

ชื่อเรื่องโครงการวิจัย	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนของเชื้อรา เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ
ผู้ทำการวิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย เศษตรีรัตน์ * อาจารย์สาคร พรประเสริฐ** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาลย์ อภิชาติปิยะกุล***
หน่วยงานที่สังกัด	*ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-945080 ต่อ 18, โทรสาร 053-905080 ต่อ 19 ** ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-945066 *** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-945335

ได้ทำการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อแอนติเจนที่หลังจากเชื้อ เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ เพื่อใช้พัฒนาวิธีตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อเพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ ทำการเตรียมแอนติเจนที่หลังจากเชื้อ เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ และทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้น จากอาหารเหลวเบรน ฮาร์ท อินฟิวชัน ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราที่นาน 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้ฉีดกระตุ้นหนูถีบจักรพันธุ์ BALB/c ทำการเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดีแอนติเจนของเชื้อเพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ จากเซลล์ม้ามของหนูโดยใช้เทคนิคไฮบริโดมามาตรฐาน และศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่เตรียมได้กับแอนติเจนของเชื้อ เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ แคนดิดา อัลบิแคน คริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน และฮิสโตพลาสมา แคปซูลาตัมโดยวิธี indirect ELISA จากเซลล์ลูกผสมที่เจริญ 46 โคลน มีเพียง 3 โคลนที่สร้างแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อเพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอ แต่เซลล์ลูกผสม 1 โคลน (2C5) สร้างแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคน ด้วย เซลล์ลูกผสมอีก 2 โคลน (1F1, 3G4) ทำการเจือจางให้เป็นเซลล์เดี่ยว 2 รอบและเพาะเลี้ยงให้สร้างแอนติบอดีต่อไป นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่เตรียมให้บริสุทธิ์เบื้องต้น และโปรตีนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้จากซีรัมกระต่าย และมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่หลังจากเชื้อ เพนนิซิลเลียม มาเนฟฟิไอนี้ มาพัฒนาชุดตรวจวิธี Double antibody sandwich ELISA เพื่อตรวจ *P. marneffei* antigen ในพลาสมาหรือซีรัมของผู้ป่วยโรค penicillosis marneffei จำนวน 7 ราย และกลุ่มควบคุมจากคนที่มีความแข็งแรงจำนวน 5 ราย พบว่าชุด sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาโดยมีโมโนโคลนอล แอนติบอดี เป็น capture antibody และมี โปรตีนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้จากซีรัมกระต่าย เป็น detector พบว่าสามารถตรวจพบ *P. marneffei* antigenemia ในตัวอย่างพลาสมาหรือซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรค penicillosis marneffei ทุกราย แต่ตรวจไม่พบในกลุ่มควบคุม โมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่เตรียมได้จากการทดลองครั้งนี้ พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ *P. marneffei* และวิธี Double antibody sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี และโปรตีนโคลนอล แอนติบอดี ต่อ *P. marneffei* antigen นำไปใช้วินิจฉัยโรค penicillosis marneffei ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Research Title Production of Monoclonal Antibody against *Penicillium marneffeii* antigen  
Researcher Sakchai Dettrairat,\* Sakorn Pornprasert,\*\* Chatchawan Apichartpiyakul \*\*\*  
Affiliation \* Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, \*\* Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, \*\*\* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

---

Monoclonal antibody against *P. marneffeii* secreted antigen was produced for developing serological test for penicillosis marneffeii. *P. marneffeii* secreted antigen was prepared and partially purified from culture supernatant of 4-day old *P. marneffeii* culture in brain heart infusion broth at 37 degrees C and used to immunize BALB/c mouse. Mouse monoclonal antibody against *P. marneffeii* was produced from immune spleen cells by standard hybridoma technique. Specificity of the produced monoclonal antibody was assessed with secreted antigens of *P. marneffeii*, *C. albicans*, *C. neoformans* and *Histoplasma capsulatum* by an indirect ELISA. Of 46 hybrid clones, 3 clones were positively reacted with *P. marneffeii* secreted antigen. However, one hybrid clone (2C5) showed cross reactivity with *C. albicans* antigen. Other 2 hybrid clones (1F1, 3G4) were cloned by 2 round limiting dilution. Partial purified monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibody against *P. marneffeii* secreted antigen were used to develop double antibody sandwich ELISA to detect *P. marneffeii* antigen in plasma or serum samples of 7 patients with penicillosis marneffeii and 5 healthy controls. The developed sandwich ELISA, using monoclonal antibody as capture antibody and rabbit polyclonal antibody as detector, could detect *P. marneffeii* antigenemia in all plasma and serum samples of the patients with penicillosis marneffeii with but none of healthy controls. The monoclonal antibody produced in this study, appeared to be highly specific to *P. marneffeii*. The double antibody sandwich ELISA developed with monoclonal and polyclonal antibodies against *P. marneffeii* antigen, showed highly potential for diagnosis of penicillosis marneffeii.