นิพนธ์ต้นฉบับ
(Original article)

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Scedosporium boydii* และ *Scedosporium prolificans*

วัชรมาศ ม่วงแก้ว ธันวา วงษ์สุก พจมาน ผู้มีสัตย์ สันต์ สุวรรณมณี นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะของสารอาหารแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความต้องการของเชื้อ การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Scedosporium boydii* และ *Scedosporium prolificans* ซึ่งจะศึกษาระหว่าง selective media และอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีการเติมสารอาหารเพิ่มลงไป ซึ่งทำการศึกษาโดยการใส่อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแต่ละชนิดในถาดเลี้ยงเชื้อชนิด 6 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและศึกษาสัณฐานวิทยาของ *S. boydii* และ *S. prolificans* จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+10%FBS มีการเจริญเติบโตในแต่ละวันมากที่สุด และเมื่อวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีในวันที่ 4 ได้เท่ากับ 31.67± 1.53 และ 25.33± 2.36 มิลลิเมตร และมีอัตราการเจริญเติบโตคือ 7.92 และ 6.33 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ สำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาจากการสังเกตโคโลนีด้วยตาเปล่า พบว่าโคโลนีของเชื้อ *S. boydii* เจริญแผ่กว้าง มีสีขาว ปุย และค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้น ส่วนเชื้อ *S. prolificans* จะมีลักษณะโคโลนีคล้ายกันคือ เจริญแผ่กว้าง มีสีเทาอ่อน ปนขาว เมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น โคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นจะเป็นสีดำ ในส่วนของลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมด้วย Lactophenol cotton blue พบว่าลักษณะโคนิเดีย ของแต่ละเชื้อในอาหารที่ต่างกันนั้นไม่มีความแตกต่างกัน คือ มีรูปร่างทรงกลมถึงค่อนข้างกลม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+10%FBS เหมาะสมที่จะใช้เป็นทางเลือกในการนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตรวดเร็วขึ้น

คำสำคัญ: *Scedosporium boydii Scedosporium prolificans* selective media อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน สัณฐานวิทยา

ผู้นิพนธ์หลัก:
นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
420/6 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
อีเมล์: natthanej.lup@mahidol.ac.th

The influence of culture media on growth and morphology of *Scedosporium boydii* and *Scedosporium prolificans*

Watcharamat Muangkaew, Thanwa Wongsuk,
Potjaman Pumeesat, San Suwanmanee, Natthanej Luplertlop
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Abstract

The culture media for fungal cultivation contained several specific and various nutrients in order to support the growth of fungal. This study aimed to determine growth and morphology of *Scedosporium boydii* and *Scedosporium prolificans* on different types of culture media. The selective media and standard nutrient added media were used to study the growth rate and morphology of *S. boydii* and *S. prolificans* by adding each medium into 6 well plates. Each type of medium was used to culture both *S. boydii* and *S. prolificans* and incubated at 37˚C condition for 4 days. The growth rate was determined by colonies diameter measurement. Morphological analysis was determined in *S. boydii* and *S. prolificans* in different types of culture medium. The results showed that colonies of *S. boydii* and *S. prolificans* on SDA+10% Fetal Bovine Serum, (FBS) exhibited larger size than colonies growing on other culture media on the fourth day of cultivation (31.67 ± 1.53 and 25.33± 2.36 mm respectively). The growth rate of *S. boydii* and *S. prolificans* was 7.92 and 6.33 mm/day respectively. The morphological study of *S. boydii* colony showed wide expanded, white color, and gradually changed to gray color. *S. prolificans* colony showed wide expanded, gray-white color, and gradually changed to gray and black color. In addition, the lactophenol cotton blue stain showed no difference in conidia shape of both *S. boydii* and *S. prolificans* (globose-subglobose shape). Therefore, this study demonstrated that SDA+10% FBS represented proper and alternative medium choice of *S. boydii* and *S. prolificans* culture for rapid growth culture system

Keywords: *Scedosporium boydii, Scedosporium prolificans,* selective media, basic culture media, morphology

Corresponding author:
Natthanej Luplertlop
Department of Microbiology and Immunology
Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University
420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400
E-mail: natthanej.lup@mahidol.ac.th

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์นั้น เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ มีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกันไป โดยจะแบ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราทั่วไป เช่น Potato dextrose agar (PDA) จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน สำหรับการเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อราและยีสต์ ที่มีการกระตุ้นการสร้างสปอร์และ pigment ของเชื้อรา[1] เป็นต้น ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective media เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเชื้อรากลุ่ม Dermatophytes ที่นิยมใช้คือ Dermatophyte Test Medium (DTM)[2] สำหรับยีสต์กลุ่ม *Candida albicans* อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ส่วนมากจะเป็น Malt extract broth หรือ 2-4% Glucose yeast extract peptone water[3] เป็นต้น

เชื้อรา *Scedosporium* spp. เป็นเชื้อราที่พบได้ตามบริเวณที่มีสิ่งสกปรกทับถมกันเป็นจำนวนมาก เช่น แหล่งน้ำเน่าเสีย แหล่งน้ำขนาดใหญ่ กองขยะสด บ่อพักสิ่งปฏิกูล รวมถึงในพื้นดินที่มีความชื้นตลอดเวลาไม่ถูกแสงแดด แม้แต่ในน้ำตก หรือทะเลที่มีของเสียหรือขยะปนเปื้อนมาก ๆ[4] เพราะเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เมื่อร่างกายสัมผัสกับแหล่งการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดนี้ ไม่ว่าจะเป็นทางเดินหายใจโดยพบมากในคนที่สำลักน้ำ หรือทางผิวหนังที่เป็นแผล ก็มีโอกาสสูงมากที่เชื้อราจะเข้าไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ตามอวัยวะในร่างกาย เช่น ปอด หัวใจ ตับ สมอง[4,5] ถ้าร่างกายมีภูมิต้านทานลดลง เชื้อราชนิดนี้จะกระจายตัวได้ดี และเจริญเติบโตแทรกซึมไปตามอวัยวะต่างๆ ที่มีสารอาหารโปรตีน และไขมันสูง พบว่าตำแหน่งที่เชื้อเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ดีคือ เนื้อสมอง เพราะส่วนประกอบหลักของสมองคือ ไขมัน และเข้าทำลายระบบประสาทส่วนกลางหรือประสาทส่วนการรับรู้ภายใน 48 ถึง 72 ชั่วโมง ทำให้ส่วนต่าง ๆ ในร่างกายหยุดการทำงาน[4,5]

การทดลองในครั้งนี้จะให้ความสนใจในเชื้อ *Scedosporium boydii* และ *Scedosporium prolificans* เนื่องจากการติดเชื้อ *S. boydii* จะมีอาการคล้ายคลึงกับเชื้อราที่เกิดจากเชื้อ *Aspergillus* ดังนั้นจึงทำให้การรักษาไม่ได้ผล จากการดื้อยา amphotericin B ที่ไม่สามารถใช้กับ *S. boydii* ได้เหมือนกับยาที่ใช้รักษาโรค ที่เกิดจากการติดเชื้อราทั่ว ๆ ไป[4] การจำแนกลักษณะของเส้นใยของราชนิดนี้ในเนื้อเยื่อ มีความคล้ายคลึงกับราที่สร้างเส้นใยชนิดอื่น ทำให้การวินิจฉัยผิดพลาด ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ทำให้ การวิเคราะห์ผลไม่ทันท่วงทีและทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของผู้ป่วยลดลง[4] ส่วนเชื้อ *Scedosporium prolificans* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรง เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยารักษาโรค[6] เชื้อราที่ศึกษาเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญมาก ในการติดเชื้อที่สมองการหาวิธีเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดี เหมาะสม เจริญดีและเร็ว จึงมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค ซึ่งการตรวจหาเชื้อรา *Scedosporium* spp. จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective media[7] เช่น Dichloran rose bengal chloramphenicol agar + benomyl (DRBC+benomyl) เพื่อการแยกเชื้อ โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามักจะไม่มี selective media ชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและลักษณะของสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Scedosporium* spp. โดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *S. boydii* และ *S. Prolificans* ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบในการทดลองประกอบด้วย Sabouraud dextrose agar (SDA), SDA+10% FBS, Potato dextrose agar (PDA), Brain heart infusion agar + 5% Human blood (BBHI agar) และ Dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC)+10µg/ml benomyl

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา Scedosporium โดยใช้สายพันธุ์มาตรฐาน *S. boydii* และ *S. prolificans*

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *S. boydii* CBS 120157 และ *S. prolificans* CM 124 (Dr. Ana Alastruey-lzquierdo;

servicio de Micologia, Instituto de Salud Carlos, Madrid, Spain) จาก stock culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA[8,9] เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขี่ยโคโลนีของเชื้อรา โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ เขี่ยเชื้อใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ประมาณ 10 มิลลิลิตร ให้ขุ่น นำโคนิเดีย suspension มานับจำนวน นับเฉพาะโคนิเดียไม่นับสายรา ด้วย hemocytometer และปรับโคนิเดียเป็น $1x10^5$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

การศึกษาในครั้งนี้ศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ SDA (Oxoid, England), SDA+10% FBS (Gibco, USA), PDA (Difco, France), BBHI agar (Difco, France) และ DRBC+10µg/ml benomyl (Oxoid, England) ซึ่งเป็น selective media สำหรับเชื้อ *S. boydii* และ *S. Prolificans* เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิดใส่ใน 6 well-plate ปริมาณหลุมละ 3 มิลลิลิตร[8,9] โดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์การของโคโลนีและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจากรูปถ่ายโคโลนี และศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการทำ slide culture[10]

2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี

นำโคนิเดียของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* ที่ความเข้มข้น $1x10^5$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มา 20 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด แต่ละเชื้อจะทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และบันทึกลักษณะโคโลนีโดยการถ่ายรูป ในวันที่ 1 ถึง 4

2.2 การศึกษารูปร่าง (morphology) เชื้อรา ด้วยเทคนิค slide culture[10]

นำโคนิเดียของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* ที่ความเข้มข้น $1x10^5$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มา 20 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด นำ cover slip ที่ปราศจากเชื้อ ปักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่มีโคนิเดียของเชื้ออยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน หลังจากนั้นถอด cover slip ออกมาย้อมด้วย Lactophenol cotton blue และนำไปศึกษาดูลักษณะสายราด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิเคราะห์สถิติ จากการใช้ T-test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระแก่กัน โดยใช้โปรแกรม SPSS v.16.0

ผลการศึกษา

ผลการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวิธีการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

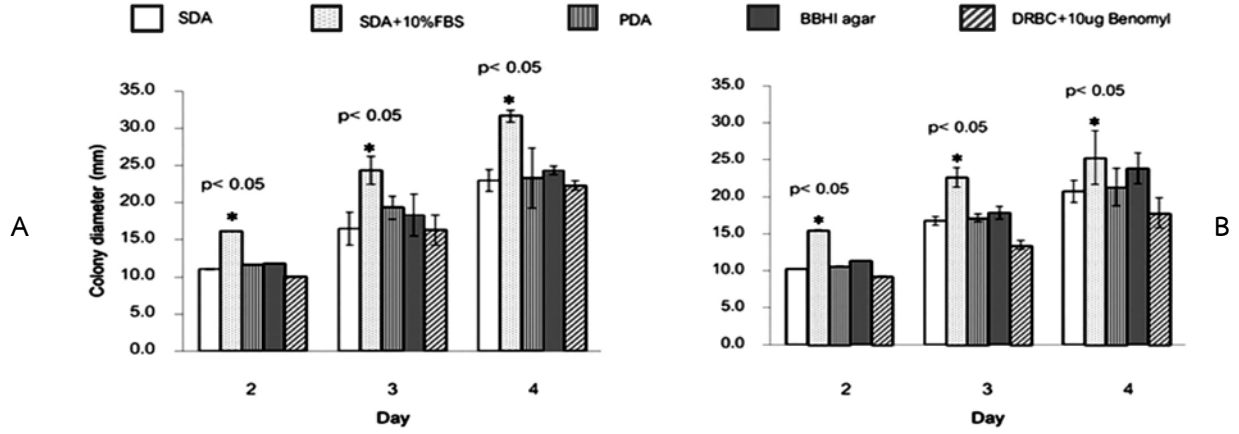
การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* จากการนำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมาคำนวณ พบว่าเชื้อ *S. boydii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+10% FBS จะมีการเจริญเติบโตมากที่สุด ถัดมาจะเป็น BBHI agar, PDA, SDA และ DRBC+ 10 µg benomyl โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ได้ 31.67, 24.33, 23.33, 23.33 และ 22.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน และ มีค่าเฉลี่ยในการเจริญเติบโต (growth rate) เท่ากับ 7.92, 6.09, 5.83, 5.83 และ 5.09 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *S. prolificans* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+10% FBS จะมีการเจริญเติบโตมากที่สุด ถัดมาจะเป็น BBHI agar PDA SDA และ DRBC+ 10 µg benomyl โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ได้ 25.33 , 23.83, 21.33, 20.75 และ 17.83 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ growth rate เท่ากับ 6.33, 5.96, 5.33, 5.18 และ 4.46 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ รูปที่ 1 โคโลนีบน SDA + 10% FBS ของเชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ให้ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่าบน SDA โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

จากรูปที่ 1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* ในวันที่ 2, 3 และ 4 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA + 10% FBS ให้ผลการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละวัน

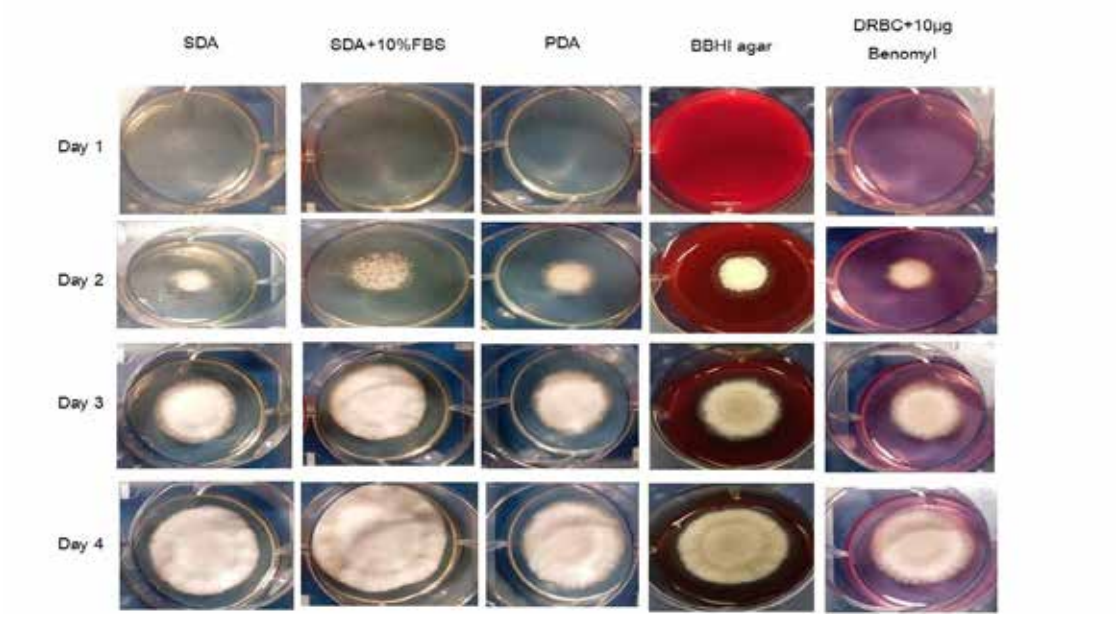
ตารางที่ 1 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.) ± SD		อัตราการเจริญ (มม./วัน)	
	S. boydii	*S. prolificans*	*S. boydii*	*S. prolificans*
SDA	23.33 ± 0.58	20.75 ± 1.61	5.83	5.18
SDA+10%FBS	31.67 ± 1.53	25.33 ± 2.36	7.92	6.33
PDA	23.33 ± 0.58	21.33 ± 1.53	5.83	5.33
BBHI agar	24.33 ± 2.31	23.83 ± 0.29	6.09	5.96
DRBC+10 µg/ml benomyl	22.33 ± 0.58	17.83 ± 0.29	5.59	4.46

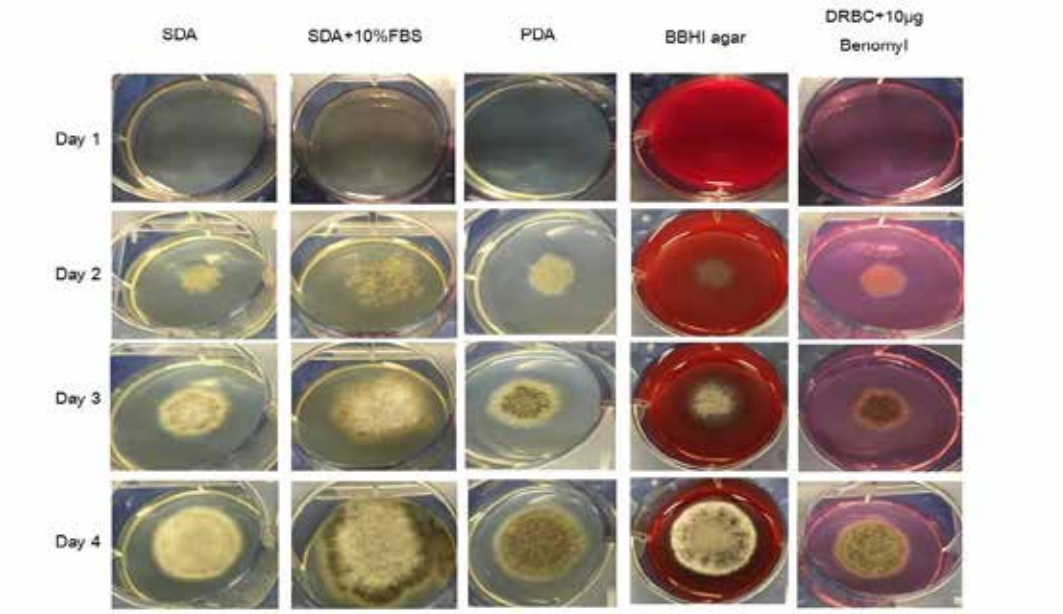
โดยเชื้อ *S. boydii* ให้ขนาดโคโลนีบน SDA + 10% FBS มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 16.17 ± 2.84 mm ในวันที่สอง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับ โคโลนีในวันที่สาม บน PDA, BBHI agar, SDA และ DRBC + 10 µg benomyl (19.33 ± 0.44, 18.33 ± 0.58, 17.17 ± 0.76, 16.33 ± 1.44 มิลลิเมตร) ตามลำดับเช่นเดียวกัน ขนาดโคโลนีบน SDA + 10% FBS ในวันที่สาม มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 24.33 ± 0.58 mm ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่า โคโลนีในวันที่สี่ บน PDA , BBHI agar, SDA และ DRBC + 10 µg benomyl (24.33 ± 2.31, 23.33 ± 0.58, 23.33 ± 0.58, 22.33 ± 0.58 มิลลิเมตร) ตามลำดับ ในส่วนของเชื้อ *S. prolificans* ให้ผลไปในแนวทางเดียวกันกับ *S. boydii* คือ ให้ขนาดโคโลนีบน SDA + 10% FBS มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 15.50 ± 0.87 mm ในวันที่สอง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่า โคโลนีในวันที่สอง บน DRBC + 10 µg/ml benomyl คือ 9.33 ± 0.58 และมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับ โคโลนีในวันที่สาม บน BBHI agar, PDA และ SDA (17.83 ± 2.02, 17.17 ± 2.57, 16.75 ± 3.62 มิลลิเมตร) ตามลำดับ เช่นเดียวกัน ขนาดโคโลนีบน SDA + 10% FBS ในวันที่สาม มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 22.67 ± 2.08 mm ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่า โคโลนีในวันที่สี่ บน PDA, SDA และ DRBC + 10 µg benomyl (21.33 ± 1.53, 20.75 ± 1.61, 17.83 ± 0.29 มิลลิเมตร) ตามลำดับ และ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับ โคโลนีในวันที่สี่บน BBHI agar คือ 23.83 ± 0.29 mm ดังแสดงดังรูปที่ 1 และ 2 ซึ่งโคโลนีบน SDA + 10% FBS ของเชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ให้ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่าบน SDA โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกันในแต่ละวัน



รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อ (A) *S. boydii* (B) *S. prolificans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในวันที่ 2, 3 และ 4 (ค่า $p < 0.05$)



รูปที่ 2 การเจริญเติบของโคโลนีเชื้อรา *S. boydii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด



รูปที่ 3 การเจริญเติบของโคโลนีเชื้อรา *S. prolificans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด

■ ผลของลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)

- ลักษณะโคโลนีที่เห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic)

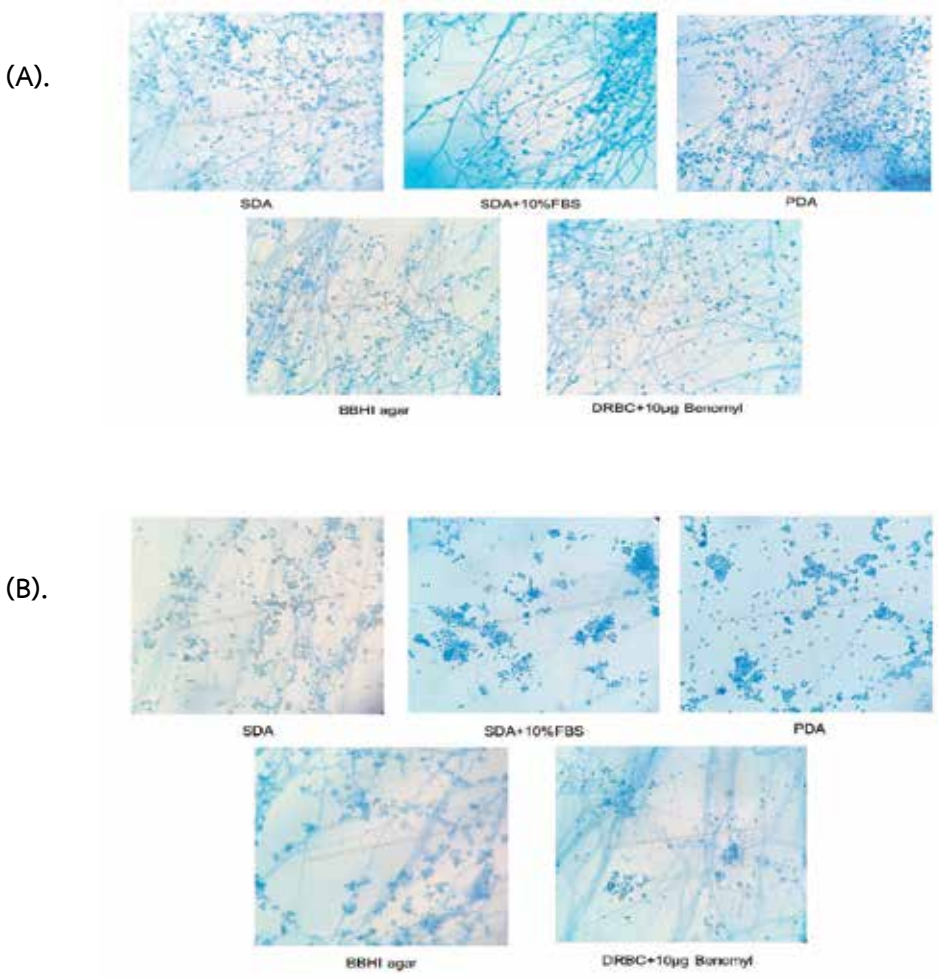
จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* พบว่า *S. boydii* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBHI agar โคโลนีมีลักษณะเจริญแผ่กว้าง โคโลนีเริ่มแรกจะมีสีขาว ปุย แล้วค่อย ๆ เปลี่ยนสีเป็นสีเทาอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 4 ชนิด คือ SDA SDA+10% FBS, PDA และ DRBC+10 µg/ml benomyl จะมีลักษณะโคโลนีเจริญแผ่กว้างเหมือนกัน แต่โคโลนีมีสีขาว ปุย ดังรูปที่ 2 ส่วนเชื้อ *S. prolificans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด จะมีลักษณะโคโลนีคล้ายกันคือ โคโลนีเจริญแผ่กว้าง มีสีเทาอ่อน ปนขาว เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อนานขึ้นโคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีเทา ดังรูปที่ 3

- ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ (microscopic)

ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด โดยการทำ slide culture และย้อมด้วย lactophenol cotton blue พบว่า เชื้อ *S. boydii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด มีลักษณะไม่แตกต่างกันคือ สายรา มีผนังกั้น มี conidiogenous cells รูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) และ sessile conidia รูปร่างทรงกลม ถึงค่อนข้างกลม (globose – subglobose) conidia อยู่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ไม่พบ graphium ที่มีลักษณะก้านชูสปอร์ยาวรวมกันเป็นมัดที่ส่วนปลายบานออก คล้ายกับเชื้อ *S. prolificans* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด มีลักษณะไม่แตกต่างกัน คือสายรา มีผนังกั้น มี conidiogenous cells รูปร่างทรง flask shaped และ sessile conidia รูปร่างทรงกลม ถึงค่อนข้างกลม (globose – subglobose) conidia อยู่เป็นกลุ่ม ๆ ดังรูปที่ 4

■ อภิปรายผล

เชื้อ *Scedosporium* spp. จัดเป็นเชื้อราก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic infections) ในกลุ่ม Microascaceae เป็นเชื้อที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ดินและแหล่งน้ำเน่าเสีย พบรายงานการติดเชื้อ *Scedosporium* spp. ใน ปอด โพรงจมูก กระดูก ข้อ ตา และสมอง[4,5] ของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำในหลายภูมิภาคของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบรายงานว่าเป็นเชื้อราก่อโรคแบบฉวยโอกาสในปอดของผู้ป่วย cystic fibrosis เป็นอันดับสองรองจาก *Aspergillus* spp. ในยุโรป



รูปที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา (A). *S. boydii* (B). *S. prolificans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X (eyepiece) X 40X (objective lens) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด

และออสเตรเลีย[11-13] นอกจากนี้พบรายงานการติดเชื้อ *Scedosporium* spp. ในร่างกายตามมาหลังจากผู้ป่วยจมน้ำ *S. Apiospermum*[14-16] *S. aurantiacum*[13, 17], *S. boydii*[18,19] เช่นเดียวกับประเทศไทยพบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. apiospermum* ในสมองหลังจากจมน้ำ[20] รวมถึงพบการติดเชื้อ *S. boydii* และ *S. apiospermum* ในสมองของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนไตด้วย[21,22] และในปี 2557 มีรายงานผู้ติดเชื้อ *S. prolificans* แบบ systemic infections ในผู้ป่วย acute myeloid leukemia ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อราหลายชนิด[23] เนื่องจากเชื้อรา *Scedosporium* spp. เจริญเติบโตช้า ใช้เวลาอย่างน้อย 4-7 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประจำวันของห้องปฏิบัติการเชื้อรา ได้แก่ SDA และ PDA ถึงจะแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อในกลุ่มนี้ ดังนั้นบทบาทของห้องปฏิบัติการเชื้อราทางการแพทย์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะเพาะเลี้ยงเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจและพิสูจน์ชนิดของเชื้อราได้อย่างรวดเร็ว เพื่อเป็นประโยชน์และปรับเปลี่ยนแนวทางการรักษาและการเลือกใช้ยาที่เหมาะสมแก่แพทย์ต่อไป เพราะฉะนั้นจึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและลักษณะของสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Scedosporium* spp. โดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *S. boydii* และ *S. prolificans* เป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* เจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ 37ºC เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 25ºC จึงเป็นเหตุผลของการทดลองในงานวิจัยที่เลือก อุณหภูมิ 37ºC ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด พบว่า SDA + 10% FBS ให้ผลการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละวัน โดยเชื้อ *S. boydii* ให้ขนาดโคโลนีบน SDA + 10% FBS มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 16.17 ± 2.84, 24.33 ± 0.58 และ 31.67 มิลลิเมตร ในวันที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ในส่วนของเชื้อ *S. prolificans* ให้ผลไปในแนวทางเดียวกันกับ *S. boydii* คือ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 15.50 ± 0.87, 22.67 ± 2.08 และ 25.33 ± 2.36 มิลลิเมตร ในวันที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ดังแสดงดังรูปที่ 1 ถึง 3 โดยโคโลนีบน SDA + 10% FBS ของเชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ให้ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่าบน SDA โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกันในแต่ละวัน ซึ่งลักษณะของสายราและโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันยังคงลักษณะจำเพาะของสายราและโคนิเดียที่บ่งชี้และใช้พิสูจน์ชนิดของเชื้อว่าคือ *S. boydii* และ *S. prolificans* ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงอาจเลือกใช้ SDA + 10% FBS ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* เนื่องจากเชื้อโตอย่างรวดเร็วและสร้างลักษณะจำเพาะของเชื้อราช่วยในการใช้พิสูจน์ชนิดของเชื้อได้เร็วขึ้นอย่างน้อย 24-48 ชั่วโมง อีกทั้งส่งผลให้สามารถเก็บโคนิเดียเพื่อนำไปทดสอบความไวต่อยาและได้ผลนำไปปรับเปลี่ยนการรักษามีประโยชน์ต่อผู้ป่วยได้ทันท่วงที นอกจากนี้ทำให้การทดลองและศึกษาวิจัยอื่น ๆ ได้สามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็วและลดข้อจำกัดในการเจริญเติบโตช้าของเชื้อราชนิดนี้ จากการทบทวนรายงานการวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยอื่น ๆ[7] ยังไม่พบการศึกษาการเติม FBS ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นผลการวิจัยเบื้องต้นที่ทำการศึกษาผลของ FBS ต่อการเจริญเติบโตและรูปร่างของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* จึงเป็นที่น่าสนใจยิ่งที่คณะผู้วิจัยจะนำไปศึกษาในเชิงลึกต่อไป อย่างไรก็ตามยังคงต้องคำนึงถึงราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อว่าคุ้มต่อการใช้ในงานประจำวันหรือไม่ เนื่องจาก FBS มีราคาสูงจึงจำเป็นต้องศึกษาในเชื้ออื่น ๆ เพิ่มเติมและเปรียบเทียบราคาต่อไป

■ สรุปผล

อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+10%FBS ช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* มีการเจริญเติบโตได้ดี จากการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+10% FBS สามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออีกทางเลือกที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อดูลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อ *S. boydii* และ *S. prolificans* แทน selective media ชนิด Dichloran rose bengal chloramphenicol agar + benomyl (DRBC+benomyl)

เอกสารอ้างอิง

1. Nisha Rijal. Microbeonline Online Medical Microbiology guide for students and educators [Internet]. Culture media used in Microbiology. Potato Dextrose Agar (PDA): principle, composition and colony characteristics. [Available from http://microbeonline.com/potato-dextrose-agar-pda-principle-composition-colony-characteristics/ updated 2015 June 1; cited 2016 March 25].
2. Singh S, Beena PM. Comparative study of different microscopic techniques and culture media for the isolation of dermatophytes. Indian J of Med Microbiol 2003;21(1):21-4.
3. Kitahara N, Morisaka H, Aoki W., et al. Description of the interaction between *Candida albicans* and macrophages by mixed and quantitative proteome analysis without isolation. AMB Expr 2015; 5(41): doi: 10.1186/s13568-015-0127-2.
4. สมศักดิ์ ศิวิชัย. YES magazine [Internet]. คอลัมน์สาระน่ารู้. รู้จัก Pseudallescheria boydii รามรณะที่ทำร้ายหัวใจแฟนเพลงบิ๊ก. [Available from: http://www.yes-wedo.com/detail_page.php?sub_id=279 updated 2010 Aug 17; cited 2015 Oct 10].
5. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Rev 2008;21(1):157-97.
6. Tosapol P. NPC Safety and Environmental Service Co., Ltd. Rayong. Search for safty [Internet]. เชื้อรามรณะ ภัยร้ายที่(อาจ)ใกล้ตัวคุณ. [Available from: http://www.npcse.co.th/npc_date/npc_previews.asp?id_head=11&id_sub=36&id=823 updated 2012 March 14; cited 2016 March 25].
7. Rainer J, Kaltseis J, Hoog de SG, et al. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antonie van Leeuwenhoek 2008;93:315-22.
8. Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M, et al. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. J World Appl Sci 2013;22(1): doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265.
9. Sharma G, Pandey RR. Influence of culture media on growth colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. J Yeast Fungal Res 2010;1(8):157-64.
10. Rosana Y, Matsuzawa T, Gonoi T, et al. Modified slide culture method for faster and easier identification of Dermatophytes. Microbiol Indones 2014; doi: 10.5454/mi.8.3.7
11. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. Med Mycol 2010;48 Suppl1:S88-97.

12. Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, et al. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. J Cyst Fibros 2015;14(2):237-41.
13. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, et al. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors. Med Mycol 2010;48 Suppl1:S37-44.
14. Chen TC, Ho MW, Chien WC, et al. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a near-drowning patient. J Formos Med Assoc 2015;115(3):213-4.
15. He XH, Wu JY, Wu CJ, et al. *Scedosporium Apiospermum* Infection after Near-drowning. Chin Med J (Engl) 2015;128(15):2119-23.
16. Nakamura Y, Utsumi Y, Suzuki N, et al. Multiple *Scedosporium apiospermum* abscesses in a woman survivor of a tsunami in northeastern Japan: a case report. J Med Case Rep 2011;5(526):1-5.
17. Nakamura Y, Suzuki N, Nakajima Y, et al. *Scedosporium aurantiacum* brain abscess after near-drowning in a survivor of a tsunami in Japan. Respir Investig 2013;51(4):207-11.
18. Ortmann C, Wullenweber J, Brinkmann B, et al. Fatal mycotic aneurysm caused by *Pseudallescheria boydii* after near drowning. Int J Legal Med 2010;124(3):243-7.
19. Mursch K, Trnovec S, Ratz H, et al. Successful treatment of multiple *Pseudallescheria boydii* brain abscesses and ventriculitis/ependymitis in a 2-year-old child after a near-drowning episode. Childs Nerv Syst 2006;22(2):189-92.
20. Leechawengwongs M, Milindankura S, Liengudom A, et al. Multiple *Scedosporium apiospermum* brain abscesses after near-drowning successfully treated with surgery and long-term voriconazole: a case report. Mycoses 2007;50(6):512-6.
21. Satirapoj B, Ruangkanchanasetr P, Treewatchareekorn S, et al. *Pseudallescheria boydii* brain abscess in a renal transplant recipient: first case report in Southeast Asia. Transplant Proc 2008;40(7):2425-7.
22. Larbcharoensub N, Chongtrakool P, Wirojtananugoon C, et al. Treatment of a brain abscess caused by *Scedosporium apiospermum* and *Phaeoacremonium parasiticum* in a renal transplant recipient. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2013;44(3):484-9.
23. Damronglerd P, Phuphuakrat A, Santanirand P, et al. Disseminated *Scedosporium prolificans* infection in a patient with acute myeloid leukemia and prolonged febrile neutropenia. J Infect Dis Antimicrob Agents [case report] 2014;31:101-5.