

MODIFIED CHLAMYDOSPORE AGAR FOR ISOLATION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS FROM BIRD EXCRETA

วัลลภ เเงาธรรมสาร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ประสิทธิ์ ฐราวจิตรกุล ภ.บ. (เกียรตินิยม) วท.ม. (จุลชีววิทยา)

กัมพล พันธุ์อำพล พ.บ.

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกเขาและมูลนกพิราบจำนวน 72 ราย ซึ่งเก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ในเขตอำเภอเมืองเชียงใหม่ โดยเอามูลนกมาทำ Suspension ในน้ำเกลือที่มียาปฏิชีวนะ แล้วนำน้ำส่วนที่อยู่ข้างบนมา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ

Modified Chlamyospore agar with Antibiotics

Modified Chlamyospore agar with Antibiotics and Diphenyl

Littman's Oxgall agar with Antibiotics

Littman's Oxgall agar with Antibiotics and Diphenyl

พบว่าสามารถแยกเชื้อราชนิดนี้เป็นจำนวนทั้งสิ้น 28 ราย (38.88%) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ทั้งนี้ จากมูลนกเขา 34.09% (15 จาก 44 ราย) และ จากมูลนกพิราบ 46.42% (13 จาก 28 ราย) นอกจากนี้ยังพบว่า Modified Chlamyospore Agar with Antibiotics และ Littman's Oxgall Agar with Antibiotics มีประสิทธิภาพดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ใส่ Diphenyl โดยสามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ 17 ราย (60.71%) และ 18 ราย (64.28%) ตามลำดับ แต่ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าวร่วมกันจะสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้ 25 ราย (89.28%)

บทนำ

Selective Media สำหรับใช้แยก Human Pathogenic Fungi จาก Clinical Material ที่

มีเชื้อ Saprophytic Microorganism ปนอยู่ด้วย มักเตรียมจาก Sabouraud's Dextrose Agar ที่เพิ่ม Antibacterial Agent คือ Chloro-

mphenicol และ Antifungal agent คือ Cycloheximide อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวสามารถแยก Pathogenic Fungi ได้ Pure Cultures ยกเว้น *Cryptococcus neoformans* ซึ่งจะถูกห้ามการเจริญโดย Cycloheximide (1) ในปี ค.ศ. 1966 Shields และ Ajello(2) ได้เตรียม Selective Media สำหรับใช้แยก *C. neoformans* จากวัณโรคปอด และจากอากาศโดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Creatinine 780 mg; Glucose 10 mg; Chloramphenicol 50 mg; Diphenyl 100 mg; *Guizotia Abyssinica* Extract 200 ml.; Agar 20 gm. และน้ำกลั่น 800 ml. Colony ของเชื้อราชนิดนี้ จะ Absorb สีจาก Extract แล้วให้สีน้ำตาล ต่อมาในปี ค.ศ. 1968 Botard และ Kelley(3) พบว่า Media ดังกล่าว พวก Saprophytic Fungi สามารถขึ้นคลุมได้ภายในเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง จึงได้ปรับปรุง Littman's Oxgall Agar โดยใส่ *Guizotia Abyssinica* seed Extract ปรากฏว่า Colony ของเชื้อราชนิดนี้จะให้สีน้ำตาลอย่างชัดเจน ต้องกินเวลาถึง 3 วัน เมื่อเร็ว ๆ นี้ Vickers และคณะ(4) พบว่า *C. neoformans* และ *Cryptococcus* species อื่น ๆ จะให้ Colony สีน้ำเงินเข้ม แต่ Yeast ชนิดอื่น ๆ จะให้สีจางกว่าเมื่อเลี้ยงบน Chlamyospore Agar ซึ่งมี Trypan Blue อยู่แต่เนื่องจาก Chlamyospore Agar มีอาหารน้อยจึงได้ปรับปรุงโดยเติม Peptone ลงไป 1% ขณะเดียวกันก็เพิ่มสารสำหรับห้ามการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คือ Gentamicin และ Chloramphenicol ดังที่ Dolan(5) แนะนำไว้ และ Diphenyl ซึ่งเป็นสารสำหรับห้ามการเจริญของ Saprophytic Fungi ดังที่ภูมิศักดิ์(6) ได้เขียนรายงานไว้

การทดสอบครั้งนี้ต้องการที่จะหาว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไหน ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกเขาและมูลนกพิราบ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ

1. Modified Chlamyospore agar with Antibiotics (MCA)
2. Modified Chlamyospore agar with Antibiotics and Diphenyl (MCAD)
3. Littman's Oxgall agar with Antibiotics (LOA)
4. Littman's Oxgall agar with Antibiotics and Diphenyl (LOAD)

วัสดุและวิธีการ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

MCA และ MCAD เตรียมจาก Chlamyospore Agar (BBL) ตามวิธีที่บริษัทกำหนดไว้ โดยเพิ่ม Peptone 1% ก่อนที่จะ Autoclave

LOA และ LOAD เตรียมจาก Littman's Oxgall Agar (Difco) ตามวิธีที่บริษัทกำหนดไว้

Antibiotics และ Diphenyl จะเติมเมื่อ Medium Base มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสโดยใช้

Chloramphenicol 20 mg. / Medium Base 1 lit.

Gentamicin 10 mg. / Medium Base 1 lit.

Diphenyl (4% of 95% Ethanol) 10 mi. / Medium Base 1 Lit.

การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans*

มุลนกเขาและมุลนกพิราบ จำนวน 72 ราย เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ภายในเขตอำเภอเมืองเชียงใหม่ โดยใช้ไม้กีดกันที่ปราศจากเชื้อ ตักใส่ Sterile Screw Cap Bottle ขนาด 1 ออนซ์ จากนั้นนำมาแยกเชื้อ *C. neoformans* ตามวิธีที่ได้ปรับปรุงมาจาก Tharavichitkul และคณะ(7) โดยนำมุลนกลงมา 5 กรัม ใส่ในหลอดแก้วแล้วเติม Sterile Physiologic Saline Solution 30 ml. ซึ่งมี Chloramphenicol 20 mcg/ml. และ Gentamicin 10 mcg/ml. บดด้วยจุกคอร์ก เขย่า 5 นาที ให้มุลนกลงกระจาย แล้วทิ้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นคูลน้ำส่วนที่อยู่ข้างบนมาทำให้เจือจาง 10 เท่า แล้วจึงนำไปลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด คือ MCA, MCAD, LOA และ LOAD โดยใส่จานละ 0.1 ml. แล้ว Streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอาจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซนติเกรด ตรวจดู Yeast-Like Colonies ทุกวันจนครบ 7 วัน ถ้าพบ Budding Yeast Cells with Capsule หลังจากการย้อมด้วย India Ink ก็นำไป Subculture บน Sabouraud Dextrose Agar Slant จากนั้นนำไป Identify ตามวิธีของ Ajello และคณะ(8) ดังนี้

1. ให้ Yeast-like Colonies ซึ่งประกอบด้วย Budding yeast cells แต่ไม่มี Mycelium
2. มี Capsule
3. สามารถเจริญที่ 37 องศาเซนติเกรด
4. สามารถสร้าง Urease

5. สามารถ Assimilate Glucose, Galactose และ Sucrose แต่จะไม่ Assimilate Lactose, Melibiose และ Nitrate

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ *C. neoformans* ซึ่งเป็น Known Culture เป็น positive Control

ผลการทดลอง

จากมุลนกเขาและนกพิราบ จำนวน 72 ราย ที่นำมาตรวจแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ปรากฏว่าพบเชื้อรวมทั้งสิ้น 28 ราย คิดเป็น 38.88% คือพบจากมุลนกเขา 15 ราย ใน 44 ราย คิดเป็น 34.09% และพบจากมุลนกพิราบ 13 ราย ใน 28 ราย คิดเป็น 46.42% ดังแสดงผลในตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ในการตรวจแยกเชื้อ *C. neoformans* พบว่าทั้ง Modified Chlamyospore Agar with Antibiotics และ Littman's Oxgall Agar with Antibiotics มีประสิทธิภาพดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น และต่างก็มีประสิทธิภาพพอๆ กันด้วย คือ สามารถตรวจแยกเชื้อดังกล่าวได้ 18 Isolates (64.28%) และ 17 Isolates (60.71%) ตามลำดับ ขณะเดียวกันพบว่า LOAD มีประสิทธิภาพต่ำสุดคือ สามารถแยกเชื้อได้เพียง 3 Isolates (17.86%) แต่ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MCA และ LOA ร่วมกันจะสามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ถึง 25 isolates คิดเป็น 89.28% ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

จากตารางที่ 4 และรูปภาพที่ 1 พบว่าหลังจากเพาะเชื้อจากมุลนกลงเพียง ๒ วัน บน MCA และ LOA ก็สามารแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ 11 และ 12 Isolates ตามลำดับ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ Diphenyl จะแยกเชื้อได้ไม่เกิน 3 Isolates

Table 1 Isolation of 28 Isolates of *Cryptococcus neoformans* from 72 Bird Excreta.

Kinds of Bird Excreta	No. Specimens	No. Positive	Percent Positive
Doves	44	15	34.09
Spotted-necked Dove	24	11	45.83
Zebra Dove	10	2	20.00
Ring Dove	10	2	20.00
Pigeon	28	13	46.42
Total	72	28	38.88

Table 2 Isolation of 28 Isolates of *C. neoformans* on four kinds of plating media.

Kinds of Bird Excreta	No. of Organisms Isolated								
	Total	MCA	%	MCAD	%	LOA	%	LOAD	%
Doves	15	9	60.00	5	33.33	9	60.00	5	33.33
Pigeon	13	9	69.23	6	46.15	8	61.54	0	0
Total	28	18	64.28	11	39.28	17	60.71	5	17.86

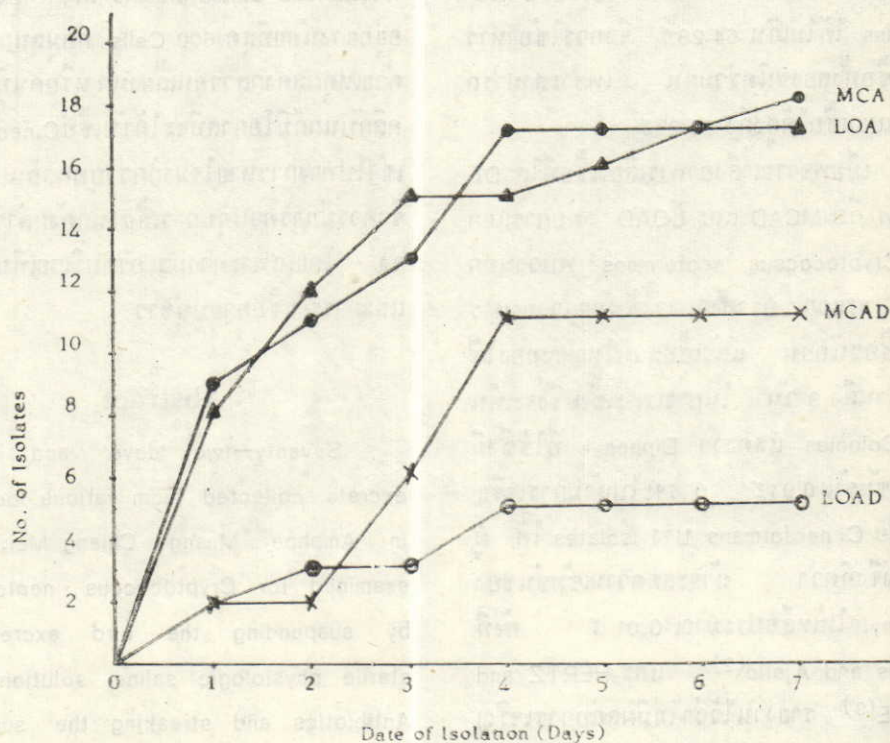
Table 3 Comparison of Modified Chlamyospore agar with Antibiotics and Littman's Oxgall agar with Antibiotics for Isolation of 28 Isolates of *C. neoformans*

Kinds of Bird Excreta	No. of Organisms isolated					
	Total	Only MCA	Only LOA	Both MCA and LOA	MCA and/or LOA	Percent
Doves	15	4	4	5	13	86.66
Pigeon	13	4	3	5	12	92.31
Total	28	8	7	10	25	89.28

Table 4 Relation between the date of Isolation and number of isolates of *C. neoformans* on four kinds of plating media

Date of Isolation (Days)	No. of Organisms Isolated			
	MCA	MCAD	LOA	LOAD
1	9	1	8	1
2	11	1	12	3
3	13	6	15	3
4	17	11	15	5
5	17	11	16	5
6	17	11	17	5
7	18	11	17	5

Figure 1 Relation between the date of isolation and number of isolates of *C. neoformans* on four kinds of plating media.



บทวิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อพวก MCA และ LOA มีประสิทธิภาพดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ในการตรวจแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกเขาและมูลนกพิราบ นอกจากนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด ยังมีประสิทธิภาพพอ ๆ กันด้วย คือ สามารถตรวจพบเชื้อได้ 64.26% และ 60.71% ตามลำดับ แต่ถ้าพิจารณาดีของ Colony ของเชื้อ *C. neoformans* ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสอง พบว่า Colony ที่ขึ้นบน MCA จะให้สี Dark Blue ขณะที่ Yeast ชนิดอื่นให้สี Light Blue ดังผลการทดลองของ Vickers และคณะ⁽⁴⁾ จึงง่ายต่อการตรวจแยกกว่า Colony ที่ขึ้นบน LOA ซึ่ง Yeast เกือบทุกชนิดให้สี Gray-Blue อย่างไรก็ตามการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 1 ชนิด สามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ไม่เกิน 64.28% จึงควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน เพราะสามารถตรวจแยกเชื้อได้สูงถึง 89.28%

เมื่อพิจารณาถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ Diphenyl คือ MCAD และ LOAD ต่อการแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* พบว่านอกจาก จะแยกเชื้อราดังกล่าวได้น้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น แล้วเชื้อส่วนใหญ่ยังต้องใช้เวลานานถึง 3 วัน ในการเพาะเชื้อ จึงจะเห็นเป็น Colonies แสดงว่า Diphenyl ที่ใช้ซึ่งมีความเข้มข้น 0.04% อาจจะไปห้ามการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* บาง Isolates ได้ ผู้ทดลองจึงคิดว่า ถ้าจะลดความเข้มข้นของ Diphenyl ให้เหลือประมาณ 0.01% ดังที่ Shields and Ajello⁽²⁾ และ HERTZ and LeVINE⁽⁹⁾ รายงานไว้ว่าไม่มีผลต่อการเจริญ

เติบโตของ Yeast เช่น *C. neoformans* แต่ทำให้การเจริญของเชื้อราพวก Contaminants ลดลง อาจจะทำให้การแยกเชื้อราดังกล่าวมีประสิทธิภาพมากขึ้น เป็นเรื่องที่น่าจะได้มีการทดลองต่อไป

สำหรับผลการตรวจแยกเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบ และมูลนกเขาพบว่าแยกได้เพียง 38.88% ซึ่งต่ำกว่าผลการทดลองของ THARAVICHIKUL และพวก⁽⁷⁾ ที่รายงานไว้ในปี 1973 ทั้งนี้เนื่องจากผู้เลี้ยงนกได้เพิ่มการเอาใจใส่ในเรื่องความสะอาดในบริเวณที่นกอาศัยอยู่ จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบครั้งหนึ่งลดลง แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่ได้ความหมายว่ามูลนกที่เหลืออีก 44 ราย จะไม่มีเชื้ออยู่ เนื่องจากต้องนำมูลนกมาทำ Suspension และทำให้เจือจางไปถึง 600 เท่า เพราะฉะนั้นการที่จะแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ ก็ต้องมีเชื้ออยู่อย่างน้อยที่สุด 600 Cells ต่อมูลนก 1 กรัม ด้วยเหตุผลดังกล่าวคนเลี้ยงนก หรือคนที่ไปคลุกคลีกับนกก็มีโอกาสที่จะได้รับเชื้อ *C. neoformans* เข้าไปทางการหายใจมากกว่าบุคคลอื่น ๆ ⁽¹⁰⁾ จึงควรมีการควบคุมการเลี้ยงนกดังกล่าวอย่างจริงจัง โดยเฉพาะความสะอาดบริเวณที่นกอาศัย และการฆ่าเชื้อด้วยปูนขาว

Abstract

Seventy-two dove and pigeon excreta collected from various locations in Amphoe Muang Chiang Mai, were examined for *Cryptococcus neoformans* by suspending the bird excreta in sterile physiologic saline solution with Antibiotics and streaking the superna-

tant on four different media: Modified Chlamyospore Agar with Antibiotics, Modified Chlamyospore agar with Antibiotics and Diphenyl, Littman's Oxgall Agar with Antibiotics, and Littman's Oxgall agar with Antibiotics and Diphenyl. *Cryptococcus neoformans* were totally isolated from 28 specimens (38.88%) which were 15 of 44 (34.09%) dove excreta and 13 of 28 (46.42%) pigeon excreta. We found Modified Chlamyospore agar with Antibiotics and Littman's Oxgall agar with Antibiotics could isolate this fungus in equal efficiency (64.28% and 60.71% respectively) whereas others showed lower percentages. However the combined use of both media yielded higher results (89.28).

References

1. Georg, L.K., Ajello, L. and Papageorge, C.: Use of cycloheximide in the selective isolation of fungi pathogenic to man. *J. Lab. Clin. Med.* 44:422-428, 1954.
2. Shields, A.B. and Ajello, L.: Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 151:208-209, 1966.
3. Botard, R.W. and Kelley, D.C.: Modified Littman's Oxgall Agar to isolate *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Microbiol.* 16:689-690, 1968.
4. Vickers, R.M., McElligott, J.J. Jr., Rihs, J.D. and Postic, B.: Medium containing trypan blue and antibiotics for the detection of *Cryptococcus neoformans* in clinical samples. 27: 38-42, 1974.
5. Dolan, C.T.: Optimal combination and concentration of antibiotics in media for isolation of pathogenic fungi and *Nocardia asteroides*. *Appl. Microbiol.* 21:195-197, 1971.
6. Bhumisuk pramrechayan: Effect of diphenyl on growth of fungi. Term paper for the B.Sc., Fac. Ass. Med. Sc., Chiangmai University 1976.
7. Tharavichitkul, P., Kanjanasthiti, P. and Panasampol, K.: Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in dove excreta. *Chiang Mai Med. Bull.* 12: 91-97, 1973.
8. Ajello, L., Georg, L.K., Kaplan, W. and Kaufman, L.: Laboratory manual for medical mycology. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, CDC, Atlanta 22, Georgia 1963.
9. Hertz, M.R., and Levine, M.: A fungistatic medium for enumeration of yeasts. *Food Res.* 7: 430-441 1942.
10. Walter, J.E. and Atchison, R.W.: Epidemiological and immunological studies of *Cryptococcus neoformans*. *J. Eact.* 92:82, 1966.