตัวอย่างของสัตว์ต่างๆ ทำให้ผลงานวิจัยมีความสมบูรณ์ ครบถ้วน

ซึ่งจากผลการวิจัยดังกล่าวคณะผู้วิจัยได้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติและได้ยื่นจดสิทธิบัตรตามรายละเอียดเอกสารแนบท้าย

ท้ายสุด ผู้ร่วมโครงการวิจัยทุกคน หวังว่า ชุดวินิจฉัยโรคพิษไอซิสในคนและในสัตว์ด้วยวิธีภูมิโครมาโตกราฟี ที่พัฒนาได้ จะเป็นประโยชน์ในด้านสาธารณสุขสำหรับคนและสัตว์ที่เป็นโรคพิษไอซิส ทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก

.....
ดร. อลิสา (เดือนเพ็ญ) แสนดี

หัวหน้าโครงการวิจัย

สังกัด ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา

สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

1.3. บทคัดย่อ

โรค pythiosis เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์ *Pythium insidiosum* การเกิดโรคพบในคนและสัตว์ มีรายงานการติดเชื้อทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งภูมิประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตสภาพอากาศร้อน กึ่งร้อน และอบอุ่น พบการติดเชื้อกระจายอยู่ทั่วโลกทั้งทวีปเอเชีย, อเมริกา, แอฟริกา ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ซึ่งพบรายงานการติดเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การติดเชื้อนำมาซึ่งสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง เกิดการสูญเสียอวัยวะ พิการ และเสียชีวิตในอัตราสูง ปัจจุบันยังไม่มียาจำเพาะที่ใช้รักษาโรคอย่างได้ผล การรักษา มักต้องอาศัยการผ่าตัดร่วมด้วย การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง รวดเร็ว และใช้งานง่าย จึงมีความจำเป็นในการตรวจพบการติดเชื้อตั้งแต่เบื้องต้น ส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพและช่วยลดความเจ็บปวด ลดการสูญเสียอวัยวะและชีวิตได้ งานวิจัยชิ้นนี้ได้พัฒนาชุดตรวจที่อาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี (ICT) ที่ใช้วินิจฉัยโรค pythiosis ทั้งในคนและในสัตว์ โดยการใช้ bacterial protein A/G เป็นสารชีวโมเลกุลในการตรวจหา anti-*P. insidiosum* IgGs ในตัวอย่างซีรัมจากคนและในสัตว์ (serodiagnosis) และเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจ ICT กับวิธี ELISA ในการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมที่เป็นโรค pythiosis 85 ราย จากคน 28 ราย, จากสัตว์ ได้แก่ สุนัข 24 ราย, ม้า 12 ราย, กระต่าย 12 ราย และ วัว 9 ราย, ตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค pythiosis จากคน 80 ราย และจากสัตว์ 63 ราย ซึ่งเป็นตัวอย่างคนและสัตว์ที่สุขภาพแข็งแรง หรือเป็นโรคธาลัสซีเมีย หรือเป็นโรคติดเชื้อชนิดอื่นๆ พบว่า ทั้งวิธี ELISA และ ICT มีความจำเพาะในการทดสอบ 100% ในขณะที่ค่าความไวในการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ ICT มีค่า 98.8% และ 90.6% ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบปลอมด้วย ICT เมื่อทดสอบด้วย ELISA จะแสดงค่าบวกอย่างอ่อน งานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจ ICT ที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้งานง่าย และรวดเร็วเพื่อใช้ตรวจโรค pythiosis ในคนและสัตว์ โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธี ELISA

Keywords: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, Immunochromatography, Serodiagnosis

Abstract

Pythiosis is a life-threatening infectious disease of both humans and animals living in Asia, Americas, Africa, and parts of Australia and New Zealand. The etiologic pathogen is the fungus-like organism *Pythium insidiosum*. The disease has high mortality and morbidity rates. Use of antifungal drugs are ineffective against *P. insidiosum*, leaving radical surgery the main treatment option. Prompt treatment leads to better prognosis of affected individuals, and could be achieved by early and accurate diagnosis. Since pythiosis has been increasingly reported worldwide, there is a need for a rapid, userfriendly, and efficient test that facilitates the diagnosis of the disease. This study aims to develop an immunochromatographic test (ICT), using the bacterial protein A/G, to detect anti-*P. insidiosum* IgGs in humans and animals, and compare its diagnostic performance with the established ELISA. Eighty-five serum samples from 28 patients, 24 dogs, 12 horses, 12 rabbits, and 9 cattle with pythiosis, and 143 serum samples from 80 human and 63 animal subjects in a healthy condition, with thalassemia, or with other fungal infections, were recruited for assay evaluation. Detection specificities of ELISA and ICT were 100.0%. While the detection sensitivity of ELISA was 98.8%, that of ICT was 90.6%. Most pythiosis sera, that were falsely read negative by ICT, were weakly positive by ELISA. In conclusion, a protein A/G-based ICT is a rapid, user-friendly, and efficient assay for serodiagnosis of pythiosis in humans and animals. Compared to ELISA, ICT has an equivalent detection specificity and a slightly lower detection sensitivity.

Keywords: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, Immunochromatography, Serodiagnosis.

1.4. สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า:
2.1. บทนำ (Introduction)	1
2.1.1. หลักการและเหตุผล	1
2.1.2 การทบทวนวรรณกรรม	3
2.1.2.1. โรค pythiosis: สาเหตุการติดต่อ พยาธิสภาพ และการรักษา	3
2.1.2.2. การวินิจฉัย	5
2.1.3. สถานการณ์ของโรค pythiosis ในประเทศไทย	7
2.2 เนื้อเรื่อง	8
2.2.1. การเตรียมแอนติเจน	8
2.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	8
2.2.3. การเตรียม ICT	8
2.2.4 รูปแบบของ ICT	9
2.2.5. การศึกษาการตรึง antigen (Ag) และ antibody (Ab)	10
ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NCmb)	
2.2.6. การเตรียมสารให้สัญญาณ protein-gold conjugation	10
2.2.7. เตรียมส่วนประกอบของชุดตรวจ ICT	11
2.2.7.1 การเตรียม Sample pad	11
2.2.7.2. การเตรียม Conjugate releasing pad	11
2.2.8. การประกอบชุดตรวจสอบ	11
2.2.9. ตัวอย่างเลือดที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของ ICT	12
2.2.10. การทดสอบชุดตรวจ ICT กับตัวอย่าง	12
2.2.11. ผลการทดลอง	13
2.3. ข้อวิจารณ์ (Discussion)	15
2.4. สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	16
2.5. เอกสารอ้างอิง	17

1.5. สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ผลการทดสอบโดยใช้ multi-host specific ICT และ ELISA
สำหรับตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis ในคนที่ทดสอบจากประเทศไทย
และ สัตว์ต่างๆที่ทดสอบจากประเทศสหรัฐอเมริกา และ บราซิล

14

1.6. สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การแสดงผลที่ได้จากชุดตรวจ pythiosis	3
รูปที่ 2 ส่วนประกอบของชุดตรวจ ICT และ รูปแบบของชุดตรวจ ที่ใช้หลักการ indirect immune-assay โดยมี protein A/G-gold conjugate เป็นสารให้สัญญาณ	9
รูปที่ 3 การประกอบ immunochromatographic test	11
รูปที่ 4 ผลการใช้ชุดตรวจ multi-host specific ICT สำหรับตรวจโรค pythiosis	13

1.7. คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัยฯ (List of Abbreviations)

Ab	= Antibody
Ag	= Antigen
CFA	= Culture filtrate antigen
ELISA	= Enzyme-linked immunosorbent assay
GF	= Glass fiber
HA	= Hemagglutination test
ICT	= Immunochromatographic test
IgG	= Immunoglobulin G
NCmb	= Nitrocellulose membrane
PAG	= bacterial recombinant protein A/G
PBS	= Phosphate buffer saline
PCR	= Polymerase chain reaction
PS	= Plastic backing supporter
rbIgG	= Rabbit Immunoglobulin G
SP	= Sample pad

2.1 บทนำ (Introduction)

2.1.1. หลักการและเหตุผล

โรค pythiosis เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์ *Pythium insidiosum* การเกิดโรคพบในคนและสัตว์ มีรายงานการติดเชื้อทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งภูมิภาคที่ตั้งอยู่ในเขตสภาพอากาศร้อน กึ่งร้อน และอบอุ่น (tropical, subtropical and temperate regions) (1-3) การติดเชื้อนำมาซึ่งสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง เกิดการสูญเสียอวัยวะ พิการ และเสียชีวิตในอัตราสูง ตำแหน่งของโรคที่พบแยกเป็นประเภทได้แก่ การติดเชื้อที่ผิวหนัง/เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (cutaneous/subcutaneous pythiosis) การติดเชื้อที่ดวงตา (ocular pythiosis) การติดเชื้อที่หลอดเลือดแดง (vascular pythiosis) และการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (disseminated pythiosis) ไปยังอวัยวะต่างๆ ที่พบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ปอด สมอง เป็นต้น (4-9)

โรคไพโรซิซิสในคน (Human pythiosis) เป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (emerging disease) (2, 10) มีรายงานการติดเชื้อในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ออสเตรเลีย บราซิล เฮติ นิวซีแลนด์ มาเลเซีย สหรัฐอเมริกา และ ประเทศไทย เป็นต้น (1, 7) โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์การติดเชื้อสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 80 ของผู้ป่วยที่พบทั้งหมดที่พบทั่วโลก ดังนั้นจึงถือเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อของหลอดเลือดแดงเป็นผู้ป่วยในประเทศไทยทั้งหมด ผู้ป่วยส่วนใหญ่ ปฏิบัติงานหรือประกอบอาชีพเกี่ยวกับเกษตรกรรม ซึ่งถือเป็นอาชีพสำคัญของประเทศไทย (11) แสดงให้เห็นว่า human pythiosis เป็นโรคติดเชื้อประจำถิ่นในประเทศไทย (endemic) ดังนั้นในปัจจุบันโรคนี้จึงถือเป็นปัญหาด้านสุขอนามัยของประเทศไทยและจะเป็นปัญหาแก่ประชากรในภูมิภาคอื่นได้หากไม่มีการควบคุมและเฝ้าระวังโรคที่มีประสิทธิภาพ

การเกิดโรค pythiosis มีรายงานในสัตว์หลายสายพันธุ์ ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ พบการเกิดโรคเช่น ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ตามรายงานส่วนใหญ่เกิดในม้า และสุนัข (1, 12-16) นอกจากนี้ยังมีอุบัติการณ์การเกิดโรคในสัตว์ชนิดต่างๆ เพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด เช่น แมว, วัว, แกะ เป็นต้น (1, 6, 17)

นอกจากการเกิดโรคในคนแล้ว ประเทศไทยเริ่มมีการพบการเกิดโรค pythiosis ในสัตว์แล้วจากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลรามารับดี เป็นไปได้ว่า ม้า สุนัข หรือสัตว์ชนิดอื่นๆ อีกจำนวนมากในประเทศไทยอาจติดเชื้อนี้ด้วยแต่ยังไม่ได้ศึกษาและค้นพบ สาเหตุที่มีการพบการติดเชื้อในสัตว์ของประเทศไทยน้อยมาก อาจจะเนื่องจากบุคลากรทางการแพทย์และสัตวแพทย์ไม่ได้คิดถึงหรือไม่คุ้นเคยหรือไม่มีประสบการณ์ในการวินิจฉัยโรคนี้ และยังไม่มียุทธวิธีตรวจที่ใช้สะดวก ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ ทำให้การตรวจโรคเกิดความผิดพลาด จึงไม่พบการติดเชื้อในสัตว์เหล่านี้ การหาวิธีวินิจฉัยโรคในสัตว์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการควบคุมโรคนี้จึงมีความจำเป็น จากความสำเร็จของคณะผู้วิจัยที่ได้พัฒนาและผลิตชุดตรวจโรค human pythiosis ในรูปแบบ immunochromatographic strip (ICT) ที่ใช้งานง่าย

รวดเร็ว ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ (18) คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรมีการพัฒนาชุดตรวจ ICT ชุดใหม่ชนิด Multi-host specific ที่สามารถตรวจโรค pythiosis ได้ทั้งในคน ม้า สุนัข หรือ สัตว์อื่นๆ จะมีประโยชน์สำหรับประเทศไทยและประเทศอื่นที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคในคนและในสัตว์

การผลิตชุดตรวจโรค pythiosis ที่ใช้งานง่ายและมีประสิทธิภาพสูง ด้วยวิธี immunochromatographic assay โดยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งมีความสะดวกในการใช้งานมากกว่า enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (19-21) ปฏิกิริยาจะเกิดบนแผ่น Nitrocellulose membrane ซึ่งประกอบไปด้วยเส้นแสดงผลที่ถูกเคลือบไว้ อย่างน้อยสองเส้น คือ เส้นควบคุม (control line) เป็นเส้นที่แสดงคุณภาพชุดตรวจชุดนั้น และเส้นทดสอบ (test line) เป็นที่แสดงผลการทดสอบ เส้นนี้จะปรากฏหรือไม่ขึ้นอยู่กับหลักการของชุดตรวจ โดยมีแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารมีสีที่ให้สัญญาณ เช่น Colloidal gold particle

ICT ที่ใช้ตรวจโรค pythiosis ได้มีการวางแผนและออกแบบรูปแบบของชุดตรวจ (แสดงรายละเอียดในรูปที่ 1) โดยมีแผ่น Nitrocellulose membrane ที่มีแอนติบอดีชนิด normal-IgG เป็นแถบควบคุม และแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* เป็นแถบทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อในจากสิ่งส่งตรวจ โดยมีสารให้สัญญาณคือ IgG-binding protein-gold conjugate ได้ออกแบบไว้ คือ

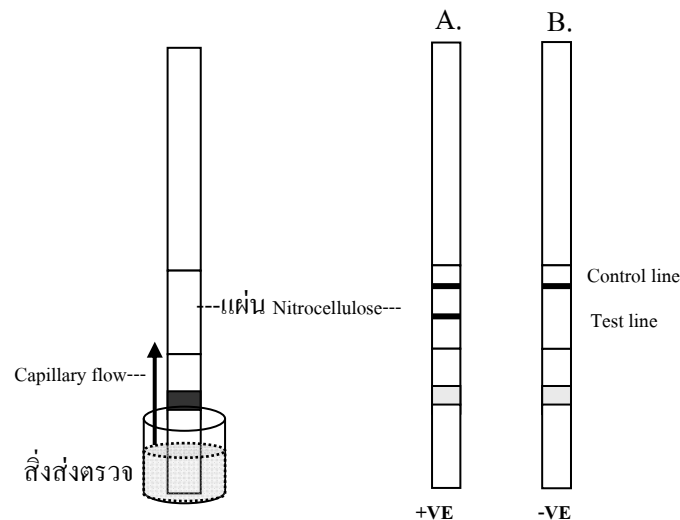
การใช้ IgG-binding protein ที่มีคุณสมบัติหน้าที่เช่นเดียวกับ secondary antibody ได้แก่ การใช้ recombinant protein A/G ที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ fragment crystallizable region (Fc) ของ IgG ของคนและสัตว์หลายชนิด เช่น ม้า สุนัข วัว กระต่าย แมว หนู แกะ เป็นต้น (22, 23) โดยนำมาผลิตสารให้สัญญาณ protein A/G gold conjugate ใช้สำหรับผลิตชุดตรวจโรค ใน คน และ สัตว์ต่างๆ

ด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้ลดปัญหาเรื่อง secondary antibody เพราะ recombinant protein A/G จะทำหน้าที่เสมือน secondary antibody ที่สามารถจับได้กับแอนติบอดีครอบคลุมได้ทั้งคนและสัตว์หลายๆชนิดได้

ถ้าในน้ำเหลืองจากสิ่งส่งตรวจ ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum* แอนติบอดีนี้จะไปเกาะที่แถบของแอนติเจนของ *P. insidiosum* (แถบทดสอบ) ทำให้สารให้สัญญาณ protein-gold conjugate สามารถเกาะกับแอนติบอดีของผู้ป่วยตรงตำแหน่งแถบทดสอบ ได้เกิดเป็นสัญญาณเส้นของ Colloidal gold ให้เห็นด้วยตาเปล่า แปลผลว่ามีการติดเชื้อ (positive, รูป 1A) หากน้ำเหลืองในผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum* สารให้สัญญาณ protein-gold conjugate ก็จะไม่เกาะที่ตำแหน่งทดสอบและไม่มีสัญญาณเส้น ให้แปลผลว่า เป็นลบ (negative, รูป 1B)

ดังนั้น จากหลักการและรูปแบบการทำงานของ ICT ดังกล่าว จะสามารถผลิตชุด ICT ได้ในรูปแบบใหม่ โดยชุดตรวจเพียงหนึ่งชุดจะมีคุณสมบัติด้านการนำไปใช้วินิจฉัยโรค pythiosis ได้ทั้งในคน ม้า สุนัข หรือสัตว์อื่นๆ ได้อย่างมีความจำเพาะ และความไวสูง นอกจากนี้ ยังได้พัฒนาระบบให้สัญญาณ protein-gold conjugate ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ antibody ของ host ได้หลายชนิด ซึ่งสามารถ

นำไปประยุกต์ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรคต่างๆ โดยการตรวจหา antibody โดยวิธีตามรูปแบบของ ICT หรือ นำไปปรับใช้กับ immunoassay ในรูปแบบอื่นได้ เช่น Dot-ELISA, ELISA เป็นต้น



รูปที่ 1 การแสดงผลที่ได้จากชุดตรวจ pythiosis. **รูป 1A** แสดงการให้ผลบวก (คือผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum*) จะมีแถบสีที่แถบทดสอบ (test line) และควบคุม (control line). **รูป 1B** แสดงการให้ผลลบ (คือผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum*) จะมีเพียงแถบสีที่แถบควบคุม (control line)

ผลวิจัยที่ได้นอกจากจะช่วยวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง สะดวก และรวดเร็ว ซึ่งมีผลต่อการรักษาได้ถูกต้องทันเวลาที่เพื่อลด การเจ็บป่วย การสูญเสียอวัยวะ/พิการ และการชีวิต และยังช่วยให้ทราบถึงปัญหาการติดเชื้อในคน/สัตว์ ทำให้เข้าใจการแพร่กระจายของเชื้อและขนาดประชากรของคน/สัตว์ที่ติดเชื้อ ช่วยเฝ้าระวังการระบาดของโรคทั้งในประเทศและในต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำชุดตรวจไปจำหน่ายยังต่างประเทศที่มีโรค pythiosis ในคนและสัตว์เป็นโรคประจำถิ่น

2.1.2 การทบทวนวรรณกรรม

2.1.2.1. โรค pythiosis: สาเหตุการติดต่อ พยาธิสภาพ และ การรักษา

โรค pythiosis เป็นโรคติดเชื้อเกิดในคนและสัตว์ สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Pythium insidiosum* เป็นจุลินทรีย์คล้ายรา ชอบอาศัยอยู่ในน้ำ (fungus-like aquatic organism) ในแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตร้อน กึ่งร้อน และอบอุ่น (tropical, subtropical and temperate regions) จัดเป็นโรคติดต่อทางน้ำชนิดหนึ่ง (water-borne disease) โครงสร้างของเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นสายเหมือนรา ผนังเซลล์ประกอบด้วยสาร cellulose และ β -glucan ส่วนของ cytoplasmic membrane ไม่มีสาร ergosterol ซึ่งพบในรา (1-3)

การติดเชื้อเกิดจาก เชื้อในรูปสายรา (hyphae) หรือ เชื้อในรูปซุโอสปอร์ (zoospore ซึ่งเป็นระยะติดต่อ) โดยพบว่าซุโอสปอร์ มีการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า (tropism) ได้แก่ เนื้อเยื่อ, ผิวหนัง และเส้นผม ของคนและม้า รวมทั้งบาดแผลและผิวหนังที่เกิดความเสียหาย โดยซุโอสปอร์มีแฟลกเจลล่า (flagella) ว่ายน้ำได้ จะว่ายน้ำเข้าไปสู่บาดแผลหรือผิวหนังปกติเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์รูปกลม (encyst) หลัง amorphous material มาล้อมรอบเซลล์ทำให้เกิดการยึด (adhesion) ของ ซุโอสปอร์กับพื้นผิวของเนื้อเยื่อหรือบาดแผล จากนั้นจะสร้างท่ออก (germ tube) แทงเข้าไปในเนื้อเยื่อของ host สายราจะรุก (invade) เข้าทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ นำมาซึ่งสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง เกิดการสูญเสียอวัยวะ พิการ และเสียชีวิตในอัตราสูง ตำแหน่งของการเกิดโรคแยกเป็นประเภท (4-9) ได้แก่

ก. การติดเชื้อที่ผิวหนัง/เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (cutaneous/subcutaneous pythiosis) ทำให้เกิดรอยแผล เกิดการอักเสบที่ผิวหนัง (ulcer, granuloma) ในคนส่วนใหญ่พบบริเวณขามากกว่าแขน

ข. การติดเชื้อที่ดวงตา (ocular pythiosis) ทำให้เกิดกระจกตาอักเสบ (keratitis), แผลที่กระจกตา (corneal ulcer), กระจกตาทะลุ (perforation), หนองในตา (hypopyon), ลูกตาอักเสบ (endophthalmitis), เปลือกตาบวม (eye lid swelling)

ค. การติดเชื้อที่หลอดเลือดแดง (vascular pythiosis) ทำให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือดแดง (arthritis) ขนาดเล็ก, ขนาดกลาง, ขนาดใหญ่ ทำให้เกิดหลอดเลือดอุดตัน (occlusion) เนื้อเยื่อขาดเลือดเกิดเนื้อตาย (gangrene) หรือหลอดเลือดแดงโป่งพอง (aneurysm) เกิดเลือดออกรุนแรงได้

ง. การติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (disseminated pythiosis) เชื้อสามารถแพร่กระจายก่อพยาธิสภาพที่อวัยวะต่างๆ เช่น ระบบทางเดินอาหาร, สมอง, ปอด, กระดูก เป็นต้น

โรค pythiosis ในมนุษย์

โรค pythiosis ในมนุษย์ (human pythiosis) เป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (emerging disease) (2, 10) พบผู้ป่วยกระจายอยู่ทั่วโลก สองรายแรกในโลกถูกรายงานการค้นพบที่ประเทศไทยในปี พ.ศ. 2528 (9) และประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์การติดเชื้อสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 80 ของผู้ป่วยทั้งหมดในโลก โดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อของหลอดเลือดแดงเป็นผู้ป่วยที่พบในประเทศไทยทั้งหมด (18) ซึ่งการติดเชื้อของหลอดเลือดแดงเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญ เนื่องจากโรคมีความรุนแรง ผู้ป่วยอาจสูญเสียแขนขาหรือเสียชีวิตได้หากเกิดกับหลอดเลือดแดงขนาดกลางหรือใหญ่และลุกลามเข้าสู่ bifurcation ของหลอดเลือดแดงใหญ่ หากรักษาไม่ได้ผล ผู้ป่วยเสียชีวิตทุกราย ร้อยละ 85 ของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อบริเวณผิวหนัง/เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง ติดเชื้อที่หลอดเลือดแดง หรือติดเชื้อแบบแพร่กระจายมีโรคประจำตัวทางโลหิตวิทยาที่จำเพาะ ได้แก่ ภาวะซีดหรือเม็ดเลือดแดงอายุสั้นเรื้อรัง (chronic anemia or hemolytic anemia) เช่น ความผิดปกติของฮีโมโกลบิน (hemoglobinopathy), โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia), โรคไขกระดูกฝ่อ (aplastic anemia) (24, 25) ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการก่อพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของ host โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อของหลอดเลือดแดงทั้งหมดมีโรคทางโลหิตวิทยาข้างต้น นอกจากนี้ ผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่มิอาจชีพทางเกษตรกรรมซึ่งเป็นอาชีพสำคัญของคนไทย (11) ซึ่งมีโอกาสสัมผัสน้ำหรือพืชในแหล่งน้ำธรรมชาติ ประสบอุบัติเหตุการบาดเจ็บต่อมือ เท้า แขน ขา ได้บ่อยกว่าผู้ป่วยที่ประกอบอาชีพอื่น จาก

ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า human pythiosis เป็นโรคติดเชื้อประจำถิ่นในประเทศไทย (endemic) ดังนั้นในปัจจุบันโรคนี้จึงถือเป็นปัญหาด้านสุขภาพของประเทศไทยและจะเป็นปัญหาแก่ประชากรในภูมิภาคอื่นได้หากไม่มีการควบคุมและเฝ้าระวังโรคที่มีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันยังไม่มียาจำเพาะที่ใช้รักษาโรคอย่างได้ผล เฉพาะการติดเชื้อของผิวหนังและตาเท่านั้นที่ตอบสนองต่อยาต้านเชื้อราบางชนิด การรักษา มักต้องอาศัยการผ่าตัดร่วมด้วย หากเป็นการติดเชื้อของหลอดเลือดแดงที่ไม่ตอบสนองต่อยาต้านเชื้อรา จำเป็นต้องตัดขาหรือแขนที่ติดเชื้อออก ร่วมกับการใช้วัคซีนที่สกัดจากตัวเชื้อ (immunotherapy) ผู้ป่วยมักสูญเสียอวัยวะหรือในรายที่ลุกลามมากจะเสียชีวิต (1, 26)

โรค pythiosis ในสัตว์

โรค pythiosis เดิมมีการรายงานในสัตว์ตั้งแต่ช่วงแรกของศตวรรษที่ 20 พบในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ ม้า สุนัข แมว วัว เกะ อูฐ นก ฯลฯ ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ พบการเกิดโรคในทุกทวีป สัตว์ที่เป็นโรคส่วนใหญ่พบการรายงานใน ม้า และ สุนัข (1, 8, 12-16, 27) โรค pythiosis ในม้าส่วนมากพบการติดเชื้อที่ผิวหนัง มีอาการต่อมน้ำเหลืองโต เกิดการอักเสบของผิวหนังเป็นเป็นตุ่ม เป็นแผลเรื้อรังเป็นหนอง เกิดการตายของเนื้อ เกิดแผลที่ผิวหนังและสามารถลุกลามถึงกระดูก มีความรุนแรงทำให้ขาพิการ แผลที่มีขนาดใหญ่ทำให้ม้าเกิดภาวะเลือดจางและมีระดับโปรตีนในเลือดต่ำ ตรงบริเวณรอยโรคสามารถพบลักษณะเป็นก้อนคล้ายหิน เรียกว่า kunkers (15) มีขนาดตั้งแต่เม็ดข้าวสารและใหญ่ได้หลายเซนติเมตร kunkers เป็นลักษณะจำเพาะของโรค pythiosis ที่เกิดในม้า โดยเกิดจากสะสมของสารที่ขับออกจาก eosinophils (degranulation) ที่มาล้อมรอบ hyphae ของเชื้อที่บุกรุกเนื้อเยื่อของม้า สุนัขตามรายงานส่วนมากเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal infection) (13, 14) อาการที่พบคือ อาเจียน ถ่ายมูลเหลว น้ำหนักตัวลด เบื่ออาหาร เกิดแผลในกระเพาะและลำไส้ พบก้อนในช่องท้อง (palpable abdominal mass) และสามารถพบการติดเชื้อที่ตับอ่อน ต่อมน้ำเหลือง และท่อน้ำดี จากรายงานส่วนใหญ่ การวินิจฉัยพบสาเหตุของโรคเมื่อม้าและสุนัขมีอาการของโรคหนักหรือตายไปแล้ว (16)

2.1.2.2. การวินิจฉัย

การวินิจฉัยโรค pythiosis ทางห้องปฏิบัติการทำได้โดย การแยกเชื้อ, การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา, การตรวจทางอณูวิทยา และการตรวจปฏิกิริยาทางน้ำเหลือง การแยกเชื้อ โดยการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากรอยโรค เช่น ชิ้นเนื้อที่กระจกตา ผิวหนัง แผล ผื่นหลอดเลือดแดง หรือผ่าตัดดัดลิ้นเลือด หรือ kunkers จากม้า นำสิ่งส่งตรวจดังกล่าวมาทำเสมียร์สด (wet smear) ป้ายบนสไลด์ หยดด้วยน้ำยาไปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบสายราขนาดใหญ่ อาจมีหรือไม่มีผนังกัน แตกแขนงทำมุมฉาก การวินิจฉัยที่แน่ชัดทำได้โดยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Sabouraud Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar การวินิจฉัยเพิ่มเติมเพื่อความถูกต้องโดยการกระตุ้นการสร้างซูโปสเปอร์ด้วยการใช้อาหารเหลวที่มีธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม (1)

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาทำโดยย้อมสิ่งส่งตรวจด้วย Gomori's methenamine silver หรือ periodic-Schiff จะตรวจพบสายราที่มีฐานฐานวิทยาข้างต้น ส่วนการตรวจทางอณูวิทยาทำด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ตรวจหา 18s rRNA genes ของ *P. insidiosum* (26)

การวินิจฉัยโรค pythiosis ด้วยการตรวจปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองทำได้ด้วยการเก็บตัวอย่างน้ำเหลืองไม่จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างจากรอยโรคซึ่งแสดงถึงอาการที่เกิดขึ้น บางครั้งลุกลามรุนแรงไปแล้ว การตรวจปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองสามารถใช้ตรวจคนหรือสัตว์ที่มีความเสี่ยงทำให้สามารถวินิจฉัยได้ตั้งแต่เบื้องต้น ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพ ผู้ติดเชื้อไม่ต้องทรมานกับการเกิดโรค ลดการสูญเสียอวัยวะ พิการ และเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ข้อดีของการตรวจปฏิกิริยาทางน้ำเหลือง คือ การเก็บตัวอย่างทำได้สะดวก ไม่มีปัญหาเรื่องการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งเป็นปัญหาของการเก็บตัวอย่างมาวินิจฉัยแบบแยกเชื้อหรือการวินิจฉัยทางอณูวิทยา (1)

การตรวจโรคด้วยปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองโดยเทคนิค immunodiffusion (ID) เป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* และแอนติบอดีของผู้ป่วยในเนื้อวุ้น โดยแอนติเจนและแอนติบอดีจะค่อย ๆ แพร่ (diffuse) ผ่านเนื้อวุ้น เข้าหากัน บริเวณตำแหน่งที่มีปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีพอเหมาะกัน ก็จะเกิดเส้นตะกอน (precipitin band, precipitin line) ให้เห็นได้ การตรวจโรค pythiosis ด้วยเทคนิคนี้ให้ผลความจำเพาะสูง แต่เป็นเทคนิคที่มีความไวต่ำ (28, 29)

การตรวจโรคด้วยปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองโดยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (21) เป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* และแอนติบอดีของผู้ป่วยทดสอบใน microtiter plate โดยเคลือบหลุมที่ทดสอบด้วยแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* แล้วใส่น้ำเหลืองของผู้ป่วยลงไป หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของ host ที่ติดสลาด้วยเอนไซม์ นำไปวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น ELISA จึงเป็นวิธีที่ให้ผลความจำเพาะ และ ความไวสูง แต่การตรวจด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ, ใช้เวลาในการทำนานและยุ่งยากมีหลายขั้นตอน และต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ รวมถึงสารเคมีต่างๆ จึงไม่เหมาะในการที่จะนำไปใช้ในพื้นที่ห่างไกลที่เป็นแหล่งระบาดของโรค จึงได้มีผู้วิจัยผลิตพัฒนาวิธีการตรวจที่ใช้งานง่าย สะดวก มีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะ และความไวสูง ได้แก่ hemagglutination test (HA) และ immunochromatographic test (ICT)

HA (30) เป็นการทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแก่ที่เคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองผู้ป่วยที่เป็นโรค pythiosis แอนติบอดีของผู้ป่วยที่จำเพาะกับแอนติเจนของเชื้อบนเม็ดเลือดแดงแก่ทำปฏิกิริยาจับกันทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกัน โดยมีความจำเพาะ และ ความไวที่ 99% และ 88% ตามลำดับ จากหลักการนี้ HA สามารถนำไปใช้ตรวจหาโรค pythiosis ได้ทั้งคนและสัตว์ทุกชนิดที่สร้างแอนติบอดีต่อ แอนติเจนของเชื้อ *P. insidiosum* ได้ แต่ยังไม่มียางานการนำไปใช้ ซึ่ง HA อาจมีข้อจำกัดในเรื่องของอายุและความเสถียรของเม็ดเลือดแดงแก่ที่เคลือบแอนติเจนและจำเป็นต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

ICT (18) เป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการปฏิกิริยาแอนติเจนและแอนติบอดี แต่ทดสอบได้ง่าย ICT ที่ผลิตและพัฒนาขึ้นเป็น ICT สำหรับตรวจ human pythiosis มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ แอนติเจนของเชื้อที่ถูกตรึงไวบน nitrocellulose membrane strip ซึ่งเป็นแถบที่ใช้อ่านผล มี rabbit anti-human IgG gold conjugate เป็นตัวให้สัญญาณ ผู้ป่วยโรค pythiosis จะสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *P.insidiosum* เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาบน ICT จะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะกับ แอนติเจนที่ตรึงบน nitrocellulose membrane ทำให้เกิดสัญญาณขึ้นจากการจับของ rabbit anti-human IgG gold conjugate โดยมีความจำเพาะและความไวที่ 100% และ 88% ตามลำดับ การใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือ ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ ใช้พื้นที่ในการทดสอบไม่มาก สามารถใช้ได้สถานพยาบาลทั่วไปทั้งกรุงเทพและต่างจังหวัด โดยทราบผลภายใน 30 นาที ทำให้สามารถตัดสินใจในการรักษาได้ทันทีที่ทราบผลการวินิจฉัย ชุดทดสอบมีอายุการเก็บรักษานานมากกว่า 2 ปี โดยเก็บในที่แห้ง มีด ที่ อุณหภูมิห้อง

จากการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) โดยใช้เทคนิค Western blot วิเคราะห์แอนติบอดีของคนหรือสัตว์ (ม้า สุนัข วัว) ที่เป็นโรค pythiosis หรือติดเชื้อ *P. insidiosum* พบว่า host มีสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของเชื้อได้หลายแอนติเจนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อในกลุ่มอื่น โดยมีแอนติเจนของเชื้อบางตัว เช่น แอนติเจนขนาด 28 kDa สามารถทำปฏิกิริยากับได้กับแอนติบอดีของคน ม้า สุนัข วัว ที่เป็นโรคได้หมด (31)

2.1.3. สถานการณ์ของโรค pythiosis ในประเทศไทย

ประเทศไทยมีการรายงานการเกิดโรค human pythiosis อย่างต่อเนื่อง พบผู้ป่วยอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ และจัดเป็นโรคประจำถิ่น เริ่มมีการพบการรายงานการเกิดโรค pythiosis ในสัตว์แล้ว จากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลรามธิบดี จึงเป็นไปได้ว่า ม้า สุนัข หรือ สัตว์อีกหลายชนิดในประเทศไทยอาจติดโรคนี้ด้วยแต่ยังไม่ได้ศึกษาค้นพบ นอกจากนี้สถานการณ์การเกิดอุทกภัยครั้งใหญ่ในปี พ.ศ. 2554 และการเกิดพายุฝนตกที่ทวีความรุนแรงขึ้น (32) อาจเป็นสาเหตุให้เชื้อมีการแพร่กระจายในวงกว้างมากขึ้น สาเหตุที่ไม่มีรายงานการติดเชื้อในสัตว์ของประเทศไทยเนื่องจาก บุคลากรทางการแพทย์และสัตวแพทย์ไม่คุ้นเคยหรือไม่มีประสบการณ์ในการวินิจฉัยโรคนี้ และยังไม่มียุทธวิธีตรวจที่ใช้สะดวก ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ ทำให้การตรวจโรคเกิดความผิดพลาด หากการติดเชื้อในสัตว์เหล่านี้ไม่ได้หากม้า สุนัข หรือ สัตว์อื่นๆ เป็นโรคนี้อาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อ (reservoir) (33) ให้กระจายสู่คนได้ ดังนั้นวิธีวินิจฉัยโรคในม้าและสุนัขที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็น

จากความสำเร็จของคณะผู้วิจัยที่ได้เคยผลิตชุดตรวจโรค human pythiosis ในรูปแบบ immunochromatographic strip (ICT) ที่ใช้งานง่าย รวดเร็ว ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ ใช้ตรวจอย่างมีประสิทธิภาพ (10) สามารถช่วยผู้ป่วยให้ได้รับการวินิจฉัยและรักษาที่รวดเร็วขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าตรวจโรค pythiosis ในม้า สุนัข หรือ สัตว์ต่างๆ โดย ICT น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสม และมีความจำเป็น

สำหรับประเทศไทยที่ human pythiosis เป็นโรคประจำถิ่น รวมทั้งสามารถนำ ICT ไปใช้ในประเทศที่มีรายงานการเกิดโรคในม้า สุนัข หรือ สัตว์ต่างๆ ผลที่ได้จะช่วยให้ทราบถึงปัญหาการติดเชื้อในม้า สุนัข หรือ สัตว์อื่นๆ เข้าใจการแพร่กระจายของเชื้อและขนาดประชากรของสัตว์ที่ติดเชื้อ การควบคุมและการเฝ้าระวังการระบาดของโรค และมีวิธีการตรวจที่ใช้สะดวก รวดเร็ว ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งมีผลต่อการรักษา ได้ถูกต้องทันที่

2.2 เนื้อเรื่อง

2.2.1. การเตรียมแอนติเจน:

เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแยกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Sabouraud dextrose broth เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใส่สารเพื่อฆ่าเชื้อแล้วนำไปกรอง ใส่สาร protease inhibitors และทำให้เข้มข้นด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านแผ่นเยื่อ (Amicon Ultra-15 centrifugal filter) เพื่อให้ได้ culture filtrate antigen (CFA) เข้มข้น 80 เท่า และเก็บไว้ที่ -80 °C (34)

2.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การทดสอบการติดเชื้อ *P. insidiosum* เพื่อตรวจหา anti-*P. insidiosum* antibodies ในตัวอย่างเลือดจากสิ่งส่งตรวจ โดยทำการทดลอง ณ ปฏิบัติการ 3 สถานที่

i.) Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand (ELISA protocol of Chareonsirisuthigul et al) (19) ทำการทดสอบตัวอย่างจากคน โดยใช้ CFA เป็นสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ anti-*P. insidiosum* antibodies

ii.) Department of Veterinary Clinical Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA (ELISA protocol of Grooters et al) (20) ทำการทดสอบตัวอย่างจากสุนัข โดยใช้ CFA เป็นสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ anti-*P. insidiosum* antibodies โดยใช้ soluble hyphal antigen เป็นสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ anti-*P. insidiosum* antibodies

iii.) Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (ELISA protocol of Santurio et al) (35) ทำการทดสอบตัวอย่างจากสุนัข, ม้า, วัว และกระต่าย โดยใช้ soluble hyphal antigen เป็นสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ anti-*P. insidiosum* antibodies

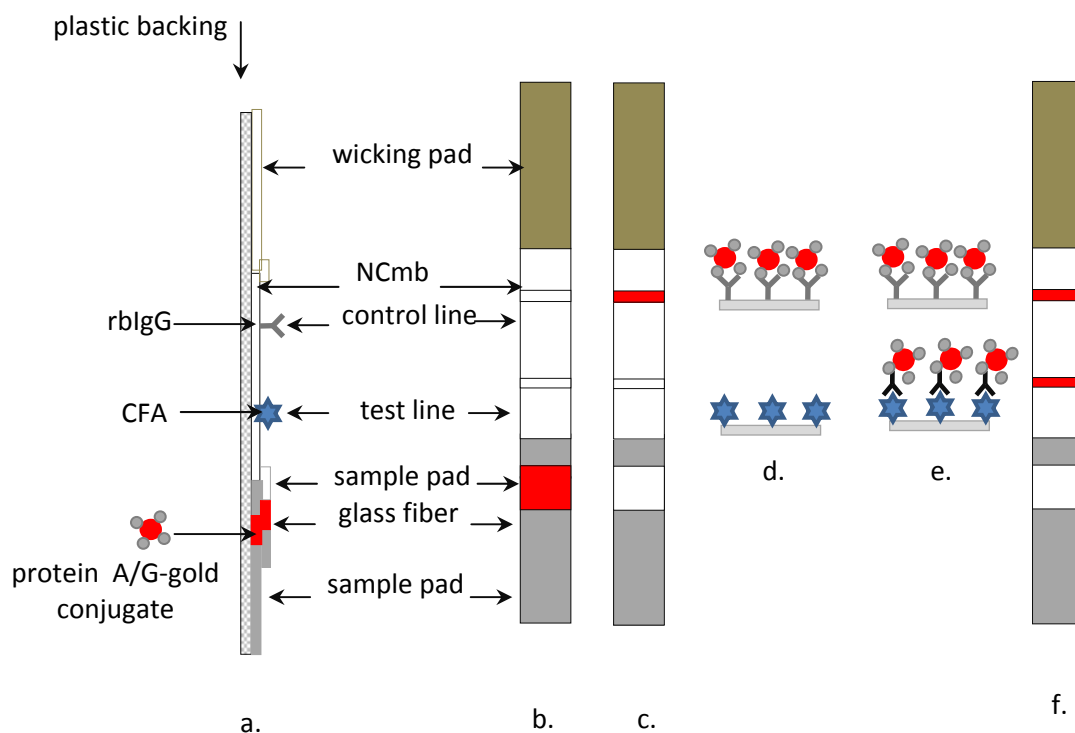
2.2.3. การเตรียม ICT

2.2.3.1. วัสดุที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในการประดิษฐ์ ICT ประกอบด้วย (รูปที่ 2)

- a.) Wicking pad (WP) เป็นแผ่นกระดาษ 3MM Chromatography paper สามารถอุ้มน้ำ ดูดซับและดึงของเหลว
- b.) Nitrocellulose membrane (NCmb) เป็นแผ่นเยื่อสังเคราะห์สำหรับตรึงแอนติบอดีและแอนติเจนในชุดตรวจ เป็นแถบควบคุม (Control region) และแถบทดสอบ (Test region)
- c.) Glass fiber (GF) เป็นแผ่นเส้นใยแก้วสำหรับไว้เคลือบด้วย Colloidal gold conjugated antibody
- d.) Sample pad (SP) เป็นแผ่น Cotton paper สามารถอุ้มน้ำ ดูดซับและดึงของเหลวที่ทดสอบมาทำปฏิกิริยาบน Nitrocellulose membrane ของ ICT
- e.) Plastic backing supporter (PS) เป็นแผ่นพลาสติก มีกาวหน้าหนึ่ง เพื่อใช้ประกอบเป็นชุดตรวจ
- f.) Colloidal gold particle เป็นตัวทำให้เกิดสัญญาณ

2.2.4 รูปแบบของ ICT

การศึกษาและพัฒนาชุดตรวจ ICT สำหรับวินิจฉัยโรคพิษไอซีสในคนและในสัตว์ในการวิจัยนี้ใช้หลักการ indirect immune-assay เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่ร่างกายผู้ติดเชื้อติดเชื่อ *P. insidiosum* สร้างขึ้น โดยชุดตรวจ ICT ที่ใช้มีรูปแบบแสดงในรูปที่ 2 ดังนี้



รูปที่ 2 ส่วนประกอบของชุดตรวจ ICT และ รูปแบบของชุดตรวจ ที่ใช้หลักการ indirect immune-assay โดยมี protein A/G-gold conjugate เป็นสารให้สัญญาณ, 2a.) รูปแสดงด้านข้างของชุดตรวจ; 2b.) รูปแสดงด้านหน้าของชุดตรวจ; 2c.) แสดงสัญญาณบนชุดตรวจเมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค pythiosis; 2d.) แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่ง control line และ test line บนชุดตรวจเมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค pythiosis; 2e.) แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่ง control line และ test line บนชุดตรวจเมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นโรค pythiosis; 2f.) แสดงสัญญาณบนชุดตรวจเมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นโรค pythiosis

2.2.5. การศึกษาการตรึง antigen (Ag) และ antibody (Ab) ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NCmb)

ชุดตรวจ ICT สำหรับวินิจฉัยโรคพิษโอชีสในคนและในสัตว์ที่ใช้ PAG-gold conjugate เป็นสารให้สัญญาณ โดยจะใช้ NCmb ขนาด pore size 8 μm เป็นวัสดุที่ใช้ตรึง CFA (capture agent) ที่ความเข้มข้น 1mg/ml เป็นแถบทดสอบหา (test line) และใช้ตรึง normal rabbit IgG ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml เป็นแถบควบคุม (control line) โดยใช้เครื่อง ZX1000, Bio-Dot สำหรับฉีดพ่นสารชีวโมเลกุล, นำแผ่น NCmb อบในตู้ดูดความชื้น 30% humidity, 30°C นาน 30 นาที แล้วนำ NCmb จุ่มในสารละลาย 1% (wt/vol) BSA, 0.1% (wt/vol) trehalose in 10 mM in sodium phosphate buffer pH 7.4 ซึ่ง BSA มีหน้าที่ลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ ในขณะที่ trehalose มีหน้าที่รักษาสภาพ normal rabbit IgG และ CFA, จากนั้นนำ membrane ไปอบในตู้ดูดความชื้น เก็บไว้รอประกอบ

2.2.6. การเตรียมสารให้สัญญาณ protein-gold conjugation

การทดลองครั้งนี้ได้ใช้ recombinant protein A/G-colloidal gold conjugate เป็นสารให้สัญญาณเพื่อพัฒนาชุดวินิจฉัยโรคพิษโอชีสในคนและในสัตว์ โดย protein A/G (PAG) จะถูกเคลือบบนอนุภาคของ Colloidal gold particle ด้วยวิธี pl-dependent passively adsorption โดยอนุภาคของ Colloidal gold particle และ protein molecule จะถูกเชื่อมกันด้วย hydrophobic interaction และ electrostatic force

จากนั้นนำ colloidal gold suspension ขนาด 40 nm, มาปรับ pH ให้ได้ 7.15 - 7.25 ด้วย 0.2 M Na_2CO_3 , ใส่ PAG ที่ความเข้มข้น 6 μg ของ PAG ต่อ 1 ml ของ gold ไปใน gold suspension โดยเขย่าตลอดเวลาในขณะที่เติมสารผสมกัน (รอทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลาย casein (0.5% final conc.) ลงไปเพื่อเคลือบพื้นผิวของ gold particle ในที่ส่วนที่เหลือนำไป Centrifuge ที่ 6000 g x 15 นาที เพื่อแยกของเหลวส่วนใสด้านบนที่มีสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก, ใส่สารละลาย 0.5% casein ลงไปเท่ากับปริมาตร colloidal gold suspension ตั้งทิ้งไว้เพื่อล้างสารที่ไม่ทำ

ปฏิกิริยาอีกครั้ง, จากนั้นนำไป Centrifuge เพื่อแยกของเหลวส่วนใสด้านบน สุดท้ายจะได้ PAG-gold conjugate แล้วเติม 20% sucrose (wt/vol) เพื่อเตรียมใส่ใน Conjugate releasing pad

2.2.7. เตรียมส่วนประกอบของชุดตรวจ ICT

2.2.7.1. การเตรียม Sample pad

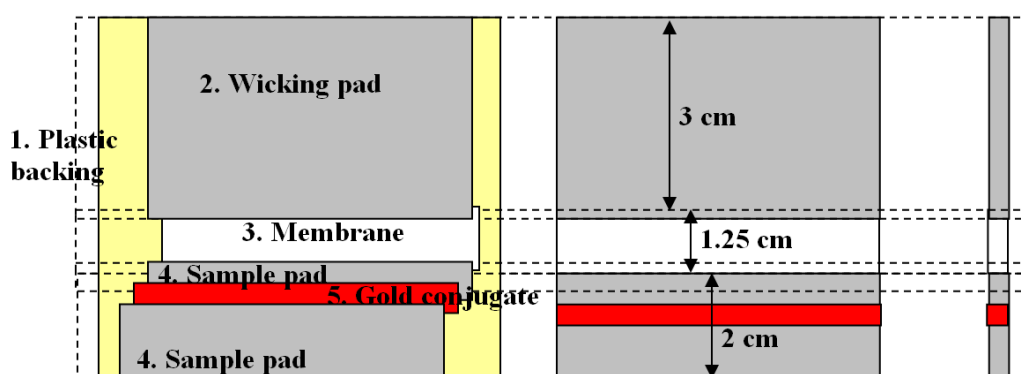
เตรียม 2% Triton X-100, 0.05% Polyvinylpyrrolidone ใน 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำ cotton paper จุ่มลงในสารที่เตรียม แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้ดูดความชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ 30 %) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.2.7.2. การเตรียม Conjugate releasing pad

ตัด Glass fiber filter ขนาด 2.5x2.5 มม. จากนั้นดูด Antibody-gold conjugate (or protein-gold conjugate) ที่เตรียมไว้ปริมาณ 2.5 μ l ใส่ลงบน Glass fiber filter แต่ละชิ้น และทำแห้งโดยนำเข้าตู้ดูดความชื้น เก็บไว้รอประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

2.2.8. การประกอบชุดตรวจสอบ

ชุดทดสอบประกอบไปด้วยแถบพลาสติก (Plastic backing) ที่มีแผ่น nitrocellulose membrane วางติดตรงกลาง แผ่น nitrocellulose นี้จะมีเส้นแถบแอนติเจนของ *P. insidiosum* (CFA) และแถบแอนติบอดี (normal rabbit IgG, rblgG) (ตามรายละเอียดข้อ 2.2.4) ที่ส่วนปลายด้านบนของแผ่น Nitrocellulose จะวาง Wicking pad ซ้อนทับ 1 มม. ส่วนปลายด้านล่างของ strip จะวาง sample pad โดยที่ตรงกลางจะมี glass fiber filter pad วางแทรกอยู่ และ glass fiber pad นี้ถูกเคลือบด้วย protein-gold conjugate ซึ่งใช้เป็นตัวให้สัญญาณ เมื่อวัสดุทั้งหมดประกอบเข้าด้วยกันแล้วจะนำไปตัดด้วยเครื่องตัด cutting module (Biodot CM 4000R, Bio-Dot) สุดท้ายจะได้ชุดตรวจสอบมีขนาด 2.5x50 มิลลิเมตร พร้อมใช้งาน (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การประกอบ immunochromatographic test

2.2.9. ตัวอย่างเลือดที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของ ICT

ทดสอบชุดตรวจ multi-host specific ICT แล้วกับตัวอย่างจากคนที่ประเทศไทย และ ตัวอย่างจาก ม้า, สุนัข, วัว และ กระต่าย ทดสอบโดย Depto Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS ที่ Brazil และการทดสอบตัวอย่างจากสุนัข ที่ Department of Veterinary Clinical Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA ที่ USA

ตัวอย่างจากคน 108 ราย ประกอบด้วย

- ตัวอย่างซีรัมจากคนติดเชื้อ *P. insidiosum* 28 ราย ที่ทดสอบโดย ELISA และ PCR ประกอบด้วย 26 vascular, 1 ocular, and 1 cutaneous pythiosis)

- ตัวอย่างซีรัมจากคนไม่ติดเชื้อ *P. insidiosum* 80 ราย ประกอบด้วย healthy blood donors [n=62], ผู้ป่วยด้วยโรค thalassemia [n=10], aspergillosis [n=3], zygomycosis [n=2], candidiasis [n=1], cryptococcosis [n=1], และ histoplasmosis [n=1]),

ตัวอย่างจากจากสัตว์ โดยทดสอบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบกับวิธี ELISA ประกอบด้วย

- ตัวอย่างซีรัมจากสัตว์ติดเชื้อ *P. insidiosum* 57 ราย ประกอบด้วย สุนัข 24 ราย, ม้า 12 ราย, กระต่าย 12 ราย และ วัว 9 ราย

- ตัวอย่างซีรัมจากสัตว์ที่ไม่ติดเชื้อ *P. insidiosum* 63 ราย ประกอบด้วย สุนัขที่ไม่มีโรคใดๆ 9 ราย, สุนัขที่เป็นโรคอื่นๆ ได้แก่ *Lagenidium giganteum* infection 8 ราย, *Paralagenidium karlingii* infection 6 ราย, zygomycosis 3 ราย, aspergillosis 1 ราย, blastomycosis 1 ราย, cryptococcosis 1 ราย, protothecosis 1 ราย และ sporotrichosis 1 ราย, วัวที่ไม่เป็นโรค 12 ราย, ม้าที่ไม่เป็นโรค 10 ราย และ กระต่ายที่ไม่เป็นโรค 10 ราย

2.2.10. การทดสอบชุดตรวจ ICT กับตัวอย่าง

ตัวอย่างซีรัมจากคนและสัตว์เจือจางที่ 1/10,000 และ 1/5,000 ตามลำดับด้วย 0.15 M PBS, pH 7.4, ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 μ L ใส่ใน 96-well micro-titer plate, นำชุดทดสอบ ICT มาจุ่ม, อ่านผลที่ 30 นาที

Assay evaluation: ศึกษาคุณสมบัติของ ICT โดยทดสอบกับ sample ต่างๆจากในประเทศและต่างประเทศเทียบกับวิธี ELISA เพื่อหาความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) ของชุด ICT ที่ได้จากการพัฒนา โดยค่า sensitivity, specificity และ accuracy คำนวณจาก

$$\text{Sensitivity} = \text{True positive} / (\text{false negative} + \text{true positive}) \times 100$$

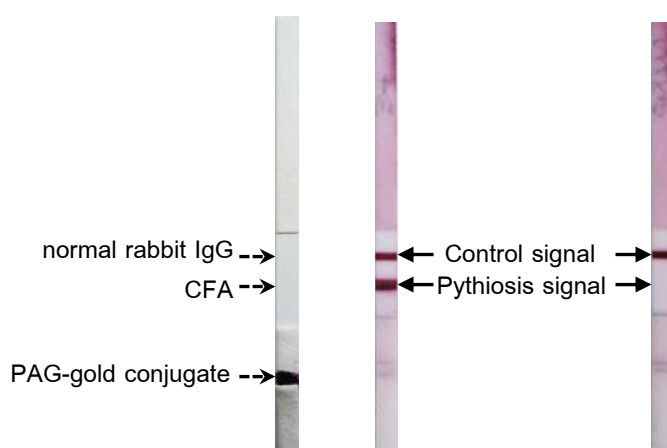
$$\text{Specificity} = \text{True negative} / (\text{false positive} + \text{true negative}) \times 100$$

$$\text{Accuracy} = [(\text{all cases with true positive and true negative results}) / (\text{all pythiosis and control cases})] \times 100$$

2.2.11. ผลการทดลอง

ชุด multi-host specific ICT สำหรับตรวจโรค pythiosis ในคนและสัตว์ ที่ใช้ PAG-gold conjugate เป็นสารให้สัญญาณของชุดตรวจ โดยมีแผ่น NCmb ที่ตรึงด้วย CFA เป็นแถบทดสอบ (test line) และแถบที่ตรึงด้วย normal rabbit IgG เป็นแถบควบคุม (control line) (รูป 4) จากนั้นนำไปทดสอบกับตัวอย่างซีรัมที่เจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสม ซีรัมจากคนและสัตว์เจือจางที่ 1/10,000 และ 1/5,000 ตามลำดับด้วย

เมื่อทำการทดสอบใน 96-well micro-titer plate ตัวอย่างซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum* แอนติบอดีนี้จะไปเกาะที่ CFA (แถบทดสอบ) ทำให้สารให้สัญญาณ PAG-gold conjugate ไปเกาะแอนติบอดีของผู้ป่วยตรงตำแหน่งแถบทดสอบ ในขณะที่ PAG-gold conjugate ที่เหลือจะวิ่งขึ้นไปทำปฏิกิริยากับแถบควบคุม normal rabbit IgG ได้เกิดเป็นสัญญาณเส้น 2 แถบที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แปลผลว่ามีการติดเชื้อ (positive, รูป 4B) หากซีรัมผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum* สารให้สัญญาณ PAG-gold conjugate จึงไม่เกาะที่ตำแหน่งทดสอบและไม่เกิดสัญญาณขึ้นที่แถบทดสอบ, PAG-gold conjugate ที่เหลือจะวิ่งขึ้นไปทำปฏิกิริยากับแถบควบคุม normal rabbit IgG เกิดเป็นสัญญาณเส้น 1 แถบ ให้แปลผลว่า เป็นลบ (negative, รูป 4C)



รูปที่ 4. ผลการใช้ชุดตรวจ multi-host specific ICT สำหรับตรวจโรค pythiosis โดย PAG-gold conjugate เป็นสารให้สัญญาณของชุดตรวจ โดยมีแผ่น NCmb ที่ตรึงด้วย CFA เป็นแถบทดสอบหา (test line) และตรึง normal rabbit IgG เป็นแถบควบคุม (control line) 4A, รูป 4B แสดงการให้ผลบวก (คือ

ผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum*) จะมีแถบสีที่แถบทดสอบ และความเข้ม รูป 4C แสดงการให้ผลลบ (คือผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. insidiosum*) จะมีเพียงแถบสีที่แถบควบคุม

ทดสอบชุดตรวจ multi-host specific ICT แล้วกับตัวอย่างจากคนที่ประเทศไทย และ ตัวอย่างจากม้า, สุนัข, วัว และ กระจ่าง ทดสอบโดย Depto Microbiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS ที่ Brazil และการทดสอบตัวอย่างจากสุนัข ที่ Department of Veterinary Clinical Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA ที่ USA

ผลการใช้ multi-host specific ICT ในการทดสอบโรค pythiosis ตัวอย่างที่รวบรวมได้จาก คน, ม้า, สุนัข, วัว และ กระจ่าง ให้ค่า 90.6% sensitivity, 100% specificity และ 96.5% accuracy ตามลำดับ ในขณะที่วิธี ELISA ให้ค่า 98.8% sensitivity, 100% specificity และ 99.6% accuracy ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ผลการทดสอบโดยใช้ multi-host specific ICT และ ELISA สำหรับตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis ในคนที่ทดสอบจากประเทศไทย และ สัตว์ต่างๆที่ทดสอบจากประเทศสหรัฐอเมริกา และ บราซิล

Center	Host (Total sera)	ELISA			ICT		
		TP ^a / PC ^b (Sensitivity, %)	TN ^c / CC ^d (Specificity, %)	Accuracy (%) ^e	TP / PC (Sensitivity, %)	TN / CC (Specificity, %)	Accuracy (%)
Thailand	Humans (108)	27/28 (96.4)	80/80 (100.0)	99.1	24/28 (85.7)	80/80 (100.0)	96.3
USA	Dog (44)	18/18 (100.00)	26/26 (100.00)	100	17/18(94.4)	26/26 (100)	97.7
Brazil	Dogs (11)	6/6 (100.0)	5/5 (100.0)	100	6/6 (100.0)	5/5 (100.0)	100
	Horses (22)	12/12 (100.0)	10/10 (100.0)	100	9/12 (75.0)	10/10 (100.0)	86.4
	Cattle (21)	9/9 (100.0)	12/12 (100.0)	100	9/9 (100.0)	12/12 (100.0)	100
	Rabbits (22)	12/12 (100.0)	10/10 (100.0)	100	12/12 (100.0)	10/10 (100.0)	100
	Overall (184)	84/85 (98.8)	143/143 (100.0)	99.6	77/85 (90.6)	143/143 (100.0)	96.5

Footnote:

a Number of cases with true positive (TP) results

b Pythiosis cases

c Number of cases with true negative (TN) results

d Control cases

e Accuracy (%), [(all cases with true positive and true negative results) / (all pythiosis and control cases)] x 100

2.3 ข้อวิจารณ์ (Discussion)

2.3.1. จากผลการทดลอง ในจำนวนนี้มีตัวอย่างจากคน 1 รายติดเชื้อที่ดวงตา (ocular pythiosis) ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วย multi-host specific ICT และ ELISA เนื่องจากการติดเชื้อที่ดวงตานี้ จะมีกลไกการตอบสนองการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกันที่ต่ำมากกว่าการติดเชื้อที่ผิวหนัง (cutaneous/subcutaneous pythiosis) หรือหลอดเลือด (vascular pythiosis) เป็นผลทำให้ multi-host specific ICT และ ELISA ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้ (5, 18, 30)

2.3.2. ตัวอย่างจากคนติดเชื้อ 3 ราย, ตัวอย่างจากม้า 3 ราย และตัวอย่างจากสุนัข 1 ราย ให้ผลลบกับ multi-host specific ICT ในขณะที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วย ELISA ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า OD ของการทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่า ตัวอย่างดังกล่าวให้ค่า OD สูงกว่าค่า cut-off เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2.3.3. ตัวอย่างจากทั้งคนและสัตว์ที่ไม่ติดเชื้อ pythiosis และ/หรือ คนและสัตว์ที่ติดเชื้อหรือเป็นโรคอื่น ทั้งหมดให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วย multi-host ICT เช่นเดียวกับ ELISA ดังนั้นการวินิจฉัยโรค pythiosis ด้วยชุด multi-host ICT และ วิธี ELISA มีค่า specificity ที่ 100%

2.3.4. PAG-gold conjugate ที่เตรียมได้และใช้ในงานวิจัย สามารถใช้เป็นสารให้สัญญาณในชุด multi-host specific ICT เพื่อใช้วินิจฉัยโรค pythiosis จากตัวอย่างซีรัมได้ทั้งคน และ สัตว์ต่างๆได้ และ น่าจะสามารถนำ PAG-gold conjugate ไปใช้เป็นสารให้สัญญาณให้การศึกษาพัฒนาชุดตรวจที่อาศัยหลักการ ICT สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคอื่นๆได้

2.3.5. Multi-host ICT เมื่อทดสอบกับตัวอย่างทั้งหมดนี้ ให้ค่า 90.6% sensitivity, 100% specificity และ 96.5% accuracy

2.4 สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)

2.4.1. งานวิจัยนี้ได้เตรียมสารให้สัญญาณ PAG-gold conjugate เพื่อใช้เป็นสารให้สัญญาณในชุดตรวจ ICT ที่ให้สัญญาณชัดเจน เพื่อใช้ตรวจกับตัวอย่างซีรัมได้ทั้งคนและสัตว์ ได้แก่ สุนัข, ม้า, วัว และ กระต่ายได้

2.4.2. งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจ ICT เพื่อใช้ตรวจโรค pythiosis ในคน และสัตว์ โดยใช้ชุดตรวจเพียงชนิดเดียว

2.4.3. ชุดตรวจ ICT สำหรับตรวจวินิจฉัยโรค pythiosis ทั้งในคนม้า สุนัข หรือสัตว์อื่นๆ ที่พัฒนาขึ้น ในรูปแบบใหม่นี้ ให้ค่า 90.6% sensitivity, 100% specificity และ 96.5% accuracy ใกล้เคียงกับการทดสอบโดยวิธี ELISA แต่การใช้ชุดตรวจทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็วกว่า โดยใช้เวลาเพียง 30 นาที ก็สามารถรู้ผล

2.4.4. ผลงานวิจัยที่ได้ นอกจากจะได้ชุดตรวจที่ช่วยวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง สะดวก และรวดเร็ว ซึ่งมีผลต่อการรักษาได้ถูกต้องทันเวลาที่เพื่อลด การเจ็บป่วย การสูญเสียอวัยวะ/พิการ และการชีวิต และยังช่วยให้ทราบถึงปัญหาการติดเชื้อในคน/สัตว์ ทำให้เข้าใจการแพร่กระจายของเชื้อและขนาดประชากรของคน/สัตว์ที่ติดเชื้อ ช่วยเฝ้าระวังการระบาดของโรคทั้งในประเทศและในต่างประเทศ ดังนั้น ผลงานวิจัยในครั้งนี้ หากเป็นไปได้ควรนำไปวิจัยเพื่อต่อยอดให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ที่สามารถนำไปจำหน่ายในประเทศและต่างประเทศที่มีโรค pythiosis ในคนและสัตว์เป็นโรคประจำถิ่น ในอนาคต

2.5. เอกสารอ้างอิง:

1. Gastra W, Lipman LJ, De Cock AW, Exel TK, Pegge RB, Scheurwater J, et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol.* 2010 Nov 20;146(1-2):1-16.
2. Kaufman L. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: emerging tropical diseases. *Mycopathologia.* 1998;143(1):3-7.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1495-504.
4. Imwidthaya P. Human pythiosis in Thailand. *Postgrad Med J.* 1994 Aug;70(826):558-60.
5. Krajaeun T, Prachartam R, Wongwaisayawan S, Rochanawutinon M, Kunakorn M, Kunavisarut S. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? *American Journal of Ophthalmology.* 2004;137(2):370-2.
6. Martins TB, Kommers GD, Trost ME, Inkelmann MA, Figuera RA, Schild AL. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. *J Comp Pathol.* 2012 Feb-Apr;146(2-3):122-31.
7. Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, Thamprasert K, Vanittanakom N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2003 Dec;33(3):204-14.
8. Salas Y, Marquez A, Canelon J, Perazzo Y, Colmenarez V, Lopez JA. Equine pythiosis: report in crossed bred (Criole Venezuelan) horses. *Mycopathologia.* 2012 Dec;174(5-6):511-7.
9. Thianprasit M, Chaiprasert A, Imwidthaya P. Human pythiosis. *Curr Top Med Mycol.* 1996 Dec;7(1):43-54.
10. Elston DM. New and emerging infectious diseases. *J Am Acad Dermatol.* 2005 Jun;52(6):1062-8.
11. Krajaeun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2006 Sep 1;43(5):569-76.
12. Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathologia.* 1986 May;94(2):123-9.
13. Mendoza L, Arias M, Colmenarez V, Perazzo Y. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. *Mycopathologia.* 2005 Feb;159(2):219-22.
14. Pereira DI, Schild AL, Motta MA, Figuera RA, Sallis ES, Marcolongo-Pereira C. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. *Vet Res Commun.* 2010 Mar;34(3):301-6.
15. Reis JL, Jr., de Carvalho EC, Nogueira RH, Lemos LS, Mendoza L. Disseminated pythiosis in three horses. *Vet Microbiol.* 2003 Oct 30;96(3):289-95.
16. Rivierre C, Laprie C, Guiard-Marigny O, Bergeaud P, Berthelemy M, Guillot J. Pythiosis in Africa. *Emerging Infectious Diseases.* 2005 Mar;11(3):479-81.
17. Rakich PM, Grooters AM, Tang KN. Gastrointestinal pythiosis in two cats. *J Vet Diagn Invest.* 2005 May;17(3):262-9.
18. Krajaeun T, Imkhieo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Apr;16(4):506-9.
19. Chareonsirisuthigul T, Khositnithikul R, Intaramat A, Inkomlue R, Sriwanichrak K, Piromsontikorn S, et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 May;76(1):42-5.
20. Grooters AM, Leise BS, Lopez MK, Gee MK, O'Reilly KL. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. *J Vet Intern Med.* 2002 Mar-Apr;16(2):142-6.

21. Krajaeun T, Kunakorn M, Niemhom S, Chongtrakool P, Prachartam R. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):378-82.
22. Lew AM, Beck DJ, Thomas LM. Recombinant fusion proteins of protein A and protein G with glutathione S-transferase as reporter molecules. *J Immunol Methods*. 1991 Feb 15;136(2):211-9.
23. Schaefer JJ, White HA, Schaaf SL, Mohammed HO, Wade SE. Chimeric protein A/G conjugate for detection of anti-Toxoplasma gondii immunoglobulin G in multiple animal species. *J Vet Diagn Invest*. 2012 May;24(3):572-5.
24. Sathapatayavongs B, Leelachaikul P, Prachartam R, Atichartakarn V, Sriphojanart S, Trairatvorakul P, et al. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J Infect Dis*. 1989 Feb;159(2):274-80.
25. Vento S, Cainelli F, Cesario F. Infections and thalassaemia. *Lancet Infect Dis*. 2006 Apr;6(4):226-33.
26. Vanittanakom N, Supabandhu J, Khamwan C, Praparattanapan J, Thirach S, Prasertwitayakij N, et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. *J Clin Microbiol*. 2004 Sep;42(9):3970-4.
27. Mosbah E, Karrouf GIA, Younis EA, Saad HS, Ahdy A, Zaghloul AE. Diagnosis and Surgical Management of Pythiosis in Draft Horses: Report of 33 Cases in Egypt. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012;32(3):164-9.
28. Mendoza L, Kaufman L, Standard PG. Immunodiffusion test for diagnosing and monitoring pythiosis in horses. *J Clin Microbiol*. 1986 May;23(5):813-6.
29. Prachartam R, Changtrakool P, Sathapatayavongs B, Jayanetra P, Ajello L. Immunodiffusion test for diagnosis and monitoring of human pythiosis insidiosi. *J Clin Microbiol*. 1991 Nov;29(11):2661-2.
30. Jindayok T, Piromsontikorn S, Srimuang S, Khupulsup K, Krajaeun T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Jul;16(7):1047-51.
31. Chindamporn A, Vilela R, Hoag KA, Mendoza L. Antibodies in the sera of host species with pythiosis recognize a variety of unique immunogens in geographically divergent *Pythium insidiosum* strains. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Mar;16(3):330-6.
32. Supabandhu J, Fisher MC, Mendoza L, Vanittanakom N. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. *Med Mycol*. 2008 Feb;46(1):41-52.
33. Ahmad I, Owais M, Shahid M, Aqil F, Blanco JL, Garcia ME. Animal as Reservoir of Fungal Diseases (Zoonoses?). *Combating Fungal Infections: Springer Berlin Heidelberg*; 2010. p. 47-70.
34. Krajaeun T, Kunakorn M, Prachartam R, Chongtrakool P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, et al. Identification of a novel 74-kiloDalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1674-80.
35. Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Alves SH, Lubeck I, Griebeler J, et al. Indirect ELISA for the serodiagnostic of pythiosis. *Pesquisa Vet Brasil*. 2006 Jan-Mar;26(1):47-50.