การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* แบบรวดเร็ว โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี ชนิด 18B7

Rapid Diagnosis of *Cryptococcus neoformans* Infection by Using Specific Monoclonal Antibody 18B7

ปกรณ์สวิส สระทองเดชวิสิฐ[1] ขจรศักดิ์ ตระกูลพัว[2] กวี รัตนบรรณางกูล[3] และ สิริดา ยังฉิม[1*]

Pakornswit Sathongdejwisit[1] Khajornsak Tragoolnpua[2] Kavi Ratanabanangkoon[3] and Sirida Youngchim[1*]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

[2]แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

[3]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

[1]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

[2]Deparment of Micobiology, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University, Thailand

[3]Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

[*]Corresponding author, E-mail: syoungchim@gmail.com

บทคัดย่อ

Cryptococcus neoformans เป็นเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสที่สำคัญในทางการแพทย์ที่ติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV และสามารถติดเชื้อที่ระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (cryptococcal meningitis) ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่รุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคติดเชื้อราชนิดนี้ มีการใช้ชุดตรวจที่นำเข้าจากต่างประเทศมาใช้ในการตรวจหาแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ*C. neoformans* ซึ่งมีทั้งความไว (sensitivity) และความจำเพาะ(specificity) ต่อแคปซูลแอนติเจนที่สูง แต่ยังคงมีราคาที่แพงเกินไป ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นในการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยแบบรวดเร็ว ทั้งชุดตรวจแบบลาเท็กซ์แอคกลูติเนชั่น (latex agglutination, LAT) และชุดตรวจแบบแถบสี (lateral flow immunoassay, LFIA) เพื่อตรวจหาแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 18B7 (Monoclonal Antibody, MAb 18B7) ที่มีความจำเพาะต่อแคปซูลแอนติเจนของเชื้อราชนิดนี้ ซึ่งผลจากการพัฒนา ชุดตรวจ LAT และ LFIA โดยใช้ MAb 18B7 นั้น เมื่อนำมาทดสอบกับแคปซูลแอนติเจน พบว่ามีค่าขีดจำกัดการตรวจหา (limit of detection) อยู่ที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยชุดตรวจ MAb 18B7 LFIA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวที่ใกล้เคียงกับชุดตรวจที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ในทางตรงกันข้ามชุดตรวจแบบลาเท็กซ์แอคกลูติเนชั่น (LAT) มีค่าความไวที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับชุดตรวจที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้น ชุดตรวจนี้ต้องมีการพัฒนาให้มีความไวที่สูงขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: *คริปโตคอคคัสนีโอเฟอร์มานส์, ลาเท็กซ์แอคกลูติเนชั่น,ชุดตรวจแถบสี, โมโนโคลนอลแอนติบอดี 18 บี7*

Abstract

Cryptococcus neoformans is an important opportunistic fungal pathogen which can causes infection in immunocompromised patients, especially HIV patients. The most common infection site is the central nervous system (CNS) which causes cryptococcal meningitis with a high mortality rate. For diagnosis for this disease, standard rapid diagnostic kits are always applied to detect capsular polysaccharide antigen of *C. neoformans*; however, the prices of these commercial kits are very expensive. Therefore, the aim of this research was to study and develop rapid diagnostic assays of latex agglutination (LAT) and lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of capsular antigen of *C. neoformans* by applying monoclonal antibody (MAb) 18B7. The MAb18B7 was only specific to capsular antigen of *C. neoformans*. The results revealed that the limit of detections (LOD) of LAT and LFIA were 1 µg/ml and 0.05 µg/ml, respectively. The sensitivity of MAb 18B7 LFIA was similar to the commercial diagnosis of LFIA. In contrast, the sensitivity of 18B7 LAT was much lower than the commercial diagnosis of LAT and needed to be further improved.

Keywords: *Cryptococcus neoformans, latex agglutination, lateral flow assay, Monoclonal Antibody 18B7*

1.บทนำ

Cryptococcus neoformans เป็นเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสที่ติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ซึ่งสามารถนำไปสู่การติดเชื้อ cryptococcal meningitis ได้ โดยอุบัติการณ์ของโรค cryptococcosis เพิ่มขึ้นในช่วงของการระบาดของโรคติดเชื้อ HIV ซึ่งเฉพาะในทวีปแอฟริกาที่เดียว cryptococcosis เป็นโรคอันดับสี่ที่เป็นสาเหตุของการตายในผู้ป่วยโรค AIDs มากกว่าเชื้อวัณโรค (Park et al., 2009) และถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนายาต้านไวรัส HIV ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการรักษา แต่ด้วยปัญหาในการเข้าถึงยาต้านไวรัส สำหรับประเทศที่กำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทย ทำให้อุบัติการณ์ของโรค cryptococcosis ยังคงมีอุบัติการณ์ที่สูงอยู่ (Chayakulkeeree et al., 2017)

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อราชนิดนี้ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม เช่น การย้อมด้วย India ink หรือ การเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 วิธีนี้มีความไวที่ไม่สูงมาก และบางวิธีอาจใช้เวลานานในการตรวจหาเชื้อ จึงมีการพัฒนาชุดตรวจที่มีความไวและความจำเพาะสูง สะดวกและรวดเร็วในการวินิจฉัย ซึ่งในปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นิยมใช้ชุดตรวจสองชุด คือ Cryptococcal antigen latex agglutination system (CALAS®) ของบริษัท Meridien Bioscience และ Cryptococcal antigen lateral flow assay (CrAg® LFA) ของบริษัท IMMY ทั้งสองชุดตรวจนี้ ใช้หลักการ antigen-antibody complex ในการตรวจหาแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* โดยมีโครงสร้างเป็น repeating polysaccharide ที่มีโครงสร้างหลักเป็น gluculonoxylomannan (GXM) ซึ่งมีประมาณ 90-95% ของโครงสร้างแคปซูลทั้งหมด (Cherniak et al., 1988) และมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่มาก โดยมีขนาดประมาณ 1-7,000 kDa (Kuma et al., 2011)

ชุดตรวจมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค cryptococcosis มีหลักการที่แตกต่างกัน ชุดตรวจมาตรฐาน CALAS®เป็นชุดตรวจแบบ reverse passive LAT ซึ่งจะใช้เทคนิคในการตรึงแอนติบอดีลงไปบนเม็ด latex beads เพื่อใช้ในการตรวจหาแคปซูลแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยผลทดสอบที่ได้ผลบวก จะแสดงให้เห็นเป็นตะกอน

ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ส่วนชุดตรวจ CrAg®LFA เป็นชุดตรวจรูปแบบใหม่ ที่เริ่มนิยมนำมาใช้ในการตรวจหาแคปซูลแอนติเจนที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยใช้เทคนิค double antibody sandwich เพื่อจับ Ag-Ab complex และทำให้ gold nanoparticles แสดงสัญญาณได้เป็นขีดสีที่ตำแหน่ง test line ดังนั้น ผลทดสอบของ CrAg®LFA ที่ได้ผลบวกจะแสดงให้เห็นเป็น 2 ขีด บนตำแหน่ง test line และ control line บนแผ่น membrane ของ LFIA

CALAS® และ CrAg®LFA เป็นชุดตรวจที่ผ่านการพิจารณาจาก Food and drug administration (FDA) ให้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรค cryptococcosis แทนวิธีแบบเก่า เพราะมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำ และมีความจำเพาะที่มากกว่า อย่างไรก็ตาม แม้ชุดตรวจจะมีประสิทธิภาพที่ดี แต่ในประเทศไทยยังมีราคาสูง ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้ต้องการพัฒนาชุดตรวจชนิดรวดเร็วเพื่อตรวจหาแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* โดยใช้ Monoclonal Antibody (MAb) 18B7 ที่จำเพาะต่อส่วนของแคปซูลนำมาพัฒนาชุดตรวจชนิด reverse passive latex agglutination assay และ lateral flow immunoassay โดยคาดว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้จะสามารถทดแทนชุดตรวจที่มีราคาสูงได้เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยได้

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยต่อแคปซูลแอนติเจนของเชื้อรา *C. neoformans* โดยวิธี reverse passive latex agglutination assay และ วิธี lateral-flow immunoassay (LFIA)

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมและการสกัดแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* และเชื้อราก่อโรคอื่นๆ

การสกัดและการเพิ่มความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจนของเชื้อยีสต์ *C. neoformans* ใช้วิธี ultrafiltration ด้วย Viva cell®250 ซึ่งมีค่า cut off เท่ากับ 100 kDa เพื่อสกัดและเพิ่มความเข้มข้นส่วนประกอบของแคปซูลอย่าง GXM โดยใช้แก๊สไนโตรเจนในการช่วยผลักดันให้ supernatant ผ่านกระดาษกรองลงไปเร็วขึ้น เป็นการประยุกต์จากวิธีของ Nimrichter และคณะที่คิดค้นในปี 2007 ขั้นตอนเริ่มต้นจากการเพาะเชื้อ *C. neoformans* ที่เลี้ยงใน minimal medium เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 30^{o}C จากนั้นปั่นแยกและนำ supernatant ออกมาใส่ลงไปใน concentrator ของ Viva cell®250 ปล่อยแก๊สไนโตรเจนในความดันที่เหมาะสมเพื่อผลัก supernatant ให้ผ่านViva cell®250 โดยใช้เวลาประมาณ 2.5-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแคปซูลของเชื้อ ที่มีลักษณะเป็นเจลมาเก็บไว้ในหลอดทดลอง ละลายเจลโดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ เป็น diluent แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของแคปซูล ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm. มีน้ำตาล D-glucose เป็นสารมาตรฐาน (standard solution)

3.2 การเตรียม MAb 18B7

3.2.1 การเพาะเลี้ยงและการสกัด MAb 18B7

นำ clone MAb 18B7(ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Joshua D. Nosanchuk, Albert Einstein College of Medicine, New York) ซึ่งเป็น hybridoma cells ที่ผลิต antibody ต่อแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ชนิด IgG_1นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร serum free medium (SFM) หลังจากนั้นนำ supernatant มาทำให้เข้มข้น โดยใช้ Viva spin (GE Healthcare Life Science™) ที่มีแผ่นกรองที่ค่า cut off เท่ากับ 30 kDa หลังจากนั้นนำ supernatant มาสกัด

แอนติบอดีต่อแคปซูลแอนติเจน (MAb 18B7) โดยใช้ affinity protein G column (GE Healthcare Life Science™) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยการทำ SDS-PAGE และ western blot แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm

3.2.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติของ MAb 18B7 ด้วยวิธี SDS-PAGEและวิธี western blot

SDS-PAGE เป็นวิธีแยกขนาดของโปรตีนต่างๆ หากแอนติบอดีที่สกัดได้ เป็น IgG ที่บริสุทธิ์ จะพบ แบนของโปรตีนที่มีขนาดและจำนวนเท่ากับ positive control ซึ่งเป็นmouse IgG เช่นเดียวกันหลังจากนั้นทำ western blot โดยการใช้ horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Jackson, West Grove, Pa)ที่ความเจือจาง 1:5,000 โดยใช้ 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) เป็น substrate ผลที่ได้จะเกิดแบนของโปรตีนที่มีขนาดและจำนวนเท่ากับ positive control ซึ่งเป็น mouse IgG เช่นเดียวกัน

3.2.3 การทดสอบ immunoreactivity และ การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยวิธี indirect ELISA

การทดสอบแบบ indirect ELISA ครั้งนี้ เป็นวิธีการในการเจือจางความเข้มข้นของ MAb18B7 และแอนติเจนเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่ทำให้ปฏิกิริยาการจับกันดีที่สุด โดยค่า maximal OD เท่ากับ1-1.5 หลักการของวิธีนี้จะเป็นการ coat 96-well plate ด้วยแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 160, 80, 40,20 10, 5 และ 0 ng/ml ลงไปก่อน บ่มทิ้งไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C จากนั้นจะทำการblock non-specific binding ด้วยการเติม 2.5% BSA แล้วเติม MAb 18B7 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 15, 7.5 และ 3.25 ng/ml จากนั้นตรวจสอบการเกิด Ag-Ab complex ด้วยการเติม HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Jackson, West Grove, Pa) ซึ่งใช้ TMB เป็น substrate แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ก่อนจะหยุดปฏิกิริยาด้วย 2M H_2SO_4 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 450/570 nm

3.3 การพัฒนาชุดตรวจ Latex agglutination assay

3.3.1 การ sensitization ของ MAb 18B7 กับ latex beads ด้วยวิธี passive physical adsorption

ในขั้นต้นได้ทำการ sensitization เม็ด latex beads ให้มีการจับกันระหว่างแอนติบอดี 18B7 และเม็ด latex beads โดยการทดลองครั้งนี้ ใช้แบบ passive adsorption โดยมีขั้นตอนที่ประยุกต์มาจาก dos Santos และคณะ(2015) มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นด้วยการล้าง latex beads ด้วย MES buffer (ethane sulfonic acid) pH 6.1 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 10 นาทีจำนวน 3 ครั้ง จากนั้น suspend ใน buffer ปริมาตร 200 µl แล้วเติม MAb 18B7 โดยปรับให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 mg/ml แล้วผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4^{o}C นาน 24 ชั่วโมง โดยเขย่าให้สารเข้ากันตลอดเวลาอย่างเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 10 นาที ก่อนนำไป suspend ใน buffer ที่ผสม 1% BSA ลงไป เพื่อทำหน้าที่ในการ block non-specific binding แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ แบบต่อเนื่อง จากนั้นล้างด้วย buffer แล้วจึง suspend ด้วย storage buffer (ซึ่งประกอบไปด้วย 50 mM MES buffer, 1% BSA, 0.1% NaN3 และ 5% glycerol) ก่อนนำไปเก็บไว้ที่ 4^{o}C

3.3.2 การทดสอบ sensitivity ของ sensitized MAb 18B7 latex beads

เป็นการหาขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ของ sensitized latex beads เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ MAb 18B7 ที่ sensitized latex beads แล้วทำปฏิกิริยากับแคปซูลแอนติเจน (GXM) ของเชื้อ *C.*

neoformans จนเกิด lattice formation เป็นตะกอนที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ขั้นตอนแรก ทำการเจือจาง sensitized MAb 18B7 latex beads (ขั้นตอน 3.3.1) ที่1:10 กับ PBS และเจือจางความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจนด้วย PBS buffer ที่ความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 5, 2.5, 1, 0.5 และ 0.1 μg/ml ตามลำดับ จากนั้นผสมให้เข้ากัน ด้วย vortex นาน 10 วินาที ทำการหยดสารละลายทั้งสองด้วยปริมาตรอย่างละ 10 μl ลงบนสไลด์ เกลี่ยผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที สังเกตผลการเกิดตะกอนด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4 การพัฒนาชุดตรวจ Lateral flow immunoassay (LFIA)

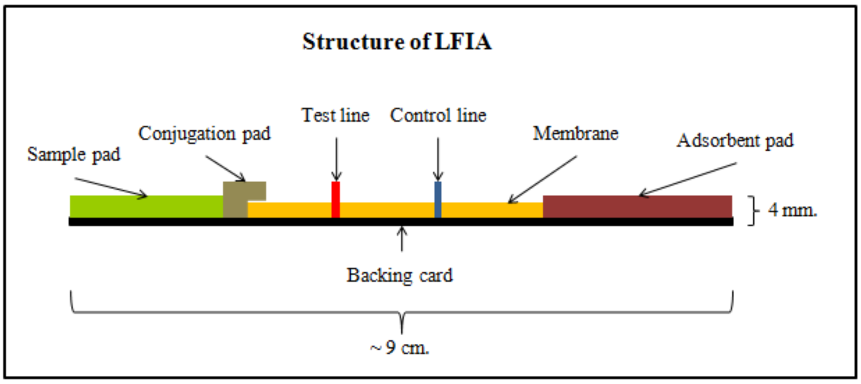
3.4.1 การเตรียม MAb 18B7-colloidal gold conjugate

การติดฉลาก MAb 18B7 ด้วย colloidal gold เริ่มต้นด้วยการปรับ pH ของสารละลาย colloidal gold ให้ได้ถึง pH 11 โดยใช้ sodium carbonate จากนั้นเติม MAb 18B7 ที่มีความเข้มข้น10 μg/ml มาผสมกับ สารละลาย colloidal gold บ่มส่วนผสมนี้ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติม 10%NaCl แล้วหาความเข้มข้น MAb 18B7 ที่เหมาะสมที่สุดในการติดฉลากกับ colloidal gold โดยเลือก MAb 18B7 ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถติดฉลากกับ colloidal gold ได้ โดยไม่เกิด flocculation หรือ การเกาะกลุ่มของ colloidal gold ด้วยกันเอง จากนั้นนำส่วนผสม MAb 18B7 conjugated colloidal gold ไปบ่มกับ 5% casein ใน 20 mM sodium phosphate (blocking buffer) แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงและดูดเอาส่วน supernatant ออกไป จากนั้นเติม 20% sucrose เพื่อทำหน้าที่เป็น molecular pocket จากนั้นจึงหยดลงบน conjugation releasing pad ก่อนนำไปบ่มที่ตู้ดูดความชื้นนาน 24 ชั่วโมง (Intaramat 2006)

3.4.2 การเตรียม membrane และการประกอบชุด LFIA

Membrane เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ LFA ที่มีทั้ง test line และ control line ขั้นตอนเริ่มต้นด้วยการหยด *Galanthus nivalis* (GNA) ที่เข้มข้น 0.5 mg/ml ลงไปใน test line 0.5 μl และหยด rabbit anti-mouse IgG ที่เข้มข้น 0.5 mg/ml ลงไปใน control line 0.5 μl จากนั้น นำไปจุ่มใน blocking buffer เพื่อป้องกันการเกิด unspecific binding แล้วนำเข้าตู้ดูดความชื้น การใช้ GNA เป็น test line เพราะ GNA เป็นโปรตีน lectin ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับ แอลฟา 1-3 mannose residue ซึ่งเป็นพันธะที่มีอยู่ในโครงสร้างของแคปซูลแอนติเจน ทำให้ GNA สามารถจับได้กับ Ag-Ab complex และแสดงสัญญาณได้

การประกอบชุด LFIA แสดงในรูปที่ 1 ดังนี้



รูปที่ 1 ส่วนประกอบของLateral flow immunoassay (LFIA)

3.4.3 การทดสอบ lateral flow immunoassay (LFIA)

การทดสอบชุดตรวจ LFIA เริ่มต้นด้วยการนำชุดทดสอบจุ่มลงในแคปซูลแอนติเจนในความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.005-5.0μg/ml ที่ละลายใน PBS ในปริมาณ 100 μl แล้วบ่มไว้นาน 30 นาที จากนั้นอ่านผล โดยผลบวกจะต้องปรากฏแถบสีทั้งหมด 2 แถบ ทั้ง test line และ control line ส่วนผลลบจะปรากฏแถบสีเพียงที่เดียวเท่านั้นเฉพาะส่วนของ control line

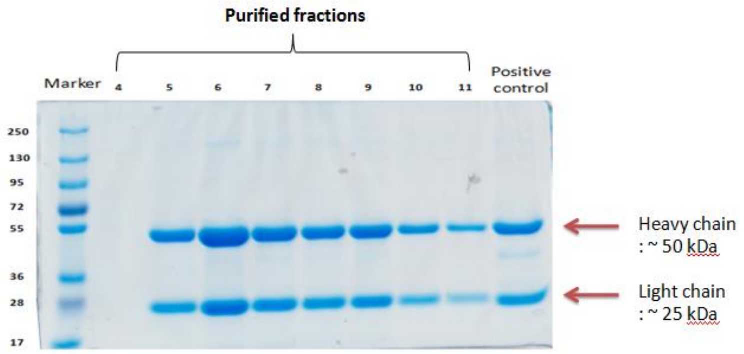
4. ผลการวิจัย

4.1การสกัดแคปซูลแอนติเจน

แคปซูลแอนติเจนที่สกัดได้ของเชื้อ *C. neoformans* มีความเข้มข้น 3 mg/mlจากการวัดความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method โดยมีน้ำตาล D-glucose เป็นสารมาตรฐาน

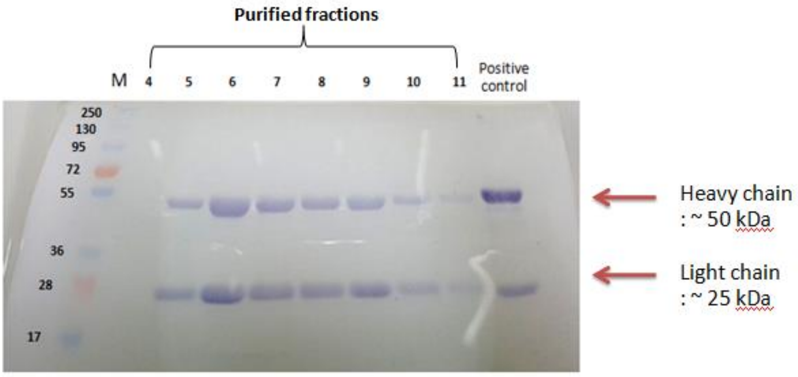
4.2การตรวจสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติของ MAb 18B7

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ MAb 18B7 เป็นการนำ fractions ต่างๆที่ elute มาจาก affinity column protein G มาทำ SDS-PAGE พบว่า fractions ที่ 5-11 พบขนาดโปรตีนที่ใกล้เคียงกับ light chain และ heavy chain ของ IgG ที่มีขนาดประมาณ 25 และ 50 kDa ตามลำดับ ซึ่งขนาดของ light chain และ heavy chain ของแอนติบอดีพบว่ามีขนาดที่เท่ากับ positive control ซึ่งเป็น mouse IgG ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่า โปรตีนที่สกัดมาได้นี้มีความบริสุทธิ์และเป็นแอนติบอดีที่มีขนาดเท่ากับ IgG (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ MAb 18B7 ด้วยวิธี SDS-PAGE ของแต่ละ fractions ที่ผ่าน affinity protein G โดยในรูปจะมี protein marker อยู่ที่เลนซ้ายสุดถัดมาจะเป็น fractions ตั้งแต่ 4-11 ที่ผ่านการสกัดมาแล้ว และสุดท้ายจะมี positive control ซึ่งเป็น mouse IgG อยู่เลนด้านขวาสุด

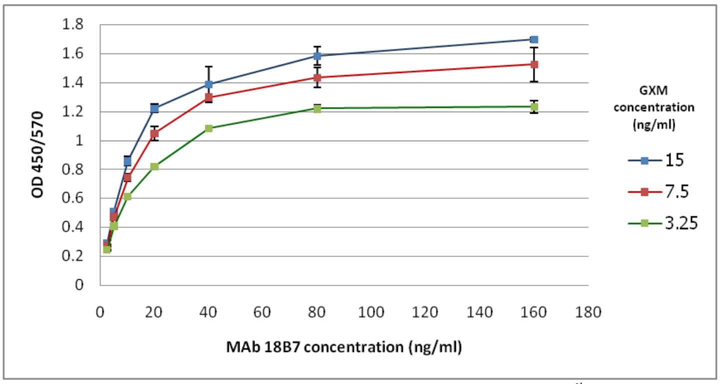
การตรวจสอบคุณสมบัติของ MAb 18B7 เป็นการนำ fractions ต่างๆที่ elute มาจาก affinity column protein G มาทำ western blot พบว่า fractions ที่ 5-11 พบ protein bands ที่มีขนาดโปรตีนที่ใกล้เคียงกับ light chain และ heavy chain เหมือนในผล polyacrylamide gel ที่ทำ SDS-PAGE ซึ่งขนาดของ light chain และ heavy chain ของแอนติบอดีก็มีขนาดที่เท่ากับ positive control ซึ่งเป็น mouse IgG เช่นเดียวกัน ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่สกัดมาเป็นแอนติบอดีชนิด IgG (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ MAb 18B7 ด้วยวิธี western blot บนแผ่น nitrocellulose ของแต่ละ fractions ที่ผ่าน affinity protein G โดยในรูปจะมี protein marker อยู่ที่เลนซ้ายสุดถัดมาจะเป็น fractions ตั้งแต่ 4-11 ที่ผ่านการสกัดมาแล้ว และสุดท้ายจะมี positive control ซึ่งเป็น mouse IgG อยู่เลนด้านขวาสุด

4.3 การทดสอบ immunoreactivity และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยวิธี indirect ELISA

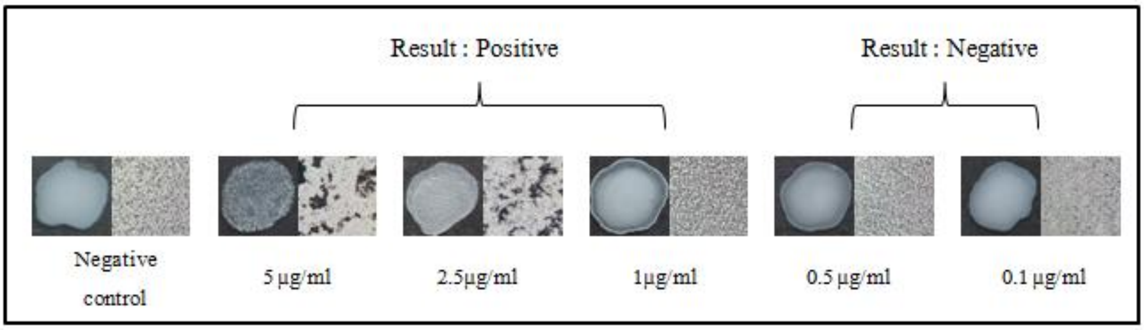
ผลของ Indirect ELISA ระหว่าง MAb 18B7 กับ แคปซูลแอนติเจน (GXM) ของเชื้อ *C. neoformans* ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงให้เห็นว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ MAb 18B7 ตั้งแต่ 2.5–40 ng/ml กราฟแสดงลักษณะ exponential phase และเริ่มมีแนวโน้มเข้าสู่ stationary phase ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 40 ng/ml เป็นต้นไป ส่วนปริมาณแคปซูลแอนติเจนทั้งสามความเข้มข้น (3.25, 7.5 และ 15 ng/ml) มีแนวโน้มของเส้นกราฟเป็นไปในลักษณะเดียวกัน แต่ต่างกันที่ค่า OD ที่มากขึ้นหรือน้อยลง ที่แปรผันตามความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจนสังเกตว่า ความเข้มข้นของ MAb ที่ 20 ng/ml ก็สามารถให้ค่า OD ที่สูงกว่า 1 ทั้งในความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจนที่ 15 และ 7.5 ng/ml ตามลำดับ ยกเว้นความเข้มข้นที่ 3.25 ng/ml (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงผลของ indirect ELISA ระหว่าง MAb 18B7 กับแคปซูลแอนติเจน (GXM) ของเชื้อ *C. neoformans* โดยในรูป MAb 18B7 ที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้นตั้งแต่ 15, 7.5 และ 3.25 ng/ml และความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจนมีตั้งแต่ 160, 80 40, 20 10, 5 และ 0 ng/ml ตามลำดับ

4.4การหา sensitivity ของ sensitized MAb18B7 latex beads ต่อแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans*

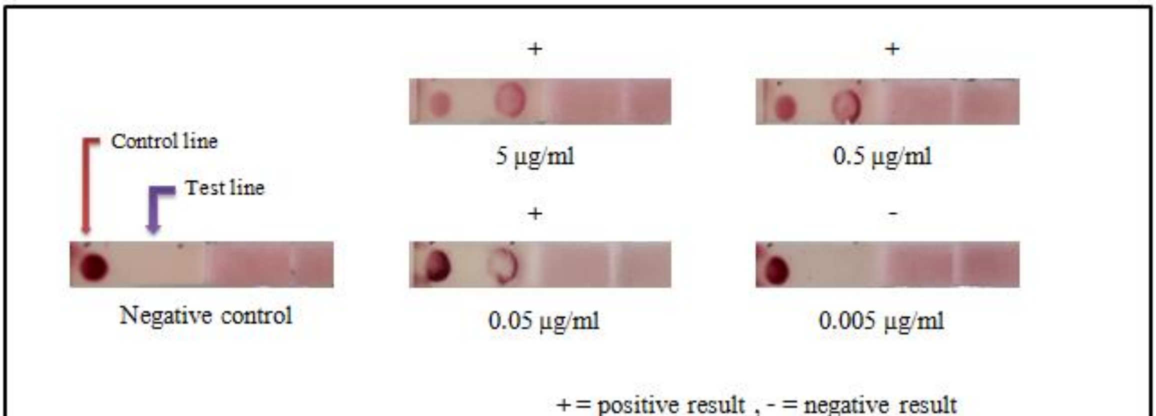
ผลจากการทำ Latex agglutination ระหว่าง sensitized MAb18B7 latex beads กับแคปซูลแอนติเจน พบว่า ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 5, 2.5 และ 1 µg/ml เกิดตะกอน (clamps) ที่สามารถสังเกตด้วยตาเปล่าได้ และผลก็สอดคล้องกับภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในขณะที่ความเข้มข้นของแคปซูลที่ 0.5 และ 0.1 µg/ml ไม่พบตะกอน โดยสารละลายมีลักษณะที่เป็น homogenized และทั้งสองความเข้มข้นมีลักษณะที่คล้ายกับ negative control ทั้งที่อยู่บนสไลด์และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้น ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ของการทดลองนี้จึงอยู่ที่ 1 µg/ml (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผล agglutination ของ sensitized MAb 18B7 latex beads ที่อัตราส่วน1/10 ต่อความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจน (GXM) ตั้งแต่ 0.1–5 µg/mlโดยภาพแต่ละชุดจะประกอบด้วยชุดภาพของ latex beads ที่อยู่บนสไลด์ (ด้านซ้าย) และlatex beads ที่อยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x

4.5 การหา sensitivity ของ MAb 18B7 LFA ต่อแคปซูลแอนติเจน

ผลจากการทดสอบ MAb 18B7 LFA ต่อแคปซูลแอนติเจนหรือ GXM พบว่า ตั้งแต่ความเข้มข้น 5, 0.5 และ 0.05 µg/ml สามารถอ่านผลได้เป็นผลบวก โดยผลบวกพบการเกิดจุดสีแดงขึ้นทั้ง control line และ test line แต่เมื่อความเข้มข้นของแคปซูลเท่ากับ 0.005 µg/ml พบว่าเกิดผลลบ โดยพบจุดสีแดงเพียง control line เท่านั้นดังนั้น ค่า LOD ของชุดทดสอบนี้เท่ากับ 0.05 µg/ml (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงผลการทดสอบ MAb 18B7 LFIA test กับแคปซูลแอนติเจน (GXM) ของเชื้อ *C. neoformans* ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005 – 5 µg/ml และแสดงผลของการทดสอบของ negative control (+ ผลบวก และ- ผลลบ)

5. การอภิปรายผล

5.1 การเตรียมแคปซูลแอนติเจน และการสกัด MAb 18B7 ประสบผลสำเร็จ และมี immunoreactivity ที่ดี จากผลของ indirect ELISA

5.2 การพัฒนาชุดตรวจทั้ง sensitized MAb 18B7 latex beads และ MAb 18B7 LFIA ประสบผลสำเร็จ โดยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นอย่างMAb 18B7 LFIA มีค่า LOD ที่ต่ำกว่า sensitized MAb 18B7 latex beads อยู่ประมาณ 20 เท่า

5.3 ความเข้มข้นของแคปซูลที่ 0.5 µg/ml ในการทดสอบชุดตรวจ latex agglutination พบว่า บนสไลด์ไม่สามารถสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า แต่เมื่อตรวจสอบภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะที่มีกลุ่มตะกอนขนาดเล็ก บ่งชี้ว่า เกิด antigen-antibody complex ขึ้น แต่มีขนาดที่ไม่ใหญ่พอให้สังเกตด้วยตาเปล่าได้ จึงได้ผลลบจากการทดสอบ

5.4 ค่า LOD ของ MAb 18B7 LFIA มีค่าที่สูงกว่าชุดตรวจมาตรฐานที่เป็น LFIAอย่าง CrAg® (IMMY) ที่มีค่า LOD เท่ากับ 0.001µg/ml แต่ชุด sensitized MAb18B7 latex beads มีค่า LOD ที่สูงกว่าชุด latex agglutination อย่าง CALAS® (Meridien Bioscience) ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 0.005 µg/ml ตามลำดับ (Gates-Hollingsworth et al., 2013, Temstet et al., 1992) ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันมากและต้องมีการพัฒนาวิธี latex agglutination ต่อไป

5.5 ชุดตรวจมาตรฐาน CALAS® กับชุด sensitized MAb18B7 latex beads เป็นชุดตรวจ latex agglutination แบบ reverse passive เหมือนกันแต่มีชนิดแอนติบอดีที่ไม่เหมือนกัน โดนแอนติบอดีที่ถูกตรึงไว้ของ CALAS® เป็นแบบ polyclonal antibodies ส่วนชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ เป็นแบบ monoclonal antibody ดังนั้น ความไวของชุดตรวจ CALAS® จึงมีมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ไม่ว่าชุดตรวจจะใช้เทคนิคการตรึงด้วย polyclonal antibodies หรือ monoclonal antibody ก็มีช่วงของความไวและความจำเพาะที่ไม่แตกต่างกันอย่างใด (Kiska et al., 1994)

5.6 ชุดตรวจมาตรฐาน อย่าง CrAg®LFA (IMMY) กับชุดตรวจ MAb 18B7 LFIA เป็นชุดตรวจที่ใช้ monoclonal antibody แต่มีความต่างกัน โดยชุดตรวจมาตรฐานจะใช้ MAb ทั้งหมด 2 ชนิด ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมาในครั้งนี้ ใช้ MAb เพียงชนิดเดียว คือ MAb 18B7 โดยชุดตรวจมาตรฐาน CrAg®LFA จะใช้ MAb ที่จำเพาะต่อแคปซูลแอนติเจนตรึงบน test line ของแผ่น membrane และที่เม็ด colloidal gold ก็ตรึงด้วย MAb อีกชนิดหนึ่ง ในขณะที่ ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น จะมี GNA ซึ่งเป็น lectin protein (carbohydrate binding protein) ถูกตรึงอยู่ที่ test line แต่เม็ด colloidal gold จะถูกตรึงด้วย MAb 18B7 ผู้วิจัยเห็นว่า ค่า LOD ของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น ไม่ได้แตกต่างจากชุดตรวจมาตรฐาน CrAg® (IMMY) มาก นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้ lectin protein เพื่อพัฒนาชุดตรวจ LFIA ที่ตรวจหา asialo a1- acid glycoprotein (AsAGP) ที่เป็น diagnostic marker สำหรับโรค liver cirrhosis (LC) หรือ hepatocellular carcinoma (HCC) ผลการพัฒนา พบว่า ชุดตรวจ LFIA ให้ผลที่สอดคล้องกลับผล sandwich ELISA ระบุได้ว่า ชุดตรวจมีประสิทธิภาพในการตรวจหาแอนติเจนได้ดี (Lee et al., 2006) ดังนั้น การใช้ GNA ในการพัฒนาชุดตรวจที่มีแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวจึงสมเหตุสมผล

5.7 ค่า LOD ของ sensitized MAb18B7 latex beads มีค่าเท่ากับ 1 µg/ml ซึ่งมากกว่าค่า LOD ของชุดตรวจ MAb 18B7 LFIA ที่มีอยู่ 0.05 µg/ml แสดงให้เห็นถึงปัญหาที่ทำให้การพัฒนาแบบ latex agglutination มีความไวต่อแคปซูลแอนติเจนน้อยกว่าการพัฒนาด้วยวิธี LFIA จากการวิเคราะห์ พบว่าอาจมีสาเหตุมาจากวิธีการตรึงแบบ passive adsorption ที่เป็นการตรึงแอนติบอดีให้ติดบนเม็ด latex beads ด้วยวิธีทางกายภาพ ทำให้การจับระหว่างแอนติบอดีกับ

เม็ด latex beads ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นการแก้ไขปัญหาจึงเป็นการเปลี่ยนวิธีในการตรึงเม็ด latex beads ด้วยวิธีอื่น เช่น การเติม cross-linker ที่จะช่วยให้แอนติบอดีกับเม็ด latex beads จับกันได้ดีมากขึ้น เป็นต้น ซึ่งน่าจะช่วยให้ชุดตรวจมีความไวที่มากขึ้นได้

6. บทสรุป

6.1 แคปซูลแอนติเจนของเชื้อยีสต์สามารถสกัดได้ด้วยวิธีการ ultrafiltration โดยมีลักษณะคล้ายเจลที่ใส และมีความเข้มข้น 3 mg/ml

6.2สามารถสกัด MAb 18B7 ได้จากการใช้ affinity column protein G ซึ่งได้รับการพิสูจน์ว่า immunoglobulin ที่ได้นั้น บริสุทธิ์และมีคุณสมบัติที่เป็น IgG ด้วยการทำ SDS-PAGE และ western blot ตามลำดับซึ่งมีความเข้มข้น 0.85 mg/ml

6.3 ผลจาก indirect ELISA บ่งชี้ว่า เกิด immunoreactivity ขึ้นระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี แสดงว่า MAb 18B7 มีความจำเพาะต่อการจับกับแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ได้เป็นอย่างดี โดยแม้ในความเข้มข้นที่ต่ำของแอนติบอดีที่ 20 ng/ml และความเข้มข้นของแคปซูลแอนติเจนที่ 7.5 ng/ml ยังแสดงค่า OD ที่สูงกว่า 1

6.4 สามารถพัฒนาชุดตรวจ Latex agglutination สำหรับตรวจหาแคปซูลแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* โดยค่า LOD ของ sensitized MAb18B7 latex beads เท่ากับ 1 µg/ml ในขณะที่ชุดตรวจ MAb 18B7 LFIA test มีค่า LOD เท่ากับ0.05 µg/ml

6.5 ในการพัฒนาชุดตรวจ latex agglutination ให้มีประสิทธิภาพมากกว่านี้อาจมีการพัฒนาวิธีการ sensitization ระหว่าง MAb 18B7 กับเม็ด latex bead ต่อไป เช่นอาจมีการเพิ่ม cross-linker ที่อาจช่วยให้มีการจับกันระหว่างแอนติบอดีและ latex beads ได้ดีขึ้น ยกตัวอย่างเช่น การใช้ carbodiimide เป็นต้น

6.6 การพัฒนาชุดตรวจ MAb 18B7 LFIA ควรมีการทดสอบกับจำนวนสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย เพื่อหาความจำเพาะ (specificity) และ ความคงตัว (stability) ของชุดตรวจต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนแผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษา ระดับปริญญาโท จากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

8. เอกสารอ้างอิง

Chayakulkeeree, M., & Denning, D. W. (2017). Serious fungal infections in Thailand. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *36*(6), 931-935.

Cherniak, R., Jones, R. G., & Reiss, E. (1988). Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by 13C-nmr spectroscopy. *Carbohydrate Research*, *172*(1), 113-138.

dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Fernandes, G. F., da Silva, S. H. M., Burger, E., and de Camargo, Z. P. (2015). Immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioidesbrasiliensis* using a latex test: detection of specific antibody anti-gp43 and specific antigen gp43. *Public Library of ScienceNeglected Tropical Diseases*. *9*(2), e0003516.

Gates-Hollingsworth, M. A., and Kozel, T. R. (2013). Serotype sensitivity of a lateral flow immunoassay for cryptococcal antigen (CrAg). *Clinical and Vaccine Immunology*. *20*(4), 634-635.

Intaramat, A. (2006). A study on the immobilization of antibody on synthetic membrane. Thesis for Master of Science in Microbiology, Graduate school, Mahidol University.

Kiska, D. L., Orkiszewski, D. R., Howell, D., & Gilligan, P. H. (1994). Evaluation of new monoclonal antibody-based latex agglutination test for detection of cryptococcal polysaccharide antigen in serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*(9), 2309-2311.

Kumar, P., Yang, M., Haynes, B. C., Skowyra, M. L., & Doering, T. L. (2011). Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, *21*(5), 597-602.

Lee, E. Y., Kang, J. H., Kim, K. A., Chung, T. W., Kim, H. J., Lee, H. G., ... & Song, E. Y. (2006). Development of a rapid, immunochromatographic strip test for serum asialo α1-acid glycoprotein in patients with hepatic disease. *Journal of Immunological Methods*, *308*(1-2), 116-123.

Nimrichter, L., Frases, S., Cinelli, L.P., Viana, N.B., Nakouzi, A., Travassos, L.R., Casadevall, A. and Rodrigues, M.L.(2007). Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryotic Cell*.*6*(8), 1400-1410.

Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, *23*(4), 525-530.

Temstet, A., Roux, P., Poirot, J. L., Ronin, O., and Dromer, F. (1992). Evaluation of a monoclonal antibody-based latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis: comparison with two tests using polyclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. *30*(10), 2544-2550.