

นิพนธ์ต้นฉบับ

Virulence ของ Penicillium marneffeii ในหนูขาวปกติพจนนา ศรีบุรี¹บงกชวรรณ สุตตะพาหะ²นงนุช วนิต์ธรรณาคม¹ปริมณช์ กาญจนันธุติ¹มาลี เมฆประทีป¹จันทนา คำวรรณ³

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษา virulence ของเชื้อรา Penicillium marneffeii ที่แยกจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ กับ หนูขาวปกติ (swiss mice และ albino rats) โดยฉีดเชื้อเข้าช่องท้องของสัตว์ทดลอง พบว่าภายในระยะเวลา 1 เดือน สัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อ ไม่แสดงอาการหรือพยาธิสภาพที่มองเห็นด้วยตาเปล่า การเพาะเชื้อจากอวัยวะภายใน พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของ swiss mice จะพบ P. marneffeii ที่ตับและม้าม ส่วนในหนู albino rats ตรวจพบเชื้อในม้าม ร้อยละ 25

คำรหัส : Virulence, Penicillium marneffeii

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ หน่วยปฏิบัติการจุลชีววิทยา งานปฏิบัติการกลางและชันสูตรโรค

โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

Abstract : Virulence of Penicillium marneffeii in normal swiss mice and albino rats.Sriburee P¹, Sutabhaha B², Vanittanakom N¹, Khanjanasthiti P¹, Mekaprateep M¹, Khumwan C³

Virulence of Penicillium marneffeii isolated from clinical specimens was investigated in normal swiss mice and albino rats. These animals were injected intraperitoneally with the spore suspension of P. marneffeii. All mice and rats which showed no visible sign of infection were sacrificed one month after inoculation. Spleens and livers were cultured on Sabouraud dextrose agar. P. marneffeii was isolated from spleens and livers of the injected mice (more than 50 %), and from spleens of the injected rats(25%).

Keywords : Virulence, Penicillium marneffeii¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.² Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University.³ Clinical Microbiology Laboratory, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital.**บทนำ**

เชื้อรา Penicillium marneffeii จัดเป็นรา Penicillium ชนิดเดียวเท่านั้นที่เป็นราสองรูป (dimorphic fungi) ซึ่งก่อให้เกิดโรค ทั้งในคนที่มีสุขภาพดี(1) และคนที่บกพร่องทางภูมิคุ้มกัน(2) โดยทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบ Reticuloendothelial ผู้ป่วยมักมีอาการไข้, คอมน้ำเหลืองโต, ตับและม้ามโต, ฝี ปอดมักมี infiltration รอยโรคอาจแพร่กระจายเกิดตุ่มที่ผิวหนัง(Umbilical papule, Acne-like folliculitis) ซึ่งพบบ่อยในผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อราชนิดนี้(2) ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ เริ่มมีผู้ป่วยจากการติดเชื้อราชนิดนี้ตั้งแต่ปี

พ.ศ. 2532 ปัจจุบันจำนวนผู้ติดเชื้อราชนิดนี้ เพิ่มสูงขึ้นตามอัตราการติดเชื้อเอดส์ในหมู่ประชากร โดยเฉพาะในท้องถิ่นทางภาคเหนือตอนบน แม้ว่า P. marneffeii จัดเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญทางการแพทย์ แต่ข้อมูลความรู้เกี่ยวกับเชื้อราชนิดนี้ยังมีน้อย โดยเฉพาะการก่อโรคในสัตว์ทดลอง ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ใดทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในภูมิภาคนี้ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดสอบ virulence ของ P.marneffeii ต่อ normal host โดยเลือกหนูขาว swiss mice และ albino rats มาทำการทดสอบ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาว่า *P. marseffeii* สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จะก่อโรคในหนูขาวปกติ (swiss mice และ albino rats) ได้หรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษา virulence ของ *P. marseffeii*

ใน normal swiss mice

หนูที่ใช้ทดสอบ swiss mice อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-30 กรัม เชื้อรา *P. marseffeii* ที่ศึกษาใช้สายพันธุ์ 150 และ 391 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยเพาะเลี้ยงบน Sabouraud dextrose agar ที่ 25°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการแยกส่วน conidiospores ด้วยการเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ และ glass beads เขย่าโดยใช้ vortex mixer ประมาณ 5 นาที กรองผ่าน sterile glass wool ส่วนที่กรองได้จะเป็น conidia กว่า 90% ที่เหลือเป็น mycelial fragment ขนาดสั้น บั่นล้าง conidia ที่ได้ (2,500 รอบต่อนาที ประมาณ 20 นาที) ปรับความขุ่นให้เท่า standard McFarland no.1 (จำนวน viable cells ประมาณ $10^5 - 10^6$ CFU/มล. โดยวิธี dilution plate count) ฉีด suspension ของ conidia เข้าสู่ช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนู swiss mice สายพันธุ์ละ 4 ตัว (ตัวละ 0.5 มล.) กลุ่มที่เป็น control จะฉีดน้ำเกลือปราศจากเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน

แทน สังเกตอาการจนครบ 30 วัน หลังจากนั้นทำการเพาะเชื้อจากตับและม้าม เพื่อตรวจหาเชื้อรา *P. marseffeii* ต่อไป

2. ศึกษา virulence ของ *P. marseffeii*

ใน normal albino rats

หนูที่ใช้ทดสอบได้แก่ albino rats อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 55 - 65 กรัม เชื้อ *P. marseffeii* ที่ศึกษาใช้สายพันธุ์ 150 และสายพันธุ์ 126 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงและแยกส่วน conidia เช่นเดียวกับข้อ 1. ฉีด suspension ของ conidia ของเชื้อ *P. marseffeii* สายพันธุ์ละ 4 ตัว (ตัวละ 1 มล.) เข้าทางช่องท้อง กลุ่มที่เป็น control จะฉีดน้ำเกลือปราศจากเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการก่อโรคของ *P. marseffeii* ในภาวะที่เป็น yeast phase โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร Brain heart infusion agar ที่ 37°C เป็นเวลา 10 วัน ขูดเชื้อใส่ น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ใส่ glass beads เขย่าโดยใช้ vortex mixer ประมาณ 5 นาที บั่นล้างด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเช่นเดียวกัน ปรับความขุ่นให้เท่า standard McFarland no. 1 (ประมาณ $10^4 - 10^5$ CFU/มล.), ฉีด suspension ของ yeast - like cell เข้าสู่ช่องท้องของ albino rat ตัวละ 1 มล. (ใช้หนู 4 ตัว ต่อเชื้อรา 1 สายพันธุ์) สังเกตอาการจนครบ 30 วัน เพาะเชื้อจากตับและม้าม ตรวจหา *P. marseffeii* เช่นเดียวกัน

ผลการทดลอง

1. ศึกษา Virulence ของเชื้อ *P. marseffei*

คือ normal swiss mice

พบว่าหนูที่ได้รับการฉีด conidia เชื้อ *P. marseffei* ไม่แสดงอาการผิดปกติ บริเวณที่ฉีด ไม่มีรอยโรคปรากฏ หลังจากทำการฆ่าและเพาะเชื้อจากอวัยวะภายใน (ตับและม้าม)

สามารถแยกเชื้อ *P. marseffei* จากหนูที่ฉีดด้วย สายพันธุ์ 150 โดยแยกเชื้อได้จากม้ามของหนู ทั้ง 4 ตัว (100 เปอร์เซ็นต์) จากตับของหนูทั้ง 4 ตัว (100 เปอร์เซ็นต์) ส่วนหนูที่ฉีดด้วยเชื้อ สายพันธุ์ 391 แยกเชื้อได้จากม้าม 3 ใน 4 ตัว (75 เปอร์เซ็นต์) และจากตับ 2 ใน 4 ตัว (50 เปอร์เซ็นต์) ผลแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ *P. marseffei* สายพันธุ์ 150 และสายพันธุ์ 391 ในตับและม้ามของ Swiss mice ที่ฉีด Conidia ของเชื้อ

สายพันธุ์ ของเชื้อ	จำนวนหนูที่ตรวจพบเชื้อ/จำนวนหนูที่ฉีดเชื้อ (ตัว)	
	ตับ	ม้าม
สายพันธุ์ 150	4/4	4/4
สายพันธุ์ 391	2/4	3/4

2. ศึกษา Virulence ของเชื้อ *P. marseffei* คือ normal albino rats

จากการทดลองพบว่า หนู albino rats ที่ได้รับการฉีด conidia ของเชื้อ เข้าช่องท้อง ไม่มีอาการผิดปกติและบริเวณที่ถูกฉีดไม่มีรอยโรคปรากฏเช่นกัน เมื่อทำการเพาะเชื้อจากอวัยวะภายใน (ตับและม้าม) สามารถแยกเชื้อ *P. marseffei* จากม้ามของหนูที่ฉีดด้วย conidia ของสายพันธุ์ 126 จำนวน 1 ตัว จากหนู 4 ตัว (25 %) และจากม้ามของหนูที่ฉีด conidia ของเชื้อสายพันธุ์ 150 จำนวน 1 ตัว จากหนู 4 ตัว (25 %) ผลการเพาะเชื้อจากตับไม่พบเชื้อใน

หนูทั้งสองกลุ่ม ผลการฉีด *P. marseffei* ในรูป yeast phase ได้ผลคล้ายคลึงกับ เมื่อฉีด conidia suspension (mold phase) สามารถแยกเชื้อจากม้ามของหนูที่ฉีด yeast phase ของเชื้อสายพันธุ์ 126 จำนวน 2 ตัว จากหนู 4 ตัว (50 %) และจากม้ามของหนูที่ฉีด yeast phase ของเชื้อสายพันธุ์ 150 จำนวน 1 ตัว จากหนู 4 ตัว (25%) ตรวจไม่พบเชื้อจากตับของหนูทั้งสองกลุ่มที่ฉีด yeast phase (ผลแสดงในตารางที่ 2) ส่วนหนูในกลุ่ม control ไม่พบเชื้อทั้งในตับและในม้าม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ *P. marneffeii* สายพันธุ์ 126 และสายพันธุ์ 150 ในตับและม้ามของ albino rat ที่ฉีด Conidia หรือ Yeast cells ของเชื้อ

เชื้อสายพันธุ์	ลักษณะเชื้อที่ฉีด	จำนวนหนูที่ตรวจพบเชื้อ/จำนวนหนูที่ฉีด (ตัว)	
		ตับ	ม้าม
120	Conidia	0/4	1/4
	Yeast cells	0/4	2/4
150	Conidia	0/4	1/4
	Yeast cells	0/4	1/4

วิจารณ์

จากรายงานผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อรา *P. marneffeii* ในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบว่าส่วนใหญ่ของผู้ป่วยจะมีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน จากการติดเชื้อ HIV (ข้อมูลจากหน่วยปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่) มีเพียงไม่กี่รายที่ไม่ใช่ผู้ป่วยโรคเอดส์ การก่อโรคในคนปกติของเชือรานี้ยังไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานเป็นทางการของการติดเชื้อในห้อยทดลอง ซึ่งเกิดจากอุบัติเหตุ ในห้องปฏิบัติการโดย Segretain และคณะ (3) ได้รายงานการติดเชื้อเนื่องจากถูกเข็มแทงที่นิ้ว หลังจากนั้นไม่นานเกิดคุ่มหนองบริเวณแผล สามารถแยก *P. marneffeii* ได้จากรอยโรค การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดสอบการก่อโรคใน normal host โดยเลือก swiss mice และ albino rats ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่มักใช้เป็น animal model ในการศึกษาการก่อโรคหลายชนิด ผลจากการศึกษาทำให้ทราบว่า *P. marneffeii* ที่แยกจากผู้ป่วย ในภูมิภาคนี้มี

virulence ต่ำ จะไม่ก่อให้เกิดอาการหรือพยาธิสภาพที่มองเห็นด้วยตาเปล่า เมื่อฉีดเข้าช่องท้องของ swiss mice หรือ albino rats แต่เชื้อสามารถแพร่กระจายไปอยู่ที่อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับ reticuloendothelial system ได้แก่ ม้ามและตับ โดยเฉพาะมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของหนู swiss mice จะพบเชื้ออยู่ในม้ามและตับ โดยหนูไม่แสดงอาการ ส่วนใน albino rats ตรวจพบเชื้อในม้ามได้ 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบเชื้อในตับ ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณเชื้อในตับมีอยู่น้อย เมื่อเทียบกับขนาดของอวัยวะ ทำให้การเพาะเชื้อให้ผลลบ การฉีด *P. marneffeii* ในรูป yeast phase ให้ผลคล้ายคลึงกับการฉีด conidia ซึ่งเป็น mold phase เชื้อ *P. marneffeii* ที่แยกได้จากอวัยวะดังกล่าว จะทดสอบโดยอาศัยรูปร่างลักษณะโคโลนี และการเปลี่ยนรูปเป็น yeast phase เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร Brain heart infusion agar ที่ 37 °C

การศึกษาเกี่ยวกับ *P. marneffeii* ไม่จำเป็นการศึกษาการเกิดโรค หรือการแยกเชื้อ

จากคิน โดยวิธี animal inoculation ก็ดี หาก
จะใช้ mice หรือ rats เป็น animal model ควร
ทำให้สัตว์ทดลองที่จะใช้ มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง
เสียก่อน โดยการฉายรังสี (Irradiation) หรือ
การให้ยากภูมิคุ้มกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Supparatpinyo K. Penicillosis marneffeii
report of three cases from Maharaj Nakorn
Chiang Mai Hospital. เชียงใหม่เวชสาร
2533 ; 29 : 27 - 32.
2. Supparatpinyo K., Chiewchanvit S.,
Hirunsri P. et al. Penicillium marneffeii
infection in patients infected with human

immunodeficiency virus. Clin Infect Dis
1992 ; 14 : 871 - 874.

3. Segretain G. Penicillium marneffeii n. sp.
agent d'une du systeme reticulo-
endothelial. Mycopathol Mycol Appl 1959;
11 : 327 - 353.