เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่อการกำจัดเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม

อภิชญา ศรีวะรมย์[1], ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชล[2], นวพร วรศิลป์ชัย[3] และอริยา จินดามพร[4]

[1]สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
[2,4]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
[3]ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
e-mail: 6280071820@student.chula.ac.th

บทคัดย่อ

โรคพิธิโอซิส (pythiosis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิต โดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา ชื่อ พิเธียม อินซิดิโอซุ่ม (*Pythium insidiosum*) เชื้อเหล่านี้สร้างซูโอสปอร์ในสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งน้ำ ซึ่งเป็นระยะที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ โดยอุบัติการณ์การก่อโรคในคน (human pythiosis) สูงที่สุดพบในประเทศไทย การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า หนูทดลองที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและได้รับการฉีดซูโอสปอร์นั้นไม่มีการตอบสนองของ IL-17 และเกิดรอยโรคที่รุนแรง แต่จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยพิเธียมอินซิดิโอซุ่มแอนติเจน ปรากฏว่าให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน คือ พบระดับ IFN-γ และ IL-17 เพิ่มสูงขึ้น ดังที่ทราบกัน หนึ่งในบทบาทหลักของ IL-17 คือการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลให้เข้ามารวมกลุ่มและมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อโรค การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถของนิวโทรฟิลต่อการฆ่าเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มในสภาวะหลอดทดลอง โดยบ่มซูโอสปอร์ของพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม (จำนวน 3 สายพันธุ์) ร่วมกับนิวโทรฟิลจากอาสาสมัครสุขภาพดี (จำนวน 6 คน) ผลการทดลองพบว่านิวโทรฟิลสามารถลดจำนวนซูโอสปอร์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99 เมื่อประเมินผลโดยการนับโคโลนีของแต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ได้ผลเป็นร้อยละ 70.6, 74.5 และ 81.9 ยืนยันด้วยการย้อมสี trypan blue และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบร้อยละ 76.3, 88.1 และ 85.6 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีนิวโทรฟิล นอกจากนี้ยังพบว่าการบ่มนิวโทรฟิลร่วมกับซีรัมของอาสาสมัคร (opsonization) ช่วยเพิ่มความสามารถของนิวโทรฟิลในการฆ่าเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้บ่มร่วมกับซีรัม (unopsonization) การศึกษาครั้งนี้เป็นผลการทดลองเบื้องต้นที่บ่งบอกความสามารถของนิวโทรฟิลต่อการกำจัดเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการใช้อธิบายกลไกการติดเชื้อและเป็นความรู้เพื่อการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: นิวโทรฟิล, พิเธียมอินซิดิโอซุ่ม, โรคพิธิโอซิส, ซูโอสปอร์

Killing activity of neutrophils against *Pythium insidiosum*

Apichaya Sriwarom[1], Direkrit Chiewchengchol[2], Navaporn Worasilchai[3] and Ariya Chindamporn[4]

[1]Medical Microbiology, Interdisciplinary Program, Graduated School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[2,4]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[3]Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology, Faculty of Allied Health Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
email: 6280071820@student.chula.ac.th

Abstract

Pythiosis is a life-threatening disease caused by an oomycete fungus-like pathogen, *Pythium insidiosum* (*P. insidiosum*). This pathogen generates encysted zoospores in an aquatic environment, which are an infected form in their life cycle when they contact with the susceptible hosts. Thailand has been known as the highest incidence of human pythiosis country. According to recent studies, it has been shown the absent level of interleukin-17 (IL-17) in immunocompromised mice infected with zoospores of *P. insidiosum*. In contrast, our previous study demonstrated increased levels of IL-17 and interferon-gamma (IFN-γ) in the serum of patients who received *P. insidiosum* antigen immunotherapy. As IL-17 plays a role in the recruitment of neutrophils; one of the significant innate immune cells that eliminate pathogens, this research therefore aimed to investigate *in vitro* killing activity of neutrophils against *P. insidiosum* zoospores. Zoospores induced from three different strains of *P. insidiosum* were incubated with or without neutrophils isolated from six healthy donors in biological triplicates. The results showed a significant decrease in zoospore viability measured by colony count on blood agar (70.6%, 74.5%, and 81.9%) and trypan blue staining observed under the light microscope (76.3%, 88.1%, and 85.6%), compared with a control group. Furthermore, zoospores opsonized with pooled-healthy serum significantly enhanced the killing activity of neutrophils when compared with an unopsonized group with 99% confidence intervals. This preliminary result indicated that neutrophils were involved in *P. insidiosum* zoospore elimination. To better understand neutrophil mechanism and immune pathogenesis of pythiosis, further research on other neutrophil functions is needed.

Keywords: Neutrophils, *Pythium insidiosum*, Pythiosis, Zoospores

บทนำ

โรคพิธิโอซิส เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดอันตรายแก่ชีวิต สาเหตุสำคัญของการเกิดโรค คือ เชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม (*P. insidiosum*) เชื้อเหล่านี้ไม่ใช่เชื้อราที่แท้จริงถึงแม้ว่าจะมีลักษณะที่สำคัญหลายอย่างที่ใกล้เคียงกับเชื้อรา เช่น วงจรชีวิต แหล่งอาหาร ส่วนประกอบบนผนังเซลล์ รวมถึงความสามารถในการสร้างสายรา (Lévesque, 2011) แต่เมื่อศึกษาทางวิวัฒนาการและลักษณะทางพันธุกรรมแล้วเชื้อนี้ถูกจัดให้อยู่ในอาณาจักร Stramenopila ไฟลัม Oomycota ซึ่งเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจำพวกราน้ำ สามารถพบเชื้อนี้ได้ตามแหล่งเกษตรกรรม พื้นดินชื้น หรือแหล่งน้ำตามธรรมชาติ (Austwick & Copland, 1974) เมื่อถึงระยะหนึ่งในวงจรชีวิต เชื้อนี้จะสร้างซูโอสปอร์ (zoospores) ซึ่งเป็นลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและมีความสำคัญคือเป็นระยะที่สามารถก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ เช่น มนุษย์ ม้าหรือวัว เป็นต้น (Bezerra Júnior et al., 2010) สำหรับการติดเชื้อในมนุษย์พบว่าร้อยละ 80 มีรายงานอุบัติการณ์การเกิดโรคมากที่สุดอยู่ในประเทศไทย (Gaastra et al., 2010) สามารถแบ่งตามลักษณะของการเกิดโรคได้เป็น 4 ลักษณะ ได้แก่ การติดเชื้อในหลอดเลือด (vascular form) เป็นรูปแบบที่มีการติดเชื้อมากที่สุดของผู้ป่วยในประเทศไทยพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงโดยเฉพาะธาลัสซีเมีย และจากการสำรวจระหว่างปีค.ศ. 2000 – 2018 พบอัตราการเสียชีวิตมากถึงร้อยละ 40 (Permpalung, Worasilchai, & Chindamporn, 2019) ประเภทที่สองเป็นการติดเชื้อในกระจกตา (ocular form) มีสาเหตุมาจากการเกิดอุบัติเหตุน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติกระเด็นเข้าตา และในประเทศไทยพบว่าเป็นรูปแบบการติดเชื้อมากที่สุดเป็นอันดับสอง ในขณะที่ประเทศอินเดียพบอุบัติการณ์สูงที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง (Permpalung et al., 2019) ถัดมาเป็นการติดเชื้อที่ชั้นผิวหนังและใต้ผิวหนัง (cutaneous and sub-cutaneous form) และรูปแบบสุดท้ายคือการติดเชื้อแบบแพร่กระจายทั่วร่างกาย (disseminated form) อย่างไรก็ตามโรคติดเชื้อพิธิโอซิส ยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลายในวงการแพทย์ ดังนั้นอุบัติการณ์ดังกล่าวยังเป็นเพียงบางส่วนเท่านั้น ปัจจัยสำคัญของการเกิดโรคพิธิโอซิสตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น คือการที่ซูโอสปอร์จะสลัดแฟกเจลลากลายเป็นสปอร์ที่เรียกว่า เอนซีสต์ซูโอสปอร์เกาะติดกับเนื้อเยื่อที่มีบาดแผลในบริเวณอวัยวะดังกล่าวตามรูปแบบการติดเชื้อ หลังจากนั้นอุณหภูมิในร่างกายของโฮสต์สามารถกระตุ้นให้สปอร์เกิดการงอกของสายราและรุกล้ำเข้าสู่ร่างกายจนเกิดเป็นพยาธิสภาพของโรคพิธิโอซิส (Mendoza, Ajello, & McGinnis, 1996)

เมื่อจุลชีพต่างๆ เข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันมีหน้าที่ตอบสนองและต่อต้านกับเชื้อโรคเพื่อป้องกันไม่ให้ร่างกายเกิดรอยโรคร้ายแรง สำหรับการศึกษากลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันกับเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม เริ่มต้นจากการศึกษากลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในม้าที่ป่วยเป็นโรคพิธิโอซิส พบว่าเมื่อเอนซีสต์ซูโอสปอร์เข้ามาเกาะติดและเกิดการงอกของสายราเซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cell, APC) รับรู้และนำเสนอชิ้นส่วนของเชื้อให้กับเซลล์ชนิด Th2 เกิดการตอบสนองโดยการหลั่งสารที่มีชื่อว่า interleukin (IL) คือ IL-4 และ IL-5 ซึ่งสารทั้งสองนี้สามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดอาการแพ้ (allergy) และทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์บริเวณที่ติดเชื้อ แต่เมื่อม้าที่ป่วยเป็นโรคพิธิโอซิสได้รับการรักษาโดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยพิเธียมอินซิดิโอซุ่มแอนติเจน (*P. insidiosum* antigen, PIA) พบว่ามีการตอบสนองกับเซลล์ชนิด Th1 เกิดการหลั่ง IFN-γ และแอนติบอดี (antibody) ชนิด IgG ส่งผลให้การดำเนินไปของโรคดีขึ้นและเกิดอาการแพ้ที่น้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ PIA (Mendoza, Mandy, & Glass, 2003) ต่อมามีการศึกษาในผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสที่ติดเชื้อในหลอดเลือด พบว่าเมื่อได้รับการรักษาด้วย PIA แล้วผู้ป่วยร้อยละ 50 จากทั้งหมด 8 คน มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิด Th1 ที่เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณ IL-4 กับ IL-5 ในกระแสเลือดลดลง (Wanachiwanawin et al., 2004) และจากการศึกษาก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย พบว่าผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสร้อยละ 90

จากทั้งหมด 50 คน ที่ได้รับการรักษาโดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย PIA มีการเพิ่มสูงขึ้นของปริมาณ IFN-γ และ IL-17 ในขณะที่ปริมาณ IL-4 กับ IL-5 ก็ลดลงตามไปด้วย จากผลการศึกษาในผู้ป่วยโรคพิธิโอซิสแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าที่ได้มีการศึกษาในม้า และในปีค.ศ. 2017 มีการศึกษาโรคพิธิโอซิสในหนูทดลอง โดยการฉีดซูโอสปอร์เข้าไปในหนูทดลองที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูสุขภาพดี พบว่าไม่มีการตอบสนองของ IFN-γ และ IL-17 ในกลุ่มหนูที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอีกทั้งยังเกิดการติดเชื้อแบบแพร่กระจายทั่วร่างกาย (Tondolo et al., 2017) สามารถบ่งบอกได้ว่าการศึกษาครั้งนี้มีผลการทดลองที่คล้ายคลึงกับการศึกษาในผู้ป่วยและม้า

จากการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้น พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโรคพิธิโอซิสมีการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ที่น่าสนใจและเป็นสิ่งสำคัญที่สามารถแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อการรักษาของโรคในทางที่ดีขึ้น หนึ่งในนั้นคือ IL-17 เนื่องจากไซโตไคน์ชนิดนี้สามารถกระตุ้นนิวโทรฟิล (neutrophil) ให้เข้ารวมกันยังบริเวณที่มีการติดเชื้อจุลชีพได้ นิวโทรฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่พบมากที่สุดในกระแสเลือดของมนุษย์ อีกทั้งยังเป็นหนึ่งในเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) มีความสำคัญ คือ สามารถเข้ามามีบทบาทในการต่อต้านกับเชื้อจุลชีพตั้งแต่เริ่มมีการติดเชื้อในช่วงต้น (Kolaczkowska & Kubes, 2013) นิวโทรฟิลสามารถรับรู้ (recognize) ต่อเบต้ากลูแคน (β-glucan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่อยู่บนผิวเซลล์ของเชื้อราและตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยกลไกการกำจัดเชื้อที่หลากหลาย ได้แก่ การอาศัยกลไกการฆ่าภายในเซลล์ด้วยกระบวนการจับกิน (phagocytosis) แล้วกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารที่เป็นพิษต่อเชื้อจุลชีพเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) โดยอาศัยเอนไซม์ NADPH oxidase (Roos, van Bruggen, & Meischl, 2003) นอกจากนี้นิวโทรฟิลยังสามารถปล่อยสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ซึ่งมีความสำคัญในการจับและทำลายจุลชีพ เรียกกระบวนการนี้ว่า การเกิด NET (Neutrophil extracellular traps) (Brinkmann et al., 2004) จะเห็นได้ว่านิวโทรฟิลเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ แต่มีข้อจำกัดคือ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษากลไกการตอบสนองของนิวโทรฟิลต่อการกำจัดเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของนิวโทรฟิลในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มที่อยู่ในรูปแบบของเอนซีสต์ซูโอสปอร์ซึ่งเป็นระยะสำคัญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค และสามารถนำผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มาใช้เพื่ออธิบายกลไกการเกิดโรคพิธิโอซิสในมนุษย์ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มที่เป็นรูปแบบซูโอสปอร์ในสภาวะหลอดทดลอง

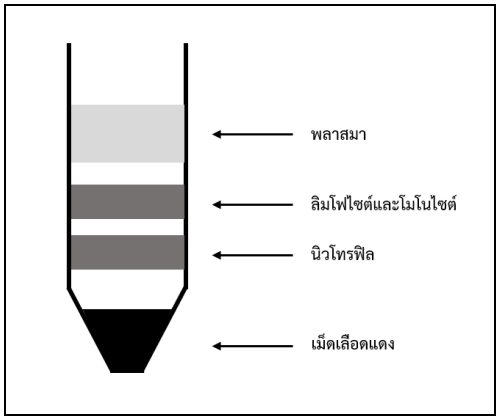
ระเบียบวิธีวิจัย

1. กลุ่มอาสาสมัครและจริยธรรมการวิจัย

คัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพดีเพศชายและหญิงจำนวน 6 คน คำนวณจำนวนของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม G Power Software version 3.1.9.2 (G*Power, ประเทศเยอรมัน) เจาะเก็บตัวอย่างเลือดใส่หลอดเลือดชนิดเฮพาริน (heparin tube) และหลอดเลือดชนิดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (clotted blood tube) หลอดละ 4 มิลลิลิตรต่อครั้ง โดยการศึกษาครั้งนี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย (หมายเลขโครงการ 572/2020)

2. การแยกนิวโทรฟิลจากเลือดของอาสาสมัคร

นำสารสำหรับแยกเม็ดเลือด Polymorphprep™ (Axis-shield, ประเทศนอร์เวย์) มาใส่ร่วมกับเลือดที่เจาะเก็บมาจากอาสาสมัครในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,800 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะได้เป็นชั้นต่างๆ ของเม็ดเลือด ดังภาพที่ 1 จากนั้นนำส่วนพลาสมา ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ทิ้ง แล้วนำชั้นของนิวโทรฟิลมาปั่นล้างด้วยอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI (Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยบัฟเฟอร์ (red cell lysis buffer) นำตะกอนของนิวโทรฟิลหลังจากที่ปั่นแล้วมาละลายกับอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI และย้อมเซลล์ที่ได้ด้วยสี trypan blue เพื่อนับปริมาณนิวโทรฟิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 1 ภาพแสดงชั้นต่างๆ ของเม็ดเลือดหลังจากแยกด้วยสาร Polymorphprep™
ที่มา Ferrante A, Thong Y. (1980). **Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method.** *Journal of immunological methods, 36*(2), 109-17.

3. สายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ สภาวะในการเจริญ และการกระตุ้นสร้างซูโอสปอร์

เชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 3 สายพันธุ์ แบ่งตามการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและแหล่งที่พบเชื้อ (Worasilchai, Permpalung, & Chindamporn, 2018) ได้แก่ ATCC 90586 แยกได้มาจากผู้ป่วยชาวอเมริกัน CBS 777.85 แยกได้มาจากม้าที่อาศัยอยู่แถบทวีปเอเชีย และ PEC1 ได้มาจากน้ำในเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ ประเทศไทย นำเชื้อทั้งหมดเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว sabouraud dextrose broth (SDB, Oxoid, ประเทศอังกฤษ) บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 48 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสร้างสายรา การกระตุ้นการสร้างซูโอสปอร์ปรับปรุงวิธีการมาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Mendoza & Prendas, 1988) โดยการนำสายราของเชื้อวางบนใบหญ้ามาเลเซีย (*Axonopus compressus*) ปราศจากเชื้อที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง corn meal agar (BD, ประเทศฝรั่งเศส) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 48 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อสร้างสายราเกาะกับใบหญ้า จากนั้นนำใบหญ้าที่มีสายราเกาะมาใส่ลงในน้ำยา induction medium (Chaiprasert, Samerpitak, Wanachiwanawin, & Thasnakorn, 1990) ซึ่งเป็นน้ำยาที่มีความสามารถกระตุ้นให้เชื้อนี้สร้างซูโอสปอร์ บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นำสารละลายดังกล่าวมาปั่น

เพื่อตกตะกอนซูโอสปอร์ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และย้อมเซลล์ที่ได้ด้วยสี trypan blue เพื่อนับปริมาณซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การบ่มซูโอสปอร์ร่วมกับซีรัมของอาสาสมัคร (opsonization)

นำเลือดที่เจาะใส่หลอดชนิดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งมาปั่นเพื่อแยกซีรัมด้วยความเร็วรอบ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดเก็บชั้นซีรัมและนำซีรัมของอาสาสมัครทั้งหมดมารวมกัน (pooled serum) หลังจากที่เก็บตะกอนซูโอสปอร์ของเชื้อมาได้แล้ว นำมาบ่มร่วมกับซีรัมรวมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำตะกอนของซูโอสปอร์มาปั่นล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิด phosphate buffer saline (PBS) ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. การวัดความสามารถของนิวโทรฟิลในการทำลายเชื้อ (neutrophil killing assay)

วิธีการวัดความสามารถของนิวโทรฟิลต่อการยับยั้งการเจริญของซูโอสปอร์ของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มดัดแปลงวิธีการมาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Gazendam et al., 2016) โดยนำนิวโทรฟิลจากอาสาสมัครแต่ละคนจำนวน 2×10^4 เซลล์ มาบ่มร่วมกับซูโอสปอร์จำนวน 2×10^5 เซลล์ คิดเป็นอัตราส่วน 1 : 10 (นิวโทรฟิล : ซูโอสปอร์) ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งหมด 2 ชั่วโมง โดยมีการเขย่าเบาๆ ทุก 15 นาทีในระหว่างการบ่ม เมื่อครบเวลาแล้วนำมาประเมินการมีชีวิตรอดของเชื้อโดยการนับโคโลนี (colony count) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar เมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ร่วมกับประเมินการมีชีวิตรอดโดยวิธีการย้อมสี trypan blue เพื่อดูการติดสีของซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีนิวโทรฟิลอยู่ในการทดลองเป็นกลุ่มควบคุม

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

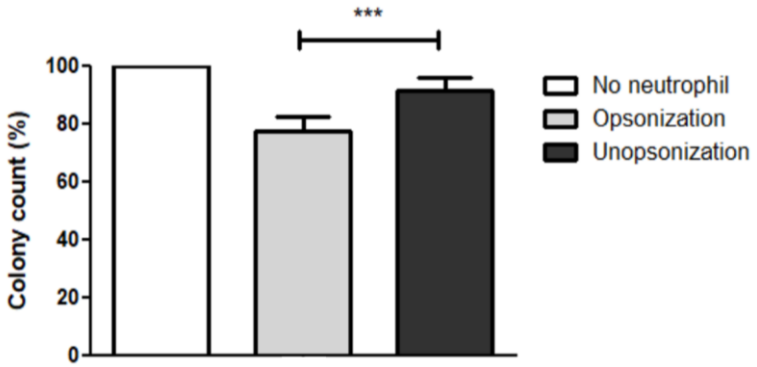
ผลการศึกษาที่ได้นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA) ใช้สถิติการวิเคราะห์ข้อมูลชนิด One-way analysis of variance (ANOVA) โดยการใช้กลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีนิวโทรฟิลอยู่ในการทดลอง ซึ่งผลของการศึกษาแสดงอยู่ในรูปแบบของแผนภูมิที่คำนวณมาจากค่า mean ± standard deviation (SD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ผลการวิจัย

1. การเปรียบเทียบความสามารถในการส่งเสริมประสิทธิภาพของนิวโทรฟิลในการทำลายซูโอสปอร์ที่ได้บ่มและไม่ได้บ่มด้วยซีรัม

ซูโอสปอร์สายพันธุ์ CBS 777.85 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มของซูโอสปอร์ที่ถูกนำมาบ่มร่วมกับซีรัมรวมของอาสาสมัคร (opsonization) และกลุ่มของซูโอสปอร์ที่ไม่ได้บ่มด้วยซีรัม (unopsonization) ก่อนนำมาทำปฏิกิริยาร่วมกับนิวโทรฟิลที่แยกได้จากอาสาสมัครจำนวน 2 คน แล้วประเมินความสามารถในการทำลายเชื้อของนิวโทรฟิลด้วยวิธีการนับโคโลนีเพื่อดูความสามารถในการเจริญของซูโอสปอร์จากทั้งสองกลุ่ม ในสภาวะควบคุมหรือสภาวะที่ไม่มีนิวโทรฟิลร่วมด้วยเชื้อมีจำนวนเฉลี่ย 1.02×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) คิดอัตราการรอดชีวิตเป็นร้อยละ 100 ในกลุ่มของซูโอสปอร์ที่

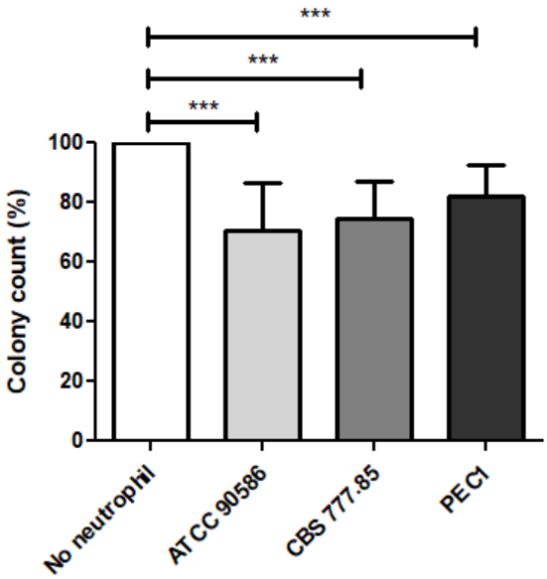
ผ่านการบ่มร่วมกับซีรัมรวมของอาสาสมัครมีจำนวนเชื้อลดลงเฉลี่ย 7.9×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 77.5 (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 4.98) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วยซีรัมรวมที่มีจำนวนเชื้อลดลงเฉลี่ย 9.35×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 91.7 (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 4.44) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงอัตราร้อยละจำนวนโคโลนี (% colony count) ของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มสายพันธุ์ CBS 777.85 เมื่อทำปฏิกิริยาร่วมกับนิวโทรฟิล โดยการนับจำนวนโคโลนีในกลุ่มซูโอสปอร์ที่ผ่านการบ่มด้วยซีรัม (opsonization) *** แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยซีรัม (unopsonization)

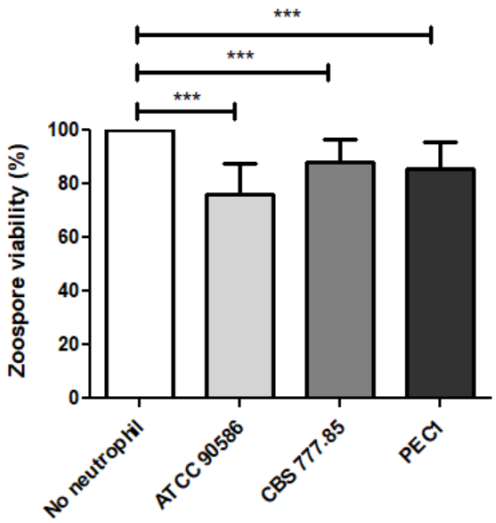
2. ความสามารถของนิวโทรฟิลในการทำลายซูโอสปอร์ของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่ม

นำซูโอสปอร์ที่แยกได้จากเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มและผ่านการบ่มด้วยซีรัมรวมของอาสาสมัครจำนวนทั้งหมด 3 สายพันธุ์มาทำปฏิกิริยาร่วมกับนิวโทรฟิลที่แยกได้จากอาสาสมัคร หลังจากนั้นนำมาประเมินการมีชีวิตรอดของเชื้อโดยการนับจำนวนโคโลนี จากการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่าในสภาวะควบคุมหรือสภาวะที่ไม่มีนิวโทรฟิลร่วมด้วย เชื้อสายพันธุ์ ATCC 90586 มีจำนวนเฉลี่ย 1.03×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ CBS 777.85 มีจำนวนเฉลี่ย 1.03×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ PEC1 มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 1.07×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยสภาวะควบคุมทั้งหมดคิดอัตราการรอดชีวิตเป็นร้อยละ 100 ส่วนสภาวะทดลอง ปรากฏว่า สายพันธุ์ ATCC 90586 มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยลดเหลือ 7.3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ CBS 777.85 มีจำนวนเฉลี่ย 7.7×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ PEC1 มีจำนวนเฉลี่ย 8.8×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยสภาวะทดลองมีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.001$) คิดเป็นร้อยละ 70.6, 74.5 และ 81.9 (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 16.07, 12.73 และ 10.76) ตามลำดับ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงอัตราร้อยละจำนวนโคโลนี (% colony count) ของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ATCC 90586, CBS 777.85 และ PEC1 โดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อหลังจากที่ได้มีการบ่มร่วมกับนิวโทรฟิล เครื่องหมาย *** แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *p*-value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม (ไม่มีนิวโทรฟิล) ที่เชื้อมีความสามารถในการเจริญคิดเป็นร้อยละ 100

นอกเหนือจากการประเมินผลการมีชีวิตรอดของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มทั้ง 3 สายพันธุ์โดยวิธีการนับโคโลนีที่เกิดขึ้นแล้ว การย้อมสี trypan blue เพื่อดูการติดสีของเซลล์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการยืนยันการมีชีวิตรอดของซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มทั้ง 3 สายพันธุ์ มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($p < 0.001$) สายพันธุ์ ATCC 90586 พบเซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็นร้อยละ 79.3 สายพันธุ์ CBS 777.85 ร้อยละ 88.0 และสายพันธุ์ PEC1 ร้อยละ 85.6 (ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 11.46, 8.49 และ 10.23 ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุมคิดเป็นร้อยละ 100 ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงอัตราการรอดชีวิตของซูโอสปอร์ (% zoospore viability) จากเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ATCC 90586, CBS 777.85 และ PEC1 โดยการสังเกตลักษณะเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue และมีการงอกของสายรา (เซลล์ที่มีชีวิตรอด) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากที่ได้มีการบ่มร่วมกับนิวโทรฟิล เครื่องหมาย *** แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม (ไม่มีนิวโทรฟิล) ที่คิดเป็นร้อยละ 100

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่าการบ่มซูโอสปอร์ของเชื้อพิเธียมอินซินดิโอซุ่มร่วมกับซีรัมรวมของอาสาสมัครช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของนิวโทรฟิลได้มากขึ้น โดยเปรียบเทียบจากจำนวนโคโลนีเฉลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar หลังจากที่ได้มีการทดสอบปฏิกิริยาร่วมกับนิวโทรฟิลที่แยกได้จากอาสาสมัครสุขภาพดี กลุ่มซูโอสปอร์ที่บ่มร่วมกับซีรัมมีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของเชื้อน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วยซีรัม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า เมื่อบ่มโคนิเดีย (conidia) ของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) ร่วมกับซีรัมรวมของอาสาสมัครสุขภาพดีก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับนิวโทรฟิล ทำให้เกิดการงอกของสายราน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของโคนิเดียที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วยซีรัม (Gazendam et al., 2016) การบ่มเชื้อจุลชีพร่วมกับซีรัมก่อนนำมาทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการทำงานของเซลล์ทางภูมิคุ้มกันที่สนใจได้ เนื่องจากกลไกการทำงานของแอนติบอดี หรือคอมพลีเมนต์ (complement) ที่อยู่ในซีรัม จะไปช่วยจับกับจุลชีพเป้าหมายแล้วอาศัยกลไกการทำงานของตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะแตกต่างกันออกไป เช่น เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล หรือแมคโครฟาจ (macrophage) มีตัวรับชนิด Fcγ บนผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีชนิด IgG เมื่อแอนติบอดีชนิดนี้ไปจับกับจุลชีพเป้าหมายแล้วทำให้เม็ดเลือดขาวสามารถเข้าไปรับรู้และกระตุ้นให้เกิดกลไกการทำลายเชื้อจุลชีพ (Futosi, Fodor, & Mócsai, 2013) ในการศึกษาความสามารถของนิวโทรฟิลต่อการกำจัดเชื้อ *Candida albicans* (*C. albicans*) พบว่าเชื้อที่ผ่านการบ่มด้วยซีรัมนั้นสามารถกระตุ้นโดยอาศัยตัวรับชนิด Fcγ ผ่านกระบวนการทำงานของ protein kinase C (PKC) มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการใช้เอนไซม์ NADPH oxidase ของนิวโทรฟิลและกำจัดเชื้อได้ (Gazendam et al., 2014) ตัวรับอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการต่อต้านเชื้อรา คือ CR3 (complement receptor 3) เป็นตัวรับสำคัญที่อยู่บนผิวเซลล์ของนิวโทรฟิลสามารถรับรู้กับเบต้ากลูแคนซึ่งบนองค์ประกอบหลักที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด พบว่าการรับรู้เบต้ากลูแคนที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) สามารถอาศัยตัวรับชนิด CR3 แล้วส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการจับกินและการทำลายเชื้อของนิวโทรฟิลได้ (van Bruggen et al., 2009)

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของนิวโทรฟิลในการยับยั้งการงอกออกเป็นสายราของซูโอสปอร์ (germinated zoospores) ที่กระตุ้นได้จากเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ได้มาจากแหล่งที่มาแตกต่างกัน โดยประเมินจากความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากบ่มร่วมกับนิวโทรฟิลเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วพบว่ามีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีนิวโทรฟิลอยู่ในปฏิกิริยาการทดลอง สอดคล้องกับการย้อมด้วยสี trypan blue เพื่อยืนยันลักษณะการรอดชีวิต (viability) ของซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากซูโอสปอร์ติดสีน้ำเงินแสดงให้เห็นถึงการตายของเซลล์ และหากไม่ติดสีหรือมีสีใสรวมถึงมีการงอกของสายราแสดงให้เห็นว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิตรอด (Strober, 2015) พบว่าซูโอสปอร์ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน ผลการทดลองครั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่านิวโทรฟิลมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านกับการติดเชื้อพิเธียมอิน

ซิดิโอซุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าที่ได้มีการนำเชื้อ *C. albicans* มาบ่มทำปฏิกิริยาร่วมกับนิวโทรฟิล พบว่านิวโทรฟิลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีขึ้นเมื่อบ่มนาน 2 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Zhang et al., 2017) กลไกการรับรู้ของนิวโทรฟิลต่อเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มยังมีการศึกษาไม่มากนักเนื่องจากเชื้อนี้ไม่ใช่เชื้อราที่แท้จริงจึงทำให้มีคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างจากเชื้อรา แต่สิ่งที่คล้ายคลึงกันคือเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มมีองค์ประกอบของเบต้ากลูแคนอยู่บนผนังเซลล์ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้สำคัญของการตรวจโรคพิธิโอซิส (Worasilchai, Permpalung, Chongsathidkiet, et al., 2018) จึงทำให้สามารถบ่งบอกได้ว่าเบต้ากลูแคนสามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ของนิวโทรฟิล และส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกลไกการทำลายซูโอสปอร์ของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มในการทดลองนี้ อย่างไรก็ตามการบ่มร่วมกับนิวโทรฟิลในสภาวะหลอดทดลองยังไม่สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของซูโอสปอร์ทั้งหมดลงได้ ดังนั้นการที่จะลดอัตราการเจริญของเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มยังคงต้องอาศัยการทำงานร่วมกับเซลล์ทางภูมิคุ้มกันในร่างกายชนิดอื่นๆ เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อให้หมดไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษากลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายในการติดเชื้อพิเธียมอินซิดิโอซุ่มยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อนี้ยังอยู่ในวงจำกัดมาก ลักษณะหรือคุณสมบัติที่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราก่อโรคชนิดอื่น เป็นต้น ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้ผลการทดลองเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บ่งบอกถึงความสามารถของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในการกำจัดเชื้อชนิดนี้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการใช้อธิบายกลไกการเกิดโรคพิธิโอซิสและเป็นความรู้เพื่อการศึกษาต่อยอดในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Austwick, P., & Copland, J. (1974). **Swamp cancer**. *Nature, 250*(5461), 84-84.

Bezerra Júnior, P. S., Pedroso, P. M. O., Pavarini, S. P., Dalto, A. G. C., Santúrio, J. M., & Driemeier, D. (2010). **Equine intestinal pythiosis in Southern Brazil**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 62*(2), 481-483.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. *science, 303*(5663), 1532-1535.

Chaiprasert, A., Samerpitak, K., Wanachiwanawin, W., & Thasnakorn, P. (1990). **Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum***. *Mycoses, 33*(6), 317-323.

Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). **Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways**. *International immunopharmacology, 17*(4), 1185-1197.

Gaastra, W., Lipman, L. J., De Cock, A. W., Exel, T. K., Pegge, R. B., Scheurwater, J., . . . Mendoza, L. (2010). ***Pythium insidiosum*: an overview**. *Veterinary microbiology, 146*(1-2), 1-16.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Gazendam, R. P., van Hamme, J. L., Tool, A. T., Hoogenboezem, M., van den Berg, J. M., Prins, J. M., . . . Roos, D. (2016). **Human neutrophils use different mechanisms to kill *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae: evidence from phagocyte defects**. *The Journal of Immunology, 196*(3), 1272-1283.

Gazendam, R. P., van Hamme, J. L., Tool, A. T., van Houdt, M., Verkuijlen, P. J., Herbst, M., . . . van den Berg, T. K. (2014). **Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects**. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 124*(4), 590-597.

Hancock, R. E., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). **The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity**. *Nature reviews immunology, 16*(5), 321-334.

Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013). **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation**. *Nature reviews immunology, 13*(3), 159-175.

Lévesque, C. A. (2011). **Fifty years of oomycetes—from consolidation to evolutionary and genomic exploration**. *Fungal Diversity, 50*(1), 35-46.

Mendoza, L., Ajello, L., & McGinnis, M. (1996). **Infections caused by the oomycetous pathogen Pythium insidiosum. Infeccionescausadas por el patógenooomiceto *Pythium insidiosum***. *J. Mycol. Med, 6*(4), 151-164.

Mendoza, L., Mandy, W., & Glass, R. (2003). **An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis**. *Vaccine, 21*(21-22), 2797-2804.

Mendoza, L., & Prendas, J. (1988). **A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum***. *Mycopathologia, 104*(1), 59-62.

Permpalung, N., Worasilchai, N., & Chindamporn, A. (2019). **Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism**. *Mycopathologia*, 1-12.

Rivera, A., Siracusa, M. C., Yap, G. S., & Gause, W. C. (2016). **Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity**. *Nature immunology, 17*(4), 356-363.

Roos, D., van Bruggen, R., & Meischl, C. (2003). **Oxidative killing of microbes by neutrophils**. *Microbes and infection, 5*(14), 1307-1315.

Strober, W. (2015). **Trypan blue exclusion test of cell viability**. *Current protocols in immunology, 111*(1), A3. B. 1-A3. B. 3.

Tondolo, J. S., Loreto, E. S., Ledur, P. C., Jesus, F. P., Silva, T. M., Kommers, G. D., . . . Santurio, J. M. (2017). **Chemically induced disseminated pythiosis in BALB/c mice: a new experimental model for *Pythium insidiosum* infection**. *PloS one, 12*(5).

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

van Bruggen, R., Drewniak, A., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Chapel, H., . . . Kuijpers, T. W. (2009). **Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for β-glucan-bearing particles**. *Molecular immunology, 47*(2-3), 575-581.

Wanachiwanawin, W., Mendoza, L., Visuthisakchai, S., Mutsikapan, P., Sathapatayavongs, B., Chaiprasert, A., . . . Ajello, L. (2004). **Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans**. *Vaccine, 22*(27-28), 3613-3621.

Worasilchai, N., Permpalung, N., & Chindamporn, A. (2018). **High-resolution melting analysis: A novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and pythiosis**. *Medical Mycology, 56*(7), 868-876.

Worasilchai, N., Permpalung, N., Chongsathidkiet, P., Leelahavanichkul, A., Mendoza, A. L., Palaga, T., . . . Chindamporn, A. (2018). **Monitoring anti-*Pythium insidiosum* IgG Antibodies and (1⟶ 3)-β-d-Glucan in vascular pythiosis**. *Journal of clinical microbiology, 56*(8), e00610-00618.

Zhang, X., Zhao, S., Sun, L., Li, W., Wei, Q., Ashman, R. B., & Hu, Y. (2017). **Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase**. *American journal of translational research, 9*(1), 50.