


การสำรวจและประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อ *Cryptococcus neoformans*

จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ (*Columba livia*) ในกรุงเทพมหานคร



นางสาวปฐมพร คลังวิเชียร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตภาควิชาพยาธิวิทยาที่ส่งโครงงานบัณฑิตวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

SURVEY AND DISINFECTANT DETERMINATION FOR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*
FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS IN BANGKOK

Miss Pratomporn Krangvichain



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสำรวจและประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อ <i>Cryptococcus neoformans</i> จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ (<i>Columba livia</i>) ในกรุงเทพมหานคร
โดย	นางสาวปฐมพร คลังวิเชียร
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ณัฐวีร์ ประภัสสรสกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สิริลักษณ์ สุระเชษฐพงษ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ณัฐวีร์ ประภัสสรสกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สิริลักษณ์ สุระเชษฐพงษ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.วิจิตร บรรณานารา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศิริพรรณ สุคนธ์สิงห์)

ปทุมพร คลังวิเชียร : การสำรวจและประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อ *Cryptococcus neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ (*Columba livia*) ใน กรุงเทพมหานคร. (SURVEY AND DISINFECTANT DETERMINATION FOR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS IN BANGKOK) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. น.สพ. ดร.ณัฐวีร์ ประภัสสรภูถ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.อริยา จินตามพร, อ. สพ.ญ. ดร.สิริลักษณ์ สุระเชษฐพงษ์, 80 หน้า.

Cryptococcus neoformans เป็นเชื้อราฉวยโอกาส ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรค cryptococcosis ทั้งในคนและสัตว์ โดยเฉพาะผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากการแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* พบได้ทั่วโลกนั้น การลดความเสี่ยงการติดเชื้อจึงเป็นวิธีที่สำคัญในด้านสุขอนามัย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อสำรวจเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบใน 11 เขตของกรุงเทพมหานคร ช่วงระยะเวลาปีค.ศ. 2011 ถึง 2012 และประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อ *C. neoformans* ผสมกับสิ่งขับถ่ายนกพิราบ (*Colimba livia*) และเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการทดลอง นำไอโซเลตทั้งหมดแยกวินิจฉัยด้วยการเพาะแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (caffeic acid agar) ระบุตัวตนเชื้อด้วยคุณลักษณะทางชีวเคมี พร้อมทั้งยืนยันเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบ multiplex และประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด (กลุ่มควอเทอนารีแอมโนเนียม กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรด์ และกลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต) ด้วยวิธี Dilution-neutralization (EN 1656:2000) ผลการศึกษา พบเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ จำนวน 18 ตัวอย่างจากทั้งหมด 164 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.97) ซึ่งเขตลาดพร้าวมีอุบัติการณ์พบเชื้อสูงสุด โดยที่ปริมาณเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งมีปริมาณเชื้อมากกว่าสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังสามารถแยกเชื้อได้ทั้งบริเวณภายในและภายนอกอาคาร ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ พบว่า กลุ่มเชื้อ *C. neoformans* ผสมกับสิ่งขับถ่ายนกพิราบมีความทนต่อการถูกทำลายของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดในแง่ของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสสูงกว่ากลุ่มเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเทอนารีแอมโนเนียมมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการทำลายเชื้อ *C. neoformans* ที่ซึ่งมีความแตกต่างของชนิดโฮสต์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้น การศึกษานี้ เชื้อ *C. neoformans* ยังคงมีการแพร่กระจายในบางพื้นที่ของกรุงเทพมหานครและควรใช้น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเทอนารีแอมโนเนียมที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 310 มิลลิกรัมต่อลิตรในระยะเวลา 1 นาที ซึ่งอยู่ในช่วงระดับแนะนำสำหรับนำไปใช้ลดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ภาควิชา	พยาธิวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5475313631 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEYWORDS: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS / DISINFECTANT / PIGEON DROPPINGS / BANGKOK

PRATOMPORN KRANGVICHAIN: SURVEY AND DISINFECTANT DETERMINATION FOR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* FROM PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) DROPPINGS IN BANGKOK. ADVISOR: ASST. PROF. NUVEE PRAPASARAKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. ARIYA CHAINDAMPORN, Ph.D., INSTRUCTOR SIRILAK SURACHETPONG, Ph.D., 80 pp.

Cryptococcus neoformans is an opportunistic yeast causing cryptococcosis, particularly in immunocompromised patients and animals. Due to worldwide distributing of *C. neoformans*, reduction of infectious risk is an importance in hygienic strategy. The objectives were to survey the yeast at 11 districts in Bangkok area during 2011-2012 and to determine disinfectant against *C. neoformans* mixed in pigeon (*Columba livia*) droppings and the pure isolates. All was isolated by selective media (cafeic acid agar) and confirmed by biochemical characteristics and an approved multiplex PCR. The efficacy of three disinfectants; quaternary ammonium compounds, sodium hypochlorite and potassium monopersulfate compounds was determined by dilution-neutralization method (EN 1656:2000). A total of 18 of 164 (10.97%) samples were positive to *C. neoformans* serotype A. There was the highest incidence area at Ladprao district in this study. The number of *C. neoformans* in dried droppings was significantly higher than that of wet condition and it could be found at both indoor and outdoor area. *C. neoformans* mixed in dropping was highly tolerate in term of dose and time exposure to all tested antiseptics rather than that of pure isolates. Quaternary ammonium compound was the most effective antiseptic against all tested *C. neoformans* from different host and environmental sources. In conclusion, *C. neoformans* still commonly distribute at certain area in Bangkok and use of at least 310 ppm of quaternary ammonium compounds for 1 minute is recommended for *C. neoformans* decontamination in environment.

Department: Veterinary Pathology Student's Signature

Field of Study: Veterinary Pathobiology Advisor's Signature

Academic Year: 2013 Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เพราะความเมตตากรุณาอย่างสูงจากอาจารย์หลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. น.สพ. ดร.ณัฐวีร์ ประภัสสรภูล ขอขอบพระคุณอย่างสูง สำหรับคำแนะนำปรึกษา ตรวจสอบ ปรับปรุง แก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งเพื่อให้ งานวิจัยนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ รวมทั้ง ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ท่านแรก รศ. ดร.อริยา จินตามพร สำหรับคำแนะนำ อนุเคราะห์ใช้อ่างอิงคริปโตคอคัส นีโอฟอร์แมนส์ ท่านสอง อ. สพ.ญ. ดร.สิริลักษณ์ สุระเชษฐพงษ์ สำหรับช่วยเหลือเก็บตัวอย่างเชื้อจากแมวที่โรงพยาบาลสัตว์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ รศ. น.สพ. ดร.วิจิตร บรรณนารา สำหรับช่วยเหลือเก็บตัวอย่างเชื้อจากนก และ ขอขอบคุณ อ. ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ ที่กรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ให้คำแนะนำ แนะนำแนวคิด ในการทำงาน

ขอขอบคุณ คุณวารี นิยมธรรม และ สพ.ญ. ดร.ชมพูนุรักษ์ ยุธญาติ สำหรับความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคด้านการเพาะเชื้อ และให้คำปรึกษาแนวทางการทำงาน นอกจากนี้ ขอขอบคุณบุคลากรสนับสนุนวิชาการ นิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจเพื่อให้งานวิจัยนี้บรรลุผลสำเร็จ

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ทุนผู้ช่วยวิจัย สำหรับการสนับสนุน ทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ให้มีคุณภาพและบรรลุผลสำเร็จอย่างราบรื่น

ขอขอบพระคุณครอบครัวและญาติพี่น้อง ตลอดจนเพื่อนทุกคน ที่อยู่เบื้องหลังและให้ กำลังใจของความสำเร็จงานวิจัยนี้ตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 คำสำคัญ.....	3
1.4 Keywords.....	3
1.5 คำถามสำหรับงานวิจัย / สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.6. กรอบแนวคิดการวิจัย.....	4
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	5
2.1 ประวัติการพบเชื้อ <i>C. neoformans</i>	5
2.2 ชีววิทยาของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	6
2.3 ปัจจัยความรุนแรงก่อโรคของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	8
2.4 นิเวศวิทยาของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	12
2.5 พยาธิวิทยาของโรค cryptococcosis.....	13
2.6 ระบาดวิทยา.....	14
2.7 การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ.....	15
2.7.1 การเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อ.....	15
2.7.2 การวินิจฉัยแยกเชื้อ <i>C. neoformans</i>	18
2.7.3 การตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	21
2.8 พฤติกรรมนกพิราบ.....	22
2.9 แนวทางการปนเปื้อนของเชื้อ <i>C. neoformans</i> ในสิ่งแวดล้อม.....	23
บทที่ 3 วิธีการทดลองหรือระเบียบวิธีวิจัย.....	24

3.1 การเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อ <i>C. neoformans</i>	24
3.1.1 การเก็บตัวอย่างจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร	24
3.1.2 การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ	28
3.1.3 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	28
3.2 การศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	29
3.2.1 การตรวจยืนยันเชื้อ <i>C. neoformans</i> ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ชนิด multiplex PCR	29
3.2.2 การจำแนกซีโรไทป์เชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสชนิด multiplex PCR	31
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ	33
3.3.1 เชื้อสำหรับทดสอบ	33
3.3.2 วิธีการยืนยันเชื้อและคุณสมบัติของเชื้อที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ	33
3.3.3 วิธีเตรียมเชื้อ	34
3.3.4 วิธีเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ	34
3.3.5 วิธีทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ	34
3.3.6 วิธีทดสอบกลุ่มควบคุมคุณภาพการทดลอง	35
3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง	37
4.1 การระบาดของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	37
4.1.1 การเก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ	37
4.1.2 การวินิจฉัยแยกเชื้อ	38
4.1.2 การระบุแยกเชื้อ <i>C. neoformans</i>	47
4.2. ผลการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ	49
บทที่ 5 อธิบายและสรุปผลการทดลอง	54
5.1 การแพร่กระจายของเชื้อ <i>C. neoformans</i>	54
5.2 ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ	56
5.3 สรุปผลการวิจัย	58
รายการอ้างอิง	59
ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	72

ภาคผนวก ข อัตราการรอดของเชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> ภายหลังการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อ	75
ภาคผนวก ค ส่วนประกอบของน้ำผลิตภัณฑน้ำยาฆ่าเชื้อ	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	80



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	การทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ <i>C. neoformans</i> และ <i>C. gattii</i>	20
ตารางที่ 2	ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาของน้ำยาฆ่าเชื้อทำลายเชื้อยีสต์	23
ตารางที่ 3	สถานที่เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร	25
ตารางที่ 4	รายละเอียดข้อมูลจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับใช้แยกชนิดเชื้อ <i>C. neoformans</i>	31
ตารางที่ 5	รายละเอียดข้อมูลจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับแยกซีโรไทป์เชื้อ <i>C. neoformans</i>	32
ตารางที่ 6	การแบ่งตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบตามสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง	37
ตารางที่ 7	การแบ่งตัวอย่างตามลักษณะแหล่งชนิดปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบ	37
ตารางที่ 8	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>C. neoformans</i> ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ จำนวน 38 ไอโซเลต	41
ตารางที่ 9	อุบัติการณ์ของเชื้อ <i>C. neoformans</i> จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบทั้ง 3 เขต กรุงเทพมหานครในช่วงเวลาที่ศึกษา	43
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ยโคโลนีเชื้อ <i>C. neoformans</i> จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ	44
ตารางที่ 11	อัตราการพบเชื้อของแต่ละแหล่งปนเปื้อนและความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อกับแหล่ง ปนเปื้อน	46
ตารางที่ 12	แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัส กับน้ำยาฆ่าเชื้อในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด	50
ตารางที่ 13	แสดงผลการคัดเลือกช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละ ชนิด	51
ตารางที่ 14	แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ <i>C. neoformans</i> ซีโรไทป์ A จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A	76
ตารางที่ 15	แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ <i>C. neoformans</i> ซีโรไทป์ A จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B	77
ตารางที่ 16	แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ <i>C. neoformans</i> ซีโรไทป์ A จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C	78

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะความชื้นของสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้ง (รูปซ้าย) และแบบเปียก (รูปขวา) 27

ภาพที่ 2 รูปแบบการสัมผัสแสงแดดของสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบใต้สิ่งกำบัง (รูปซ้าย) และแสงแดด (รูปขวา)..... 27

ภาพที่ 3 ลักษณะพื้นที่เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบสัมผัสคอนกรีตหรือปูน (รูปซ้าย) และพื้นหญ้าหรือดิน (รูปขวา)..... 27

ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า..... 38

ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ caffeic acid agar 39

ภาพที่ 6 จุลสัณฐานของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการย้อมสีแกรม (กำลังขยาย 100 เท่า)..... 39

ภาพที่ 7 ลักษณะแคปซูลของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการย้อมสี indian ink..... 40

ภาพที่ 8 การไช่ยูเรียของเชื้อ *C. neoformans* ผลบวก (ด้านซ้าย) และผลลบ (ด้านขวา) 40

ภาพที่ 9 แผนที่เก็บสิ่งขับถ่ายนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร (ด้านซ้าย) และเขตที่พบเชื้อ *C. neoformans* (ด้านขวา)..... 42

ภาพที่ 10 ค่าเฉลี่ยและการกระจายข้อมูลการพบเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร..... 45

ภาพที่ 11 การระบุแยกสปีชีส์เชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบทั้ง 18 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiplex PCR..... 47

ภาพที่ 12 การระบุแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบทั้ง 18 ตัวอย่างด้วยวิธี multiplex PCR 48

ภาพที่ 13 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด 52

ภาพที่ 14 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด 52

ภาพที่ 15 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด 53

บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

เชื้อ *Cryptococcus (C.) neoformans* เป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่มีลักษณะเป็นยีสต์ รูปร่างเซลล์เดี่ยว กลม มีผนังแคปซูลชนิด mucopolysaccharide ล้อมรอบผนังเซลล์ โรคที่เกิดจากเชื้อนี้เรียกว่า Cryptococcosis พบได้ทั้งในคนและสัตว์ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะเยื่อหุ้มสมอง และเนื้อสมองอักเสบในผู้ป่วย (Kwon-Chung et al., 1992) และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตมากที่สุด (Chowdhary et al., 2012) โดยในสัตว์มักพบการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจส่วนต้น ร่วมกับการเกิดก้อนแกรนูโลมา ในขณะที่เชื้อ *C. gattii* ก่อโรคทั้งคนและสัตว์ที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันปกติ พบเชื้อได้จาก เปลือกของต้นยูคาลิปตัส และหมีโคอาลา (*Phascolarctos cinereus*) บริเวณเขตภูมิประเทศร้อนและร้อนชื้น (Krockenberger et al., 2003) ซึ่งอุบัติการณ์ของโรค Cryptococcosis เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี ค.ศ. 2013 ทั่วโลกมีผู้ป่วยเป็น cryptococcal meningitis ประมาณ 1 ล้านคนต่อปี โดยเฉพาะผู้ที่มีการภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเสียชีวิตประมาณ 625,000 คนต่อปี (Park et al., 2009) ซึ่งในทวีปเอเชียมีการรายงานอุบัติการณ์ของโรคเป็นส่วนมาก เช่น ประเทศอินเดียพบผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องชนิด acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) เกิดโรค cryptococcosis ประมาณร้อยละ 1.7 ถึง 4.7 ของจำนวนประชากร (Kumarasamy et al., 2003; Vajpayee et al., 2003) นอกจากนี้ โรค Cryptococcosis เป็นโรคแทรกซ้อนที่สำคัญอันดับ 2 รองจากโรควัณโรค (tuberculosis) จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Lakshmi et al., 2007; Park et al., 2009; Chowdhary et al., 2012) ซึ่งประเทศไทยพบอัตราการเกิดโรคอยู่ในอันดับ 3 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV จังหวัดเชียงใหม่ (Sriburee et al., 2004) ดังนั้น กระทรวงสาธารณสุขทั่วโลกจึงเล็งเห็นความสำคัญศึกษาแหล่งการแพร่กระจายของเชื้อและการพัฒนาเทคนิควินิจฉัยการตรวจโรค cryptococcosis เพื่อป้องกันหรือลดการเกิดโรค cryptococcosis ของประชาชน (Chowdhary et al., 2012)

แหล่งรังโรคและแหล่งการแพร่กระจายที่สำคัญของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งแวดล้อม คือ สิ่งขับถ่ายนกพิราบ ซึ่งนกพิราบเป็นตัวพาหะที่สำคัญหรือโฮสต์เก็บเชื้อ (reservoir host) โดยเชื้อ *C. neoformans* จะอยู่บริเวณระบบทางเดินอาหารของนก และทนต่ออุณหภูมิภายในร่างกายนก โดยเฉลี่ย 42.5 องศาเซลเซียส จากนั้น เชื้อ *C. neoformans* จะถูกขับออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่าย เจริญเติบโตและแพร่กระจายปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมในรูปของสปอร์

จากการศึกษาพบอุบัติการณ์และความชุกของเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบในสิ่งแวดล้อมทั่วโลกอย่างต่อเนื่อง พบว่าในมูลนกพิราบแห่งพบการปนเปื้อนของเชื้อ *C. neoformans* ได้ถึง 2.6×10^6 CFU/g (Ruiz et al., 1981) จากการสำรวจที่ผ่านมา มีการแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณสวนสาธารณะ

อาคาร และบ้านเรือนที่พบสิ่งขับถ่ายนก ผลการแยกเชื้อ *C. neoformans* จากลักษณะมูลนกพิราบที่แตกต่างกันในประเทศไทย พบเชื้อในสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งร้อยละ 9.2 และพบในสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกร้อยละ 1.2 ต่อจากนั้น จากการแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการพัฒนาเทคนิคทางด้านปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เป็นซีโรไทป์ A (*C. neoformans* var. *gurbii*) (Mseddi et al., 2011) ซึ่ง ซีโรไทป์ A เป็นสาเหตุหลักของการก่อโรค cryptococcosis ในผู้ป่วยหรือสัตว์ ปี ค.ศ. 2004 มีรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* var. *gurbii* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในเชียงใหม่ร้อยละ 16.4 และต้นไม้อยูคาลิปต์สร้อยละ 0.9 (Sriburee et al., 2004) และมีรายงานในเขตกรุงเทพมหานคร ว่าพบเชื้อ *C. neoformans* ร้อยละ 8.9 จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ (ปิยะบงการ, 2547) จากผลการรายงานแพร่กระจายอย่างกว้างขวางของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งแวดล้อม จึงให้ความสำคัญเกี่ยวกับแนวทางการป้องกันและการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งแวดล้อมด้วยการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงสภาพการดูดซึมสารสำคัญผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (McDonnell and Russell, 1999) จากการรายงาน พบว่า น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds) ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-2 ระยะเวลา 10 นาที (Kruse et al., 1963) และน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 15 นาที สามารถทำลายเชื้อ *C. neoformans* ได้ (Dvorak et al., 2008) อย่างไรก็ตาม เชื้อ *C. neoformans* มีโครงสร้างที่มีแคปซูลคาร์โบไฮเดรตหุ้ม และมีคุณลักษณะที่เป็นสปอร์ ซึ่งจะช่วยป้องกันเซลล์และช่วยให้เซลล์ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนต่อรังสียูวี สารออกซิไดซ์ อุณหภูมิ เป็นต้น และยังช่วยให้เซลล์ทนทานน้ำยาฆ่าเชื้อได้มากขึ้น อีกทั้งในธรรมชาติ เชื้อ *C. neoformans* ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งขับถ่ายของนกพิราบซึ่งเป็นสารอินทรีย์ ที่มีผลทำให้ประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง (Lobova et al., 2004; Dvorak et al., 2008;)

ภูมิประเทศและอากาศในประเทศไทยเหมาะสมต่อการคงอยู่ของเชื้อ *Cryptococcus* spp. และความหลากหลายของสายพันธุ์และปริมาณของนกในประเทศไทย ทำให้มีแพร่กระจายอยู่อย่างต่อเนื่องทั้งในสัตว์และคน ก่อปรกักับภาวะการเปลี่ยนแปลงของโลกในปัจจุบัน อาจมีผลต่อพฤติกรรมและแหล่งรังนอนของนกในแต่ละพื้นที่ ซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างในการสำรวจจากในอดีตที่ผ่านมา ดังนั้นการสำรวจเชื้อ *Cryptococcus* spp. ในแง่ของสายพันธุ์ ซีโรไทป์ ปัจจัยแวดล้อม โดยเฉพาะในเมืองหลวงของประเทศที่มีประชากรอยู่อย่างหนาแน่น และการลดการปนเปื้อน จึงเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในด้านการเฝ้าระวัง และการจัดการด้านสุขศาสตร์ที่เหมาะสมที่ปรับใช้ในวงกว้างต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 สํารวจเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ในกรุงเทพมหานครและศึกษาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อกับแหล่งปนเปื้อน

1.2.2 ประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดในกลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต (ผลิตภัณฑ์ A) กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (ผลิตภัณฑ์ B) และ กลุ่มควอเทอนารีแอมโมเนียม (ผลิตภัณฑ์ C) ต่อการฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนอยู่ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ในแง่ของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสที่เหมาะสม

1.3 คำสำคัญ

เชื้อคริปโตค็อกคัส นีโอฟอร์มแมนส์, น้ำยาฆ่าเชื้อ, มูลนกพิราบ, กรุงเทพมหานคร

1.4 Keywords

Cryptococcus neoformans, disinfectant, pigeon droppings, Bangkok

1.5 คำถามสำหรับงานวิจัย / สมมติฐานการวิจัย

1.5.1 มีการแพร่ระบาดของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในกรุงเทพมหานคร โดยมีอุบัติการณ์ที่แตกต่างกันตามพื้นที่ที่สำรวจ และมีความเกี่ยวข้องกับชนิดแหล่งปนเปื้อน

1.5.2 การเพิ่มระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการสัมผัสของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทดสอบจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนเปื้อนในสิ่งขับถ่ายนกพิราบได้

1.6. กรอบแนวคิดการวิจัย

คำถามสำหรับการวิจัย

1. มีอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในกรุงเทพมหานคร ช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2011-2012 หรือไม่
2. ปัจจัยทางชีวภาพมีความสัมพันธ์ต่อการทนอยู่ของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบหรือไม่
3. สิ่งขับถ่ายนกพิราบที่ปนเปื้อนเชื้อ *C. neoformans* จะลดประสิทธิภาพการทำงานของน้ำยาฆ่าเชื้อหรือไม่



วิธีการวิจัย

1. ศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* กับปัจจัยทางชีวภาพ
3. ประเมินประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดต่อเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบ



ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ
2. ปัจจัยทางชีวภาพมีความเกี่ยวข้องกับการคงอยู่ของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ
3. สิ่งขับถ่ายนกพิราบที่ปนเปื้อนเชื้อ *C. neoformans* ลดประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร : Fungi

ไฟลัม : *Basidiomycota*

ชั้น : *Tremellomycetes*

อันดับ : *Tremellales*

วงศ์ : *Tremellaceae*

สกุล : *Cryptococcus*

สปีชีส์ : *Cryptococcus neoformans*

2.1 ประวัติการพบเชื้อ *C. neoformans*

เชื้อ *C. neoformans* ถูกค้นพบในศตวรรษที่ 19 เริ่มต้นในปีค.ศ. 1894 โดยศาสตราจารย์ นายแพทย์ Paula Grawitz มหาวิทยาลัย Greifswald ประเทศเยอรมัน ผู้ตรวจพบโรค cryptococosis เป็นคนแรก ต่อจากนั้น นายแพทย์ Otto Busse อธิบายสาเหตุของการเกิดโรคและพยาธิสภาพของโรค cryptococosis จากเนื้อเยื่อบริเวณกระดูก tibia ของผู้ป่วยเพศหญิง (Mrs. Kapp) ที่เป็นโรคมะเร็ง มีลักษณะเซลล์กลมหรือรีสีใสชัดเจนเกาะกลุ่มเป็นลักษณะ giant cell ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากกลุ่มปรสิตจำพวก microsporidia หรือ coccidia และเมื่อนำไปเพาะเชื้อ ย้อมลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยา ฆีตเชื้อในสัตว์ทดลอง อธิบายว่า เป็นปรสิตชนิดหนึ่งที่มีผนังเซลล์ใส ล้อมรอบเซลล์ อีกทั้ง สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และก่อโรคในสัตว์ทดลองได้ (Mitchell and Perfect, 1995) จึงตั้งชื่อยีสต์นี้ว่า *Saccharomyces hominis* (Knöke and Schwesinger, 1994) ในปีเดียวกันนี้ นายแพทย์ Francesco Sanfelice แยกเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะคล้ายกับยีสต์ของ นายแพทย์ O. Busse จากน้ำหมักผลไม้ในอิตาลีพบยีสต์มี จึงตั้งชื่อยีสต์ชนิดนี้ว่า *Saccharomyces neoformans* (Alteras et al., 1976; Chowdhary et al., 2012) ต่อจากนั้น ปีค.ศ. 1896 นายแพทย์ Fredinand Curtis อธิบายการติดเชื้อยีสต์บริเวณขาหนีบของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อของระบบประสาทส่วนกลาง ว่าเป็นยีสต์ *Megalococcus myxoides* และเมื่อนำฆีตเชื้อเข้าสู่ สัตว์ทดลอง สามารถทำให้เนื้อเยื่อหรือผิวหนังบริเวณนั้นเกิดก้อนเนื้อออก จึงตั้งชื่อยีสต์ที่แยกได้ว่า *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* (Casadevall and Perfect, 1998) จนกระทั่ง ปี ค.ศ. 1901 คุณ Jean-Paul Vuillemin ชาวฝรั่งเศสจัดจำแนกเชื้อยีสต์ของ O. Busse และ

F. Sanfelice ด้วยคุณสมบัติไม่มี endospore อยู่ในจีโนม *Cryptococcus spp.* เรียกว่า *Cryptococcus homonis* และ *Cryptococcus neoformans* ตามลำดับ (Barnett, 2010) ต่อจากนั้น ในปีค.ศ. 1934 Benham อธิบายสาเหตุของการเกิดโรค cryptococcosis มีความแตกต่างจากโรค blastomycosis อย่างชัดเจน โดยโรคที่เกิดบริเวณเยื่อหุ้มสมองในทวีปอเมริกาและโรคที่เกิดบริเวณผิวหนังในทวีปยุโรปเกิดจากเชื้อชนิดเดียวกัน คือ เชื้อ *C. neoformans* ก่อให้เกิดโรค cryptococcosis (Benham, 1950) และได้จัดจำแนกเชื้อ *C. neoformans* ทางซีรัมวิทยา โดยอาศัยความแตกต่างแอนติเจนบนผนังแคปซูลของเชื้อ ได้ตั้งชื่อ *C. neoformans var. neoformans* ประกอบด้วย serotype A และ serotype D ขณะที่ *C. neoformans var. gattii* ประกอบด้วย serotype B และ serotype C (Simwami et al., 2011) และแยกการสืบพันธุ์ของเชื้อได้ 2 แบบ คือ แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ ประกอบด้วย mating type 2 แบบคือ **α** และ a จัดอยู่ในกลุ่ม basidiomycetous จีโนม *Filobasidiella* (Kwon-Chung, 1975; Chayakulkeeree and Perfect, 2006)

2.2 ซีรัมวิทยาของเชื้อ *C. neoformans*

Cryptococcus spp. จัดอยู่ในกลุ่ม *basidiomycota* ลักษณะยีสต์เซลล์เดี่ยวมีแคปซูลล้อมเซลล์ (encapsulated yeast) ประกอบด้วยสปีชีส์ 37 สปีชีส์ (Kwon-Chung et al., 1992) ซึ่งสปีชีส์ก่อโรคที่สำคัญมี 2 สปีชีส์ คือ *C. neoformans* และ *C. gattii* จากการแบ่งตามลักษณะความแตกต่างโครงสร้างแคปซูลสามารถแบ่งได้ 5 ซีโรไทป์ (serotypes) คือ ซีโรไทป์ A, B, C, D และ AD ซึ่งซีโรไทป์ B และ C จัดอยู่ในสปีชีส์ *C. gattii* ซีโรไทป์ A, D และ AD จัดอยู่ในสปีชีส์ *C. neoformans* นอกจากนี้ เชื้อ *C. neoformans* สามารถแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ย่อย (varieties) คือ *C. neoformans var. grubii* อยู่ในซีโรไทป์ A, *C. neoformans var. neoformans* อยู่ในซีโรไทป์ D และ *C. neoformans complex* อยู่ในซีโรไทป์ AD (Kwon-Chung and Varma, 2006; Chowdhary et al., 2012)

รูปร่างของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) โคลนมีขนาด 2-3 มิลลิเมตร ลักษณะ กลมมน ผิวหน้าเรียบเยิ้ม สีครีมหรือสีน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส (Kwon-Chung et al., 1992; Chayakulkeeree and Perfect, 2006) และเมื่อนำเซลล์ย้อมสีหมึกอินเดีย (indian ink) จะเห็นลักษณะเซลล์ขนาด 2 ถึง 3 ไมโครเมตร ประกอบด้วยแคปซูลลักษณะกลม สีเหลืองใสล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์มีขนาดเพิ่มขึ้น เฉลี่ย 10 ถึง 20 ไมโครเมตร (Zerpa et al., 1996; Bose et al., 2003) อย่างไรก็ตาม ขนาดของแคปซูลจะมีขนาดที่แตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบ (Feldmesser et al., 2001; Zaragoza and Casadevall, 2004) เชื้อ *C. neoformans* มีคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ ไม่หมักน้ำตาล แต่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส มอลโตส กาแลกโตส แซลลูมิโรส อินโนซิโตส ไซโรส ทรีฮาลาโรส ราฟฟิโนส ฟรุคโตส เอ็นไซม์ยูรีเอสและเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Schmeding et al., 1984)

วัฏจักรชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ซึ่งรูปแบบการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศอาศัยวิธีการแตกหน่อ ประกอบด้วย นิวเคลียสแบบ haploid (1n) มักพบในสิ่งแวดล้อมหรือผู้ป่วยโรค cryptococcosis ในขณะที่การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอาศัยวิธีการสร้างเบสิดิโอสปอร์ โดยมียีนตำแหน่ง MAT ควบคุมการสืบพันธุ์ (heterothallic basidiomycete yeast) ทั้งหมด 2 ชนิด คือ MAT *a* และ MAT α (Hull and Heitman, 2002) ซึ่งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *C. neoformans* มี 2 รูปแบบ คือ mating และ monokaryotic fruiting โดยการสืบพันธุ์แบบ mating คือ การผสมของยีนทั้ง MAT *a* และ MAT α แล้วสร้างสายใยมาเชื่อมเพื่อให้นิวเคลียสแตกต่างกันมาจับคู่กัน เรียกระยะนี้ว่า dikaryotic filament formation ต่อจากนั้น เกิดการเชื่อมระหว่าง clamp cell เพื่อสร้างสปอร์ลักษณะคล้ายกระบอง (basidium) ให้นิวเคลียสผสมกัน แล้วเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนและแบ่งจำนวนนิวเคลียส จนเกิดสปอร์ (basidiospore) ซึ่งลักษณะสปอร์ของเชื้อมีรูปร่างตรงหรือกลมรีปลายทั้งสองด้านแคบลง ด้านกว้างขนาด 1.0 ถึง 1.5 ไมโครเมตร ด้านยาวขนาด 3 ถึง 8 ไมโครเมตร ส่วนการสืบพันธุ์แบบ monokaryotic fruiting เป็นรูปแบบการผสมของยีน MAT *a* หรือ MAT α เพียงแบบเดียวแล้วสร้าง basidium ที่ไม่มีเชื่อม clamp cell เข้าด้วยกัน และพัฒนาเป็นสปอร์หรือยีสต์ โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านแวดล้อม คือ เมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเชื้ออยู่ในรูปของยีสต์แต่เมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเชื้ออยู่ในลักษณะสปอร์ นอกจากนี้ ยังสามารถพบรูปแบบสปอร์ได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วไปที่มีสารอาหารจำกัด คุณสมบัติของสปอร์มีลักษณะเบา ลอยแพร่กระจายปนเปื้อนสิ่งแวดล้อม จนกระทั่ง ในภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตพร้อมสืบพันธุ์ สปอร์ของเชื้อจะสามารถเพิ่มจำนวนอาศัยแตกหน่อและพัฒนาเป็นยีสต์มีนิวเคลียสแบบ haploid เข้าสู่วัฏจักรการสืบพันธุ์อีกครั้ง (Kwon-Chung, 1975; McClelland et al., 2002; Idnurm et al., 2005)

2.3 ปัจจัยความรุนแรงก่อโรคของเชื้อ *C. neoformans*

ระดับความรุนแรงก่อโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ และภาวะภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ซึ่งเชื้อ *C. neoformans* ประกอบด้วย ปัจจัยความรุนแรงหลากหลายชนิด เช่น แคปซูล การสร้างเม็ดสีเมลานิน การสร้างเอนไซม์ต่างๆ หนึ่ง ปัจจัยความรุนแรงอย่างเดียวของเชื้อ *C. neoformans* ไม่สามารถก่อความรุนแรงโรคได้ต้องมีปัจจัยความรุนแรงหลายปัจจัยทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อดำเนินการตอบสนองภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Kozel, 1995; Rodrigues et al., 1999) ซึ่งปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *C. neoformans* มีดังนี้

2.3.1 แคปซูล

แคปซูลเป็นปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงที่สำคัญของการก่อโรค cryptococcosis ซึ่งโครงสร้างแคปซูล ประกอบด้วย สารพอลิแซ็กคาไรด์กลุ่ม glucuronoxylomannan (GXM) ร้อยละ 90-95 และกลุ่ม galactoxylomannan (GalXM) ร้อยละ 5 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยโปรตีน manmoprotein ร้อยละ <1 (McFadden et al., 2006) โครงสร้างของ GXM มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ย 1700 ถึง 7000 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย พอลิเมอร์ α -1,3-mannose คู่กับแขนง β -D-xylopyranosyl, β -D-glucuronosyl และ 6-*o*-acetyl ซึ่งโครงสร้างนี้ในแต่ละซีโรไทป์มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดการตอบสนองต่อแอนติบอดีแตกต่างกันอีกด้วย (Kozel et al., 2003) ส่วนโครงสร้างของ GalXM มีน้ำหนักโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย α -1,6 galactan คู่กับแขนง β -1,3-galactose- α -1,4-mannose- α -1,3mannose (Villena et al., 2008; De Jesus et al., 2009; Vitale et al., 2012) จากการศึกษาความรุนแรงของแคปซูลที่สามารถก่อโรคในโฮสต์นั้นพบว่า ส่วนของยีนที่มีหน้าที่สร้างแคปซูลเป็นส่วนสำคัญของการก่อความรุนแรง เช่น เชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ D มียีน capsule เช่น ยีน CAP59 CAP64 CAP10 และ CAP60 เป็นยีนสำคัญในการก่อความรุนแรงของโรค (Okabayashi et al., 2007) สามารถช่วยให้เชื้ออาศัยอยู่ในอวัยวะของโฮสต์ได้และเพิ่มการอยู่รอดของเชื้อได้ดีขึ้น ซึ่งแคปซูลจะยับยั้งกระบวนการจับกินของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยไม่ให้สร้างสาร opsonins (Kozel and Gotschlich, 1982) และทนทานต่อการถูกย่อย (Tucker and Casadevall, 2002) เมื่อเชื้ออยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เชื้อหลั่งสารพอลิแซ็กคาไรด์จากแคปซูลหุ้มเซลล์ภายใน phagosome ที่สะสมอยู่ในไซโตพลาส ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสูญเสียหน้าที่และเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ (apoptosis) (Feldmesser et al., 2000) อีกทั้งเมื่อเชื้อเข้าสู่น้ำไขกระดูกสันหลัง ทำให้ระดับแอนติเจนของแคปซูลพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้น สามารถเปลี่ยนแปลงออสโมลาริตี ทำให้สารไหลเข้าออกผิดปกติส่งผลให้มีความดันเพิ่มขึ้น เกิดอาการปวดศีรษะและตาพร่า (Denning et al., 1991) นอกจากนี้ แคปซูลของเชื้อไปยับยั้งการเข้ามาของเซลล์จับกินบริเวณที่มีการติดเชื้อ (Ellerbroek et al., 2004) รบกวนการหลั่งสารไซโตไคน์ (Villena et al., 2008) และยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell (Yauch et al., 2006; Ma and May, 2009)

2.3.2 การสร้างเม็ดสีเมลานิน

เมลานิน มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ (Jacobson, 2000) ไม่ละลายในน้ำและสารอินทรีย์ (Nosanchuk et al., 1999) เนื่องจากมีส่วนประกอบของกลุ่มสารฟีนอลิก (Casadevall et al., 2000; Nosanchuk and Casadevall, 2006) มีลักษณะสีน้ำตาลหรือสีดำ ทนต่อกรด ถูกทำลายด้วยสารละลายต่างและการออกซิไดซ์ของสารฟอกขาว การเกิดสีเมลานินของเชื้อ *C. neoformans* เป็นลักษณะเด่นที่สามารถแยกออกจากกลุ่ม *Cryptococcus* spp. สายพันธุ์อื่นได้ โดยที่เมลานินจะสะสมอยู่บริเวณผนังเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ (Nosanchuk and Casadevall, 2003) จากการรายงานการศึกษากระบวนการสร้างสีเมลานินของเชื้อมี 2 ลักษณะ คือ การสร้างด้วยการกระตุ้นของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น niger seed agar หรือ L-dopa agar ที่นำมาเป็นสัญลักษณ์เพื่อแยกวินิจฉัยเชื้อ และความสามารถสร้างเมลานินในเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นปัจจัยความรุนแรงก่อโรค

การสร้างเมลานินของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการกระตุ้นของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกค้นพบโดย Staib ปี 1960 (Polacheck, 1991) โดยเติมสารที่มีส่วนประกอบของกลุ่มฟีนอลิกจากสารสกัดของเมล็ดทานตะวัน (*Guizotia abyssinica*) เป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและปรับสภาพการทำงานของเอนไซม์ให้เหมาะสม พบว่าสารดังกล่าวกระตุ้นให้เชื้อ *C. neoformans* สร้างเมลานินปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ นอกจากนี้ การศึกษาความสามารถของเมลานินที่เป็นปัจจัยความรุนแรงก่อโรคนั้น เกิดจากเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารตั้งต้น เช่น L-dopa หรือสารกลุ่มโดพามีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทกลุ่มแคทีโคลามีนที่พบในสมองของมนุษย์และสัตว์ (Garcia-Rivera et al., 2005) โดยกระบวนการสร้างเมลานิน เริ่มต้นจากเชื้อสร้างเอนไซม์ laccase กระตุ้นสารตั้งต้นกลุ่ม o-diphonolic เช่น 3,4-dihydroxyphenylalanin(L-Dopa) กลายเป็น dopaquinone เกิดสาร dopachrome กับ 5,6-dihydroxyindole ต่อจากนั้น เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นสารโพลี-เมอริ์ให้เป็นเมลานิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสื่อประสาทกลุ่ม dopamine, norepinephire และ epinephrine สามารถเป็นสารตั้งต้นกระตุ้นให้เกิดเมลานินได้ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการสร้างเมลานินและปัจจัยความรุนแรงก่อโรค โดยนำเชื้อที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ phenoloxidase (Mel-) ฉีดเข้าหนูทดลองเปรียบเทียบกับเชื้อที่สร้างเอนไซม์ phenoloxidase ที่ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่กระตุ้นสร้างเมลานินและพบว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ phenoloxidase สามารถทำให้เชื้อก่อพยาธิสภาพในหนูทดลองได้ จึงสรุปว่า เมลานินมีหน้าที่ป้องกันเซลล์ ทำลายกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ด้วยการยับยั้งกระบวนการจับกินเซลล์ ทนต่อกระบวนการถูกทำลายจากออกซิเดชันและยับยั้งการทำงานของเซลล์อีกเสบได้ (Casadevall et al., 2000) จากการศึกษาที่ยืนยันที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเมลานินของเชื้อ พบยีน laccase ที่สำคัญ 2 ยีน คือ LAC1 อยู่บริเวณผนังเยื่อหุ้มเซลล์ และ LAC2 ที่เชื่อมกับโปรตีนในผนังเซลล์ ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์กระตุ้นการสร้างเมลานิน (Zhu and Williamson, 2004; Missall et al., 2005)

2.3.3 ความสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ความสามารถการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของเชื้อ *C. neoformans* มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตในโฮสต์ โดยพบว่า เชื้อสามารถอาศัยอยู่ได้ในอุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิภายในร่างกายของนกพิราบ แต่เชื้อไม่มีความสามารถเพิ่มจำนวนและก่อโรคต่อนกพิราบได้ (Mitchell and Perfect, 1995) ดังนั้นความเหมาะสมของอุณหภูมิส่งผลต่อความสามารถการก่อโรคของเชื้อ *C. neoformans* ในโฮสต์ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อ คือ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และความเป็นกรด-ด่างที่ 7.3 ถึง 7.4 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมือนกับสภาวะร่างกายของโฮสต์ ทำให้สามารถก่อความรุนแรงของโรคในโฮสต์ได้มากขึ้น จากการศึกษาความสามารถของเชื้อที่อยู่รอดในอุณหภูมิสูง พบว่า เชื้อมียีน *C. neoformans calcineurin A (CNA1)* ที่สำคัญต่อการทำให้เชื้ออยู่รอดได้ โดย calcineurin เป็นสาร serine-threonine มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ phosphatase และถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} -calmodulin เมื่อเชื้อมีการมีชีวิตชั้นที่ยีน *CNA1* พบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตและไม่ก่อพยาธิสภาพต่อโฮสต์ได้ (Odom et al., 1997)

2.3.4 การผลิตแมนนิทอล (mannitol production)

การผลิตสารประกอบ hexitol D-mannitol ช่วยให้เชื้อดำรงชีวิตในร่างกายโฮสต์ได้ จากการรายงานแยกเชื้อผู้ป่วยจำนวน 12 คน พบว่า เชื้อทั้งหมดสามารถสร้าง D-mannitol บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อีกทั้งการสร้าง D-mannitol ช่วยให้เชื้อแพร่กระจายไปยังน้ำไขสันหลังและก่อให้เกิดภาวะเนื้อเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้ จากความรุนแรงของการสร้าง D-mannitol ทำให้ระบบประสาทส่วนกลางถูกทำลาย เกิดภาวะสมองบวม โดยหน้าที่ของ D-mannitol ช่วยป้องกันการถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระต่างๆของโฮสต์ นอกจากนี้ จากการศึกษาบทบาทแมนนิทอลที่เป็นปัจจัยความรุนแรงก่อโรค cryptococcosis พบว่า เมื่อมีการมีชีวิตชั้นบริเวณยีนที่ทำหน้าที่สร้างแมนนิทอลด้วยวิธีต่างๆ เช่น รังสียูวี ความร้อน หรือ ความเป็นเกลือสูง มีผลทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ช้า และสร้างแมนนิทอลลดลง แต่ยังคงสามารถก่อโรคในโฮสต์ได้ เนื่องจากเชื้อมีปัจจัยความรุนแรงก่อโรคอีกมากมาย เช่น การสร้างแคปซูล สร้างเมลานิน เป็นต้น (Wong et al., 1990; Rodrigues et al., 1999)

2.3.5 ความสามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ

2.3.5.1 เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสชนิด B (phospholipase B)

ฟอสโฟไลเปส คือ เอนไซม์ที่ย่อยพันธะเอสเทอร์กลุ่ม glycerophospholipids ที่ซึ่งเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายของโฮสต์ถูกทำลาย (Ghannoum, 2000) ซึ่งเชื้อ *C. neoformans* สามารถสร้างเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสได้หลายชนิด เช่น phospholipase B (PLB), lysophospholipase และ lysophospholipase transacylase (Chen et al., 1997) ซึ่งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสชนิด B มีบทบาทที่สำคัญในการสร้างความรุนแรงของโรค จะสามารถย่อยผนังเซลล์ของโฮสต์ ช่วยให้เชื้อสามารถแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์ นอกจากนี้ ฟอสโฟไลเปสชนิด B สามารถย่อย dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPtdCho) ซึ่งเป็นสารประกอบในสารตั้งผิวของปอดเป็นผลให้ปอดถูกทำลาย (Steenbergen and Casadevall, 2003) และช่วยให้เชื้อเกาะยึดกับเซลล์เยื่อของปอดได้มากขึ้น (Ganendren et al., 2006)

2.3.5.2 เอนไซม์โปรตีเอส (protease)

เชื้อ *C. neoformans* สร้างเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อย่อยหรือทำลายโปรตีนต่างๆของโฮสต์ เช่น พลาสมาโปรตีน คอลลาเจน อิลาสติน ไฟบริโนเจน อิมมิวโนโกลบูลิน ทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ได้ง่ายขึ้น (Chen et al., 1996) นอกจากนี้เอนไซม์โปรตีเอสยังสามารถทำลายมัดคอลลาเจนบริเวณผิวหนังได้ (Salkowski and Balish, 1991)

2.3.5.3 เอนไซม์ยูรีเอส (Urease)

การสร้างเอนไซม์ยูรีเอสเป็นคุณสมบัติก่อโรคที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ยูเรีย เกิดเป็นผลผลิตแอมโมเนียและคาร์บาเมต (Steenbergen and Casadevall, 2003) ซึ่งเชื้อ *C. neoformans* สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสภายใต้การควบคุมของยีน *URE1* มีความสำคัญช่วยให้เชื้อสามารถเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้ โดยเมื่อเชื้อเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต เอนไซม์ยูรีเอสช่วยเชื้อที่สะสมในหลอดเลือดแพร่กระจายเข้าสู่สมอง (Olszewski et al., 2004)

ดังนั้น กลไกก่อความรุนแรงของเชื้อ *C. neoformans* นั้นเกิดเมื่อสปอร์ของเชื้อที่มีขนาดเล็กแทรกเข้าไปยังถุงลมปอด เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแพร่กระจายสู่อวัยวะต่างๆในร่างกาย โดยอาศัยคุณลักษณะที่ส่งเสริมการก่อโรคต่างๆ เช่น การสร้างแคปซูล การสร้างเมลานิน การผลิตแมนนิทอล และการผลิตเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส อย่างไรก็ตาม ความอ่อนแอของโฮสต์ เช่น สภาวะกลไกการตอบสนองภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น

2.4 นิเวศวิทยาของเชื้อ *C. neoformans*

นิเวศวิทยาของเชื้อ *C. neoformans* มีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมอย่างมาก ซึ่งเชื้อ *C. neoformans* พบได้ทั่วโลกตามสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน เศษใบไม้ น้ำ อากาศ มูลสัตว์ปีกต่างๆ โดยเฉพาะมูลนกพิราบ (Emmons, 1955; Chowdhary et al., 2012) ซึ่งการแพร่กระจายปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เกิดจาก เชื้ออาศัยอยู่ที่บริเวณระบบทางเดินอาหารของนกพิราบและปนเปื้อนออกมาพร้อมมูลนกเจริญเติบโตด้วยการใช้สารอาหารจากมูลนก เช่น แซนทีน (xanthine) ยูเรีย กรดยูริก และครีเอตินิน ที่ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนของการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม (Littman and Borok, 1968) ในทางตรงข้าม นิเวศวิทยาของเชื้อ *C. gattii* พบได้ในต้นไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) บริเวณเขตภูมิอากาศเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เช่น รัฐแคลิฟอร์เนียใต้ ออสเตรเลีย เอเชียใต้ บราซิล และอเมริกากลาง เป็นต้น (Ellis and Pfeiffer, 1990; Kidd et al., 2007a; Kidd et al., 2007b) การรายงานอุบัติการณ์ของเชื้อในสิ่งแวดล้อม เริ่มครั้งแรกในปี 1894 จากน้ำลูกพีช ต่อจากนั้น มีการรายงานพบเชื้อได้จากผลไม้ ผัก และนมโค และในปี 1951 พบรายงานแยกเชื้อ *C. neoformans* จากมูลสัตว์ปีก ดิน น้ำ และอากาศ โดยเฉพาะมูลนกมีการรายงานอย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่านกทุกสายพันธุ์สามารถเป็นพาหะนำเชื้อ *C. neoformans* ได้ เช่น นกค่างคิ้ว นกแก้ว นกคีรีบุ่น ไก่ โดยเฉพาะนกพิราบพบเชื้อได้มากกว่าสายพันธุ์นกชนิดอื่น ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มูลนกพิราบมีสารอาหารและสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่ามูลนกสัตว์ปีกชนิดอื่น เช่น มูลนกค่างคิ้วและมูลไก่ที่มีสภาพความเป็นด่างสูง ซึ่งการแพร่กระจายของเชื้อในสิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่องนั้น เกิดจาก 2 อย่าง คือ มูลนกที่ปนเปื้อนเชื้อ หรือเชื้อมีการปนเปื้อนตามร่างกายของนก เช่น ขน กรงเล็บ จงอยปาก ทำให้พบเชื้อในสิ่งแวดล้อมอยู่ได้ (Littman and Borok, 1968) จากความสัมพันธ์การแพร่ระบาดของเชื้อกับมูลนกชนิดต่างๆ พบว่านกพิราบไม่ได้เป็น natural host แต่มีบทบาทแพร่กระจายของเชื้อมากกว่านกสายพันธุ์อื่น เนื่องจากฉีดเชื้อเข้าสู่สมองและตาสามารถทำให้นกพิราบเกิดโรค cryptococcosis แต่ไม่พบพยาธิสภาพบริเวณระบบทางเดินอาหาร แม้ว่าสามารถแยกเชื้อได้จากลำไส้ก็ตาม แสดงให้เห็นว่า ในภาวะปกติเชื้อสามารถอาศัยในระบบทางเดินอาหารและทนต่ออุณหภูมิร่างกายนกพิราบได้ (Sethi and Randhawa, 1968) ดังนั้น จึงสรุปว่า นกพิราบเป็นพาหะของเชื้อ *C. neoformans* โดยเชื้ออาศัยบริเวณระบบทางเดินอาหารจากนั้นปนเปื้อนออกมาพร้อมมูลนกพิราบ หรือ ปนเปื้อนตามร่างกายของนก เช่น กรงเล็บ ปีก จงอยปาก ทำให้แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน อากาศ น้ำ ต้นไม้ เป็นต้น ในธรรมชาติเชื้อเจริญเติบโตอยู่ในรูปของสปอร์ที่มีขนาดเล็กและน้ำหนักรวม ทำให้สปอร์ของเชื้อลอยอยู่ในอากาศและฟุ้งกระจายในสิ่งแวดล้อม จากการรายงานแยกเชื้อจากอากาศบริเวณกรงนกพิราบพบเชื้อ *C. neoformans* ร้อยละ 55 บริเวณรอบกรงนกพิราบ ร้อยละ 30 นอกจากนี้ สายพันธุ์ *Cryptococcus* spp. อื่น คือ *C. ater*, *C. flavus*, *C. laurentii*, *C. magnus*, *C. terreus*, *C. uniduttlatus* และ *C. albidus* (Khan et al., 1978) ต่อจากนั้น มีการรายงานแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อม อย่างต่อเนื่อง เช่น แยกเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* จากดินร้อยละ 1.03 (Ajello, 1958) จากซากต้นไม้อ้อย (*S. cumini*) (Randhawa et al., 2006) จากน้ำจืดร้อยละ 16.6 และน้ำทะเลร้อยละ 21 (Kidd et al., 2007b) และปี 2008 คุณ Randhawa และคณะ รายงานแยกเชื้อ *Cryptococcus* spp. จากดิน ใบไม้ ต้นไม้ พบเชื้อ *C. neoformans* ร้อยละ 26 และเชื้อ *C. gattii*

ร้อยละ 24 และตัวอย่างที่สามารถพบได้ *C.neoformans* และ *C.gattii* ร้อยละ 5 (Randhawa et al., 2008) ดังนั้นนิเวศวิทยาของเชื้อ *C. neoformans* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณที่มีการปนเปื้อนของมูลนกหรือมูลสัตว์ปีก โดยเฉพาะมูลนกนกพิราบที่มีสารอาหารและสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้เชื้อแพร่กระจายและปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ (Cafarchia et al., 2006; Chowdhary et al., 2012)

2.5 พยาธิวิทยาของโรค cryptococcosis

โรค cryptococcosis พบได้ทั้งคนหรือสัตว์ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรค AIDS ผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ มะเร็งเม็ดเลือดขาว เบาหวาน และผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง เมื่อสปอร์ของเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย เชื้อสามารถเกาะติดกับเนื้อเยื่อด้วย แคปซูล และเพิ่มจำนวนที่บริเวณช่องจมูก หลอดลม และ เยื่อหุ้มปอด ซึ่งปอดเป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ (Lin., 2009) จากการที่เชื้อมีแคปซูล และ เมลานิน เป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค โดยส่งเสริมกลไกการหลีกเลี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์ ทำให้เชื้อก็จะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น สมอง ไขสันหลัง ต่อม้ำเหลือง ตา กระดูก เป็นต้น (Wettingfeld et al., 1956; Chowdhary et al., 2012) ปัจจุบันการรายงานอุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคเอดส์ติดเชื้อ *C. neoformans* เพิ่มมากขึ้นและเกิดภาวะเยื่อหุ้มสมองและสมองอักเสบ (meningoencephalitis) จนกระทั่งเสียชีวิตอย่างต่อเนื่อง (Cafarchia et al., 2006) นอกจากนี้มีการรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* ก่อให้เกิดโรคในสัตว์อื่นๆได้ด้วย เช่น หมู กระต่าย ม้า แกะ แพะ เพอร์เรท นก โดยเฉพาะแมว และ สุนัข (Lin and Heitman, 2006) ซึ่งเกิดพยาธิสภาพบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนต้น มีอาการ ไอ จาม มีเสมหะ และ เลือดไหลออกมาทางจมูก เกิดก้อนเนื้อ (polyp-like mass) นูนออกมาบริเวณโพรงจมูก และพบรอยโรคแกรนูโลมาตั้งแต่ชั้นใต้ผิวหนังจนถึงผิวหนังชั้นบน (Duncan et al., 2005)

2.6 ระบาดวิทยา

การแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* เริ่มขึ้นในปี 1984 จากน้ำพิช จากนั้นมีรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* อย่างต่อเนื่องทั้งในสิ่งแวดล้อม สารคัดหลั่งจากสัตว์ป่วย และนมสดจากโคที่ติดเชื้อ (Chowdhary et al., 2012) ต่อจากนั้น ในปี 1951 มีการรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบเป็นครั้งแรก และ ในปี 1955 ได้มีการรายงานความชุกเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกและรังนอนนกพิราบในเมืองวอชิงตันดีซี (Emmons, 1955) จากนั้น ได้มีการรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* จากบริเวณที่อยู่อาศัยและมูลนกนกพิราบอย่างต่อเนื่องไปทั่วโลก ซึ่งอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบมีการรายงานทั่วโลก เช่น ทวีปยุโรป (Bohm et al., 1970) ประเทศอินเดีย (Gugnani et al., 1972) ประเทศบราซิล ประเทศญี่ปุ่น ทวีปออสเตรเลีย (Sethi and Randhawa, 1968) และ ประเทศไทย (Taylor and Duangmani, 1968) ซึ่งประเทศไทยการรายงานแพร่กระจายเชื้อ *C. neoformans* เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี 1968 พบเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบร้อยละ 18.04 (Taylor and Duangmani, 1968) พบเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบในกรุงเทพมหานครร้อยละ 8.9 (ดำรงเดช ปิยะบงการ, 2547) จังหวัดเชียงใหม่ร้อยละ 0.99 (สุดา ชันติยา, 2546) และจังหวัดอุบลราชธานี แบ่งเป็น มูลนกพิราบร้อยละ 54.05 มูลนกกระจอกบ้านร้อยละ 16.66 (ธัญญการย์ ศรีวรรมาศ, 2554) นอกจากนี้ มีการรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* จากมูลไก่ร้อยละ 24 (Kuroki et al., 2004) โดยที่เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมคือ ซีโรไทป์ A (*C. neoformans* var. *grubii*) เป็นส่วนใหญ่ (Nielsen et al., 2007; Litvintseva and Mitchell, 2009) ซึ่งการระบาดวิทยาของเชื้อ *C. neoformans* เริ่มจากเมื่อเชื้อสามารถอาศัยอยู่บริเวณระบบทางเดินอาหารของนกพิราบ ปนเปื้อนออกมาพร้อมกับมูลนก เชื้ออาศัยและเจริญเติบโตจากการใช้สารอาหารและความชื้นในมูลนก เมื่อสารอาหารและความชื้นในมูลนกลดลงหรืออยู่ในภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เชื้อจะสร้างแคปซูลเพื่อป้องกันเซลล์ถูกทำลาย และมีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ ต่อจากนั้นแคปซูลของเชื้อที่ซึ่งมีน้ำหนักรวม ฟุ้งแพร่กระจายอยู่ในอากาศ ด้วยการที่เชื้อสร้างแคปซูลนั้นสามารถทำให้เชื้อมีชีวิตอาศัยอยู่ในมูลนกที่ซึ่งมีลักษณะแบบแห้งหรือที่มีภาวะไม่เหมาะสมได้ยาวนานถึง 18 เดือน (Chen et al., 2008; Loperena-Alvarez et al., 2010; Wu et al., 2012) อย่างไรก็ตาม การแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* ยังมีปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อในสิ่งแวดล้อม เช่น ฤดูกาล อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด แวดล้อม (Montenegro and Paula, 2000; Granados and Castaneda, 2005) จากการศึกษาเก็บข้อมูลระบาดของเชื้อจากซากไม้บริเวณต้นไม้แต่ละฤดูกาลระยะเวลา 7 ปีในประเทศอินเดีย พบว่าในฤดูหนาวพบเชื้อ *C. neoformans* var. *grubii* มากที่สุด ตามด้วย ฤดูร้อน ฤดูใบไม้ร่วง ฤดูฝนตามลำดับ (Randhawa et al., 2011) และ ในประเทศไทยมีการรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* var. *grubii* จากมูลไก่ซึ่งในฤดูร้อนมีการแพร่กระจายเชื้อมากกว่าฤดูฝน (Kuroki et al., 2004)

2.7 การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

2.7.1 การเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อ

ปี 1951 Emmons แยกเชื้อ *C. neoformans* จากดินโดยใส่ตัวอย่างในหลอดทดลองและเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ตัวอย่างดินกับน้ำเกลือกลายเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ต่อจากนั้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง นำส่วนใสด้านบน ซึ่งคาดว่ามีปริมาณเซลล์ของเชื้อจำนวนมาก ฉีดเข้าช่องท้องหลอดทดลองปริมาณ 0.5 ถึง 1 มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนด 4 ถึง 6 สัปดาห์ นำส่วนม้ามและตับเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud's dextrose agar บนที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 3 ถึง 4 วัน พบว่าเชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีผิวหน้าเยิ้มแต่มีสีของโคโลนีที่แตกต่างกัน และสามารถก่อโรคในหนูทดลองได้ (Emmons, 1951) ต่อจากนั้น ปี 1955 นำชิ้นตอนดังกล่าวเพาะแยกเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างมูลนกพิราบ ด้วยการเติมยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน และ สเตربتอิมัยซินในน้ำเกลือ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากตัวอย่าง (Emmons, 1955) ต่อจากนั้น วิธีดังกล่าวจึงเป็นที่นิยมในห้องปฏิบัติการ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องช่วยลดการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ การเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ใช้ซ็อนโลหะหรือคีมที่ผ่านการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ตักตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม พบว่าสามารถลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมได้ (Randhawa et al., 2005)

การเพาะเชื้อเพื่อคัดเลือกและแยกเชื้อ *C. neoformans* จากยีสต์ชนิดอื่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการนิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่มีสารอาหารประกอบด้วยแหล่งของไนโตรเจน กรดอะมิโน กรูโคส สำหรับให้เชื้อเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นั้นไม่สามารถแยกลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* กับยีสต์ชนิดอื่น โดยเฉพาะ *Candida albicans* ได้ในช่วงระยะเวลา 1 ถึง 2 วัน อีกทั้ง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อเชื้อ *C. albicans* เร็วกว่าเชื้อ *C. neoformans* มีผลให้ ศึกษาพัฒนาปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดแยกเชื้อ *Cryptococcus* spp. ออกจากเชื้อยีสต์อื่น ด้วยการใช้ อินดิเคเตอร์แยกลักษณะโคโลนีของเชื้อ ดังต่อไปนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อ bird seed agar (BA) หรือ Staib's niger seed agar ใช้สารสกัดจาก เมล็ด (*Guizota abyssinica*) กระตุ้นให้เชื้อ *C. neoformans* สร้างเม็ดสีเมลานิน ให้เกิดโคโลนีสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเชื้อ *C. albicans* ที่มีโคโลนีสีขาว สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย ครีเอตินินร้อยละ 0.1 เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน กรูโคสร้อยละ 1 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และฟอสเฟตร้อยละ 0.1 ซึ่งสารครีเอตินินและสารฟอสเฟตไม่มีผลต่อการสร้างเม็ดสีของเชื้อ แต่การเติมครีเอตินินสามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* และ *C. laurentii* ออกจากเชื้อ *Cryptococcus* spp. ชนิดอื่นที่ไม่สามารถใช้ครีเอตินินได้ (Paliwal and Randhawa, 1978) การศึกษาของ Denning และคณะ ปี 1990 เปรียบเทียบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง SDA กับ BA สามารถระบุแยกชนิดเชื้อ *C. neoformans* ในตัวอย่างเสมหะและปัสสาวะจากผู้ป่วย พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง SDA และ BA มีค่าจำเพาะร้อยละ 100 แต่มีความไวที่แตกต่างกัน โดย

อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA มีค่าไวยับร้อยละ 60 น้อยกว่าความไวยับอาหารเลี้ยงเชื้อ BA ที่เท่ากับร้อยละ 100 (Paliwal and Randhawa, 1978; Denning et al., 1990)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ sunflower seed agar (SSA) มีสูตรอาหารที่คล้ายคลึงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ BA แต่ใช้สารสกัดจากเมล็ดทานตะวัน (*Helianthus annuus*) สำหรับกระตุ้นให้เชื้อสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยเชื้อมีลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Khan et al., 2004a)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ mycophil agar ที่ผสมสี trypan blue และยาปฏิชีวนะ โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ช่วยกระตุ้นการสร้างเม็ดสีของยีสต์ เมื่อมีการเติมสี trypan blue เชื้อสามารถดูดซึมสีเข้าไป ทำให้โคโลนีของเชื้อกลายเป็นสีน้ำเงินเข้มแตกต่างจาก *Candida* spp. ที่มีโคโลนีสีฟ้านอกจากนี้ การเติมเจนนตามัยซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ลอแรนเฟนิคอลความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ในสภาวะของอาหารเลี้ยงที่มีสารเคมี disodium phosphate ความกรดต่างจาก 6.9 เป็น 7.2 ช่วยให้อาอกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและช่วยการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ดีขึ้น (Vickers et al., 1974)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ tobacco agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) คล้ายกับอาหารเลี้ยงเชื้อ BA กับ SSA ซึ่งเชื้อจะสร้างโคโลนีสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างจากเชื้อ *Candida* spp. ที่มีโคโลนีสีขาว ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Tendolkar et al., 2003; Khan et al., 2004b)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ mustard seed agar ใช้สารสกัดจากเมล็ดมัสตาร์ด (*Brassica juncea*) เพียงชนิดเดียว ซึ่งเชื้อ *C. neoformans* จะเกิดโคโลนีสีน้ำตาลแยกออกจากเชื้อ *Candida* spp. ที่เกิดโคโลนีสีขาว ในระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Nandhakumar et al., 2006)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ henna agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารสกัดจากใบเฮนน่า (*Lawsonia inermis*) โดยเชื้อ *C. neoformans* สร้างโคโลนีสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อแยกออกจากเชื้อ *Candida* spp. ที่มีโคโลนีสีขาว ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งใบเฮนน่าสามารถพบบริเวณเขตร้อน เช่น แอฟริกา เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียง และ ออสเตรเลีย ข้อดีของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีขั้นตอนการเตรียมง่ายกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BA และ SSA และมีราคาต้นทุนที่ถูกกว่า (Nandhakumar et al., 2007)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ caffeic acid (CA) agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ caffeic (3,4-dihydroxycinnamic) acid ที่สกัดจากเมล็ด *Guizota abyssinica* ด้วยวิธีการไฮโดรไลซิสของเมทานอล (Pulverer and Korth, 1971) ซึ่งเชื้อจะดูดซึมสาร caffeic acid เข้าไปยังเซลล์ เกิดกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทำให้โคโลนีของเชื้อกลายเป็นสีน้ำตาลในช่วงระยะเวลาเร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BA (Hopfer and Blank, 1976) ต่อจากนั้น ได้มีการศึกษาทดลองสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ คือ minimal synthetic caffeic acid medium (MSCAM) โดยเติมสาร caffeic agar กับ ferric citrate เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ที่มีส่วนผสมของ กลูโคส กับสารสกัดจากยีสต์ ซัลเฟต พบว่า โคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSCAM ให้สีน้ำตาลเข้มและช่วง

ระยะเวลาการเกิดสีเร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ทำให้ทราบว่าน้ำตาลกลูโคสและซัลเฟตไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase และการกระตุ้นสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้ออีกด้วย (Vidotto et al., 2004)

การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อ *C. neoformans* จากเชื้อสายพันธุ์อื่นนั้น มีหลักการคัดเลือกที่สำคัญ ดังนั้น ระยะเวลาการเจริญเติบโต ระยะเวลาการสร้างเม็ดสีเมลานินของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการเตรียม และราคาต้นทุนการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตและการสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด คือ sunflower seed agar (SSA), mustard seed agar (MSA), henna agar (HA), niger seed agar (NA) และ tobacco agar (TA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ SSA มีประสิทธิภาพทำให้เชื้อเจริญเติบโตและปรากฏโคโลนีสีน้ำตาลภายใน 48 ชั่วโมงเร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น รวมทั้งกระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงมีขั้นตอนง่ายและต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อ *C. neoformans* เบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างหลากหลายและแตกต่างกัน (Katiyar et al., 2011)

การปนเปื้อนแบคทีเรียหรือเชื้อราในกลุ่ม saprophyte จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม กระบวนการเก็บเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเพาะแยกเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 24 ถึง 48 ชั่วโมง ขณะที่เชื้อ *C. neoformans* เจริญเติบโตในช่วงระยะเวลา 3 ถึง 7 วัน ทำให้แบคทีเรียแย่งสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เชื้อ *C. neoformans* เจริญได้ช้า รวมทั้ง เชื้อราในกลุ่มย่อยสลาย (saprophyte) มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าและเป็นราสาย มีโคโลนีฟู กระจายปกคลุมโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* อย่างรวดเร็ว ดังนั้น การเติมยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรีย ซึ่งยาปฏิชีวนะที่นิยม ได้แก่

- กลุ่ม aminoglycosides เช่น เจนตามัยซิน สเตรบโตมัยซินซัลเฟต โดยจับจำเพาะกับ 30s subunit ของ ribosomal protein แล้วออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (McDonnell and Russell, 1999) จากการศึกษาปริมาณยาที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ยาเจนตามัยซิน 0.025% w/v และ ยาสเตรบโตมัยซินซัลเฟต 0.002% w/v (Sriburee et al., 2004)

- กลุ่ม chloramphenicol กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ ซึ่งปริมาณยาที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่างความเข้มข้น 0.2 ถึง 0.04% w/v (Costa et al., 2010)

- กลุ่ม penicillins กลไกการออกฤทธิ์ขัดขวางสร้างผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งปริมาณยาที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่างความเข้มข้น 0.004% w/v (Sriburee et al., 2004)

- สารเคมี biphenyl คือ สารประกอบเคมีอินทรีย์ ไม่สามารถละลายในน้ำ แต่ละลายดีในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ หรือ อีเทอร์ กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งปริมาณที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ระดับความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตรของเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (Litvintseva et al., 2011)

2.7.2 การวินิจฉัยแยกเชื้อ *C. neoformans*

เชื้อ *Cryptococcus spp.* นั้น ประกอบด้วย 2 สปีชีส์หลักๆ คือ *C. neoformans* และ *C. gattii* (Chowdhary et al., 2012) ซึ่งกระบวนการระบุแยกเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์ในห้องปฏิบัติการทดลองทั่วไป จะทดสอบคุณลักษณะพื้นฐานของเชื้อ โดยดูลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการย้อมสีแกรมหรือสี indian ink ทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมี (Schmeding et al., 1984) (ตารางที่ 1) ในปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจทดสอบแยกเชื้อ *Cryptococcus spp.* จากคุณสมบัติความแตกต่างของการใช้น้ำตาล ชื่อทางการค้า คือ API 20 AUX แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ชุดตรวจนี้ไม่สามารถระบุยืนยันเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* ได้ (McTaggart et al., 2011) ทำให้มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกสปีชีส์เชื้อ เพื่อสะดวกและให้ผลที่รวดเร็วในการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ เช่น

- อาหารเลี้ยงเชื้อ creatinine dextrose bromothymol blue (CDB) agar จากคุณสมบัติของการใช้สารครีเอตินินที่เป็นแหล่งคาร์บอนของการเจริญเติบโต โดยเชื้อ *C. gattii* สามารถสร้างเอนไซม์ creatinine deiminase เปลี่ยนครีเอตินินเป็นแอมโมเนียกับmethylhydantion เกิดความเป็นเบสสูง ทำให้อินดิเคเตอร์ bromothymol blue เปลี่ยนจาก pH 6.0 เป็น 7.6 ส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว ขณะที่ เชื้อ *C. neoformans* สามารถสร้างเอนไซม์ creatinine deiminase ปริมาณน้อยมากจึงทำให้เกิดแอมโมเนียน้อย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี (Irokanulo et al., 1994)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ glycine-cycloheximide-phenol red (GCP) agar ถูกพัฒนาโดย Salkin และ Hurd จากการเติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide ร่วมกับไกลซีน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของการเจริญเติบโต อีกทั้งใส่ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ (Duston et al., 1981) และยา cycloheximide ปริมาณ 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อ *C. neoformans* ไม่เจริญเติบโต ขณะที่ เชื้อ *C. gattii* สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะและใช้ไกลซีนเป็นแหล่งคาร์บอนการเจริญเติบโต ส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้นจาก 6.8 เป็น 8.2 ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองกลายเป็นสีแดง (Salkin and Hurd, 1982)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) agar พัฒนาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CDB กับ GCP ที่ให้ผลบวกปลอมและผลลบปลอม ด้วยการเติมไกลซีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 แทนสารครีเอตินินและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ เติมนสาร L-canavanine ปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสำหรับแหล่งคาร์บอน และมี bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 พบว่า เชื้อ *C. gattii* ใช้ไกลซีนและสาร

L-canavanine เกิดความเป็นเบสสูง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่ เชื้อ *C. neoformans* อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นสีเหลืองเหมือนเดิม นอกจากนี้ จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ CDB GCP และ CGB เพื่อแยกเชื้อ *C. gattii* ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ CGB มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ CDB กับ GCP (Kwon-Chung et al., 1982)

ดังนั้น การแยกสายพันธุ์เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ อาหารเลี้ยงเชื้อ CGB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมและให้ผลที่แน่นอน แต่มีข้อเสียระยะเวลาวิจจัยที่ช้า ดังนั้น จึงมีการพัฒนาวิธีระบุแยกสายพันธุ์เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CGB ร่วมกับการตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยาคู่กันด้วย (Nakamura et al., 1998) เพื่อลดการเกิดผลลบปลอมและให้ผลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งจากการรายงานใช้เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) แยกเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* โดยออกแบบลำดับเบสไพรเมอร์ที่จำเพาะยีนเอนไซม์ aminotransferase บริเวณโคโมโซมที่ 3 ของเชื้อ *C. neoformans* และลำดับเบสที่จำเพาะยีนเอนไซม์ polymerase บริเวณโคโมโซมที่ 2 ของเชื้อ *C. gattii* (Nakamura et al., 1998) ต่อจากนั้น พัฒนาเทคนิคสำหรับแยกสายพันธุ์เชื้ออย่างต่อเนื่อง จนกระทั่ง ปี 2008 มีการรายงานใช้เทคนิค multiplex PCR แยกระหว่างเชื้อ *C. neoformans* กับ *C. gattii* โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* พบว่า มีระดับความไวต่อดีเอ็นเออย่างน้อย 1.25 นาโนกรัม และมีความจำเพาะ 100 ซึ่งมีความผิดพลาดน้อยกว่า CGB ที่มีความผิดพลาดถึงร้อยละ 4.58 (Leal et al., 2008)

ตารางที่ 1 การทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii*

น้ำตาล	ผลทดสอบ	น้ำตาล	ผลทดสอบ
Glucose	+	N-Acetyl-D-glucosamine	v
Galactose	+	Methanol	-
L-Sorbose	-	Ethanol	w
Sucrose	+	Glycerolo	-
Maltose	+	Erythritol	-
Cellobiose	+	Ribitol	v
Trehalose	+	Galactitol	+
Lactose	-	D-Mannitol	+
Melibiose	-	D-Glucitol	+
Melezitose	+	α -Methyl-d-glucoside	+
Inulin	v	Salicin	+
Soluble starch	+	D-Gluconate	+
D-Xylose	+	DL-Lactate	-
L-Arabinose	+	Succinate	v
D-Arabinose	+	Citrate	v
D-Ribose	v	Inositol	+
L-Rhamnose	+	Hexadecane	-
D-Glucosamine	v	Nitrate	-
Raffinose	+	Vitamin-free	-

หมายเหตุ (+) หมายถึง positive (-) หมายถึง negative (v) หมายถึง variety (w) หมายถึง weak positive

2.7.3 การตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *C. neoformans*

เชื้อ *C. neoformans* ประกอบด้วย 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ A (*C. neoformans* var. *grubii*) ซีโรไทป์ D (*C. neoformans* var. *neoformans*) ซีโรไทป์ AD (*Cryptococcus* species complex) และ เชื้อ *C. gattii* ประกอบด้วย 2 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ B กับ C ซึ่งวิธีตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *C. neoformans* มีหลายวิธี เช่น ปฏิกริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination test) ด้วยชุดตรวจ Crypto-check จากบริษัท latron ประเทศญี่ปุ่น ของคุณ Mitsubishi kagaku ที่คิดชุดตรวจนี้ด้วยหลักการ ความแตกต่างการเกาะกลุ่มต่อแอนติบอดี (ซีรัม) ทั้งหมด 8 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A เกาะกลุ่มกับแอนติบอดี 1 และ 7 ซีโรไทป์ D เกาะกลุ่มกับแอนติบอดี 1 และ 8 ซีโรไทป์ AD เกาะกลุ่มกับแอนติบอดี 1, 7 และ 8 เชื้อ *C. gattii* ซีโรไทป์ B เกาะกลุ่มกับแอนติบอดี 1 และ 5 ซีโรไทป์ C เกาะกลุ่มกับแอนติบอดี 1 และ 6 ข้อดีของชุดตรวจนี้มีความแม่นยำและความจำเพาะสูง ใช้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว เหมาะกับตัวอย่างซีรัม น้ำไขสันหลัง แต่ข้อเสียของชุดตรวจนี้ให้ผลลบปลอมจากตัวอย่างที่เป็น non-capsulate หรือ non-typable จึงเป็นชุดตรวจที่นิยมใช้ห้องคลินิกหรือห้องปฏิบัติการอย่างแพร่หลาย จนกระทั่งปี 2004 ชุดตรวจ Crypto-check ได้หยุดการผลิตอย่างไม่มีสาเหตุ เกิดผลให้มีการตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อยากมากขึ้น (Ikeda et al., 1982) จึงเริ่มพัฒนาวิธีการตรวจทางด้านโมเลกุล เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแทนการใช้ชุดตรวจ Crypto Check ด้วยการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อ virulence factors เช่น ยีน *laccase* (Enache-Angoulvant et al., 2007) ยีน *capsule* (Ito-kuwa et al., 2007)

2.8 พฤติกรรมนกพิราบ

นกพิราบหรือนกพิราบป่า (Rock pigeon หรือ Rock dove) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Columba livia* อยู่ในวงศ์นกพิราบและนกเขา (Columbidae) มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรป เอเชียตะวันตก และแอฟริกาเหนือ แพร่กระจายไปตามพื้นที่ต่างๆทั่วโลก ซึ่งนกพิราบป่ามีลักษณะคล้ายนกเขา แต่มีรูปร่างโตกว่านกเขา มีรูปแบบของขนและสีของลำตัวมีความแตกต่างกันในแต่ละทวีป ลักษณะรูปร่างทั่วไป ลำตัวมีขนสีเทาอมฟ้า ปีกแต่ละข้างมีแถบสีดำสองแถบแทรก ขาและเล็บสีแดง เพศผู้มีรูปร่างขนาดใหญ่ ตัวสูง มีหัวกะโหลกขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย นิสัยก้าวร้าว ทะเลาะกับตัวผู้ในฝูง แต่ไม่รังแกตัวเมีย ตัวเมียเมื่อยืนอยู่บนพื้นราบเรียบจะเห็นสันกระดูกตรงยาวกว่าตัวผู้ รักความสงบ มีถิ่นอาศัยตามผาหินหรือโขดหินชายฝั่ง สร้างรังบนพื้นแข็งตามช่อง ไม่ชอบสร้างรังบนต้นไม้ จับคู่ผสมพันธุ์เมื่ออายุประมาณ 6-8 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและความสมบูรณ์นกพิราบ สามารถออกลูกได้ตลอดปี ครั้งละ 2-3 ตัว และช่วยกันดูแลลูก นกพิราบเป็นนกที่มีคู่ครองตัวเดียวจะไม่แยกจากกันแม้ว่าคู่จะตายไป อาหารของนกพิราบ คือ เมล็ดพันธุ์ชนิดต่างๆ เช่น ข้าวเปลือก ถั่ว เมล็ดทานตะวัน เปลือกหอยป่น นอกจากนี้ นกพิราบจะกินกรวดหรือเศษหินและอิฐเข้าไปเพื่อไปช่วยการย่อยอาหาร นกพิราบสามารถบินออกหาอาหารได้ระยะทางไกลระยะประมาณ 100 ถึง 1000 กิโลเมตรต่อวัน ความเร็ว 80 ถึง 94.5 กิโลเมตรต่อชั่วโมง โดยการบินของนกพิราบจะไม่ใช้แรงลมแต่ใช้หัวและหางบังคับทิศทาง นอกจากนี้ ยังใช้ตำแหน่งอาทิตย์ แสงอาทิตย์ รวมทั้งตำแหน่งของดวงจันทร์ จดจำทิศทางและกำหนดทิศทาง จึงเปรียบเสมือนภายในตัวมีนาฬิกาเปรียบเทียบกับตำแหน่งของดวงอาทิตย์ ค่อยบอกมุมของอาทิตย์ อีกทั้ง นกพิราบมีสายตาที่ดี มองเห็นภาพในมุมมองกว้าง 340 องศา ไกลถึง 50 กิโลเมตร ประมวลข้อมูลภาพเร็วกว่ามนุษย์ 3 เท่า (Walcott, 1996)

ความสัมพันธ์ระหว่างนกพิราบกับมนุษย์นับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน นกพิราบถูกนำมาเลี้ยงเพื่อความสวยงาม เพื่อนำมาเป็นอาหารและเครื่องมือใช้ส่งสารไปยังสถานที่ไกลๆ ซึ่งปัจจุบันพบว่า นกพิราบมีประชากรในเขตเมืองเพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากอาหารและสิ่งแวดล้อมบริเวณที่อยู่อาศัยถูกจำกัด จึงบินออกหาอาหารในเขตเมืองที่มีแหล่งอาหาร ซึ่งอาหารที่นกพิราบหาในเขตเมือง เป็นจำพวกเศษขนมปัง อาหารปลาเม็ด อาหารเหล่านี้จะกระตุ้นการขยายพันธุ์ของนกพิราบทำให้มีจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้น และนอกจากนี้ พบว่าเมื่อนกพิราบบินมายังในเขตเมืองจะไม่ค่อยบินกลับไปยังรังเดิมที่อาศัย ซึ่งทำการสร้างรังบริเวณตามอาคารสูง ซอกแคบๆที่จำลองคล้ายหน้าผาเหมือนรังเดิม (Okabayashi et al., 2006)

2.9 แนวทางการปนเปื้อนของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาเชื้อ *C. neoformans* สามารถทำลายด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ ดังต่อไปนี้ เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่ม chlorhexidine ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 กลุ่มฟีนอลิก กลุ่มกลูตาราลดีไฮด์ กลุ่มฟอร์มาลดีไฮด์ (The Centre for Food Security and Public Health (CFSPH), 2013) กลุ่มออกซิไดซ์หรือสารกลุ่มเปอร์ออกซิเจน และกลุ่มควอเทอร์นารีแอมโมเนียม โดยการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีกลไกที่แตกต่างกัน กล่าวคือ น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเทอร์นารีแอมโมเนียม และ กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรด์ออกฤทธิ์บริเวณผนังเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำปฏิกิริยากับไขมันและโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (ตารางที่ 2) ส่วนน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ ทำลายหมู่ไรโอดอลของโปรตีนและเอนไซม์ของเชื้อ (McDonnell and Russell, 1999) ทำให้เชื้อถูกทำลาย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพทำลายเชื้อ *C. neoformans* หรือยีสต์ที่แตกต่างกันในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่สัมผัส อย่างไรก็ตาม เชื้อมีกลไกป้องกันและทนทานต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ ด้วยการมีผนังแคปซูลที่หนา สร้างเมลานินหรือโปไลฟิล์มเพื่อป้องกันเซลล์ถูกทำลาย ทำให้น้ำยาฆ่าเชื้อไม่สามารถซึมหรือแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของเชื้อได้ นอกจากนี้ ปัจจัยด้านอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่างของน้ำ ระยะเวลาที่สัมผัส ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อได้จากการศึกษา การเพิ่มความเป็นกรดต่างช่วยเพิ่มการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มควอเทอร์นารีแอมโมเนียมและน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มกลูตาราลดีไฮด์ได้ดีมากขึ้นแต่ทำให้การออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มฟีนอลและน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มไฮโปคลอไรด์ต่ำลง นอกจากนี้ การปนเปื้อนสารอินทรีย์ เช่น สิ่งขับถ่าย ดิน เลือด มีผลทำให้ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทำลายเชื้อลดลง (Russell, 2004) ในปัจจุบันการรายงานแนวทางการปนเปื้อนของเชื้อ *C. neoformans* ทั้งในสิ่งแวดล้อมและโรงพยาบาลมีข้อมูลคำแนะนำการใช้ยาฆ่าเชื้อทำลายต่อเชื้อ *C. neoformans* ที่จำกัด ดังนั้น การพัฒนาประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อเป็นแนวทางการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและโรงพยาบาล โดยให้น้ำยาฆ่าเชื้อสามารถดูดซึมแทรกเข้าไปบริเวณผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้ผนังและเยื่อหุ้มถูกทำลาย อีกทั้ง ต้องคำนึงถึงระดับความเข้มข้นและระยะเวลาฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ที่เหมาะสม เพื่อความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ผู้นำไปใช้และความสะดวกต่อการใช้งาน

ตารางที่ 2 ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาของน้ำยาฆ่าเชื้อทำลายเชื้อยีสต์

น้ำยาฆ่าเชื้อ	ระดับความเข้มข้น	ระยะเวลา	เชื้อเป้าหมาย	เอกสารอ้างอิง
Quaternary ammonium compounds	1% - 2%	10 นาที	<i>C. neoformans</i>	(Kruse et al., 1963)
Sodium hypochlorite	0.33%	15 นาที	<i>C. neoformans</i>	(Dvork, 2008)

บทที่ 3

วิธีการทดลองหรือระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและเพาะแยกเชื้อ *C. neoformans*

3.1.1 การเก็บตัวอย่างจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร

เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบจำนวนทั้งหมด 164 ตัวอย่าง ใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร ได้แก่ เขตพระนคร เขตดุสิต เขตปทุมวัน เขตมีนบุรี เขตสัมพันธวงศ์ เขตจตุจักร เขตคลองเตย เขตลาดพร้าว เขตหลักสี่ เขตดินแดง และเขตหนองแขม (ตารางที่ 3) ช่วงระยะเวลา ปี พ.ศ. 2555 ถึง 2557 โดยแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกและแบบแห้ง ดังนี้ บริเวณสวนสาธารณะ 5 สถานที่ๆละ 2-3 ตัวอย่าง วัด 5 สถานที่ๆละ 2-3 ตัวอย่าง อาคารเรียนและอาคารพาณิชย์ตามแหล่งชุมชน 5 สถานที่ๆละ 2-3 ตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ แต่ละพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่างบริเวณที่มีสิ่งขับถ่ายนกพิราบหนาแน่น ปริมาณ 1-2 กรัมต่อพื้นที่ 1×1 ตารางเมตร โดยใช้ช้อนพลาสติกปลอดเชื้อ ตักตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกหรือแบบแห้งใส่ภาชนะปลอดเชื้อ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นทำการเพาะเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง (Mseddi et al., 2011) จุดบันทึก ลักษณะสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกที่ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อน เห็นวาวหรือน้ำเคลือบสิ่งขับถ่าย และมีสีขาวหรือยูริกปนเปื้อนหรือแบบแห้งที่ซึ่งลักษณะเป็นผง ไม้องค์ประกอบของน้ำ (ภาพที่1) การสัมผัสแสงแดด (ภาพที่2) บริเวณและลักษณะทางกายภาพของสถานที่เก็บตัวอย่าง (ภาพที่3)

ตารางที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร

เขต	สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
พระนคร		19
	วัดโพธิ์	5
	พระราชอุทยานสราญรมย์	5
	สนามหลวง	5
	วัดสุทัศน์	4
ดุสิต		14
	วัดเทวราชกุญชรวรวิหาร	5
	วัดระฆังโฆสิตารามวรวิหาร	4
	ประดิพันธ์ ซอย 25	5
หลักสี่		13
	วัดหลักสี่	5
	วัดดอนเมือง	5
	วัดพระศรีมหาธาตุ	4
มีนบุรี		12
	สวนหลวงร.9	5
	หมู่บ้านวัชรพล	3
	วัดศรีกุเระชา	4
สัมพันธวงศ์		15
	วัดชัยชนะสงคราม	5
	วัดพุทธสยาม	5
	ถนนเยาวราช	5
หนองแขม		16
	วัดม่วง	5
	วัดอุดมรังสี	6
	วัดราชบุรุษบำรุง	5

ตารางที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร (ต่อ)

เขต	สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
ราชเทวี		15
	อนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิ	5
	สวนสันติภาพ	5
	ใต้ทางด่วนด้านอนุสาวรีย์	5
จตุจักร		21
	วัดเสมียนนารี	5
	สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์	5
	สวนจตุจักร	6
คลองเตย	วัดเทวสุนทร	5
		15
	คลองเตยนอก	5
ลาดพร้าว	คลองเตยใน	5
	อุทยานเบญจสิริ	5
		16
ปทุมวัน	วัดใหม่เสนานิคม	5
	วัดลาดปลาเค้า	6
	วัดลาดพร้าว	5
รวม	สวนลุมพินี	4
	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	5
		164



ภาพที่ 1 ลักษณะความชื้นของสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้ง (รูปซ้าย) และแบบเปียก (รูปขวา)



ภาพที่ 2 รูปแบบการสัมผัสแสงแดดของสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบใต้สิ่งกำบัง (รูปซ้าย) และแสงแดด (รูปขวา)



ภาพที่ 3 ลักษณะพื้นที่เก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบสัมผัสคอนกรีตหรือปูน (รูปซ้าย) และพื้นหญ้าหรือดิน (รูปขวา)

3.1.2 การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ

นำตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ 1 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลาย peptone saline diluents (PSD) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลล 0.04% w/v (Sigma-Aldrich, USA) สเตربتอิมัยซินซัลเฟต 0.02% w/v (Sigma-Aldrich, USA) และสารเคมีไบฟีนิล 0.01% w/v (Alfa Aesar, UK) (Jang et al., 2011) ผสมตัวอย่างและสารละลาย PDS ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่ากวนสารละลายอัตราเร็ว 2500 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที นำตัวอย่างเพาะในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้น นำตัวอย่างตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนแยกชั้นและให้สปอร์ของเชื้อ *C. neoformans* ลอยอยู่บริเวณชั้นสารละลายใส ทำการเจือจางตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 10^0 ถึง 10^{-5} (Sriburee et al., 2004) และเพาะเชื้อแบบวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ caffeic acid agar (CA) ที่ผสมคลอแรมเฟนิคอลล 0.04% w/v (Sigma-Aldrich, USA) สเตربتอิมัยซินซัลเฟต 0.02% w/v (Sigma-Aldrich, USA) และไบฟีนิล 0.01% w/v (Alfa Aesar, UK) ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (Hedayati et al., 2011) ต่อจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4-7 วัน สังเกตการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA มีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว สีขาวครีมจนถึงสีเหลืองออกน้ำตาล โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม นูน ขอบเรียบ สีน้ำตาลมันวาว จากนั้น ทำการคัดเลือกเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และ CA อย่างน้อยตัวอย่างละ 2-3 โคโลนี และเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ในการใช้ทดสอบระบุแยกคุณลักษณะของเชื้อ *C. neoformans* (Cafarchia et al., 2006)

3.1.3 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans*

วิธีการนับจำนวนโคโลนี โดยนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 20-200 โคโลนี ต่อจากนั้นหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีตามสูตร และรายงานผลการตรวจนับเป็นหน่วยโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (CFU/g) ISO 7218:1996

$$\text{CFU/g} = \frac{EC}{(v1n1+0.1n2)d}$$

เมื่อ $V1 =$ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเพาะเชื้อ

$EC =$ ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 20-200 โคโลนี

$n1 =$ จำนวนงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 20-200 โคโลนีที่ระดับความเข้มข้นแรก

$n2 =$ จำนวนงานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 20-200 โคโลนีที่ระดับความเข้มข้นที่สอง

$d =$ ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับได้ในช่วง 20-200 โคโลนี

3.2 การศึกษาคุณลักษณะของเชื้อ *C. neoformans*

การวินิจฉัยแยกเชื้อ *C. neoformans* เริ่มจากการทดสอบคุณสมบัติขั้นปฐมภูมิ ด้วยการย้อมสีแกรมสังเกตลักษณะจุลทรรศน์วิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งผนังเซลล์ของเชื้อติดสีม่วง รูปร่างกลม และย้อมสีหมึกสีอินเดีย (indian ink) เพื่อดูแคปซูลของเชื้อที่มีลักษณะใสรอบเซลล์ ต่อจากนั้น ทำการทดสอบคุณสมบัติขั้นทุติยภูมิจากคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ การผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และการใช้น้ำตาล 6 ชนิด (sugar assimilation) ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส มอลโตส กาแลคโตส และ เดกซ์โตรส อ่านผลโดยเปรียบเทียบเป็นเชื้ออ้างอิง *C. neoformans*, CN 175 (Cafarchia et al., 2006)

3.2.1 การตรวจยืนยันเชื้อ *C. neoformans* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ชนิด multiplex PCR

เตรียมเชื้อสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ 2-3 โคโลนีเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว yeast extracts peptone dextrose broth (YPDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้น ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 2600 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้น ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับเซลล์ ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เวลา 3 นาที เทสารละลายส่วนบน ทำซ้ำ 3 ครั้ง

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Wizard[®] Genomic DNA purification kit (Promega, USA) มีขั้นตอนดังนี้ ทำลายผนังเซลล์ให้แตก โดยการนำเซลล์ผสมกับเม็ดบีด (Sigma, USA) ขนาด 425 ถึง 600 ไมโครเมตร อัตรา 1 ต่อ 1 เติมสารละลาย cell lysis ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที และเขย่าแนวตั้ง เวลา 45 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 รอบ (Yamada et al., 2002) ตรวจสอบเซลล์แตกโดยการย้อมสีแกรม ต่อจากนั้น ทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสด้วยสารละลาย nuclei lysis และตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ซึ่งวิธีขั้นตอนทำตามในคู่มือของชุดสกัด ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีการวิธี agarose gel electrophoresis และปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop, Thermo scientific, USA) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ชนิด multiplex PCR

นำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C. neoformans* และ *C. gattii* (Mseddi et al., 2011; Chae et al., 2012) (ตารางที่ 4) ผสมส่วนประกอบของ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ดังนี้ GoTag Green Master Mix, 2X (Promega, Medisom, WI, USA) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10-20 นาโนกรัม Nuclease-free water ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ต่อจากนั้น เพิ่มสารพันธุกรรมในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-rad, USA) มีวงจรอุณหภูมิ (thermal cycle) ดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 8 นาที denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที (Aoki et al., 1999; Leal et al., 2008; Mseddi et al., 2011) แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ความเข้มข้น วัณอะกาโรส ร้อยละ 1 ปริมาณกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ระยะเวลา 20 นาที จากนั้นอ่านผลจากแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยแสงยูวีจากเครื่อง gel documentation (Bio-rad, USA.) เปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* var. *grubii*, WM148, serotype A, *C. neoformans* var. *grubii*/var. *neoformans*, WM628, serotype AD และ *C. neoformans* var. *neoformans*, WM629, serotype D hybrid,

ตารางที่ 4 รายละเอียดข้อมูลจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับใช้แยกชนิดเชื้อ *C. neoformans*

เชื้อ	ชื่อ ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด ผลิตภัณฑ์(bp)
<i>C. neoformans</i>	CNa-70S	5'- ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC -3'	695
	CNa-70A	5'- ATTGCGTCCATGTTACGTGGC -3'	
<i>C. gattii</i>	CNb-49S	5'- ATTGCGTCCAAGGTGTTGTTG -3'	448
	CNb-49A	5'- ATTGCGTCCATCCAACCGTTATC -3'	

3.2.2 การจำแนกซีโรไทป์เชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสชนิด multiplex PCR

ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อลำดับเบสบริเวณยีน *laccase* ของเชื้อ *Cryptococcus* spp. (ตารางที่ 5) ผสมส่วนประกอบของสารละลาย PCR ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ดังนี้ GoTag Green Master Mix, 2X (Promega, Medisom, WI, USA) 15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม Nuclease-free water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ต่อจากนั้น เพิ่มสารพันธุกรรมในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-rad, USA) มีวงจรอุณหภูมิ (thermal cycle) ดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส 60 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.5 นาที จำนวน 40 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที (Ito-Kuwa et al., 2007) จากนั้น นำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 2 ปริมาณกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ระยะเวลา 30 นาที อ่านผลจากแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยแสงยูวีจากเครื่อง gel documentation (Bio-rad, USA) เปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* var. *grubii*, WM148, serotype A, *C. neoformans* var. *grubii*/var. *neoformans* hybrid, WM628, serotype AD และ *C. neoformans* var. *neoformans*, WM629, serotype D

ตารางที่ 5 รายละเอียดข้อมูลจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับแยกซีโรไทป์เชื้อ *C. neoformans*

ซีโรไทป์	ชื่อ ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
Serotype A	LAC1_1	5'-GGAACAGCAACCACACTACTG-3'	880
	LAC1_4	5'-GTTGTGGAAGGCAAAGAAAC-3'	
	LAC1_2	5'-CATATTGGGTGGCATCTTACTGAGGGA-3'	760
	LAC1_4	5'-GTTGTGGAAGGCAAAGAAAC-3'	
	LAC1_1	5'-GGAACAGCAACCACACTACTG-3'	280
	LAC1_2	5'-CATATTGGGTGGCATCTTACTGAGGGA-3'	
Serotype D	LAC1_1	5'-GGAACAGCAACCACACTACTG-3'	1000
	LAC1_3	5'-CCAGGGAACATGTTGTTGAC-3'	
	LAC1_2	5'-CATATTGGGTGGCATCTTACTGAGGGA-3'	760
	LAC1_4	5'-GTTGTGGAAGGCAAAGAAAC-3'	
Serotype B	LAC1_1	5'-GGAACAGCAACCACACTACTG-3'	1000
	LAC1_3	5'-CCAGGGAACATGTTGTTGAC-3'	
Serotype C	LAC1_2	5'-CATATTGGGTGGCATCTTACTGAGGGA-3'	480
	LAC1_4	5'-GTTGTGGAAGGCAAAGAAAC-3'	

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อต่อการฆ่าเชื้อ *C. neoformans*

น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ ได้แก่ กลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต (ผลิตภัณฑ์ A) กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ผลิตภัณฑ์ B) และ กลุ่มควอเทอนารีแอมโมเนียม (ผลิตภัณฑ์ C) ทำการทดสอบกับเชื้อ *C. neoformans* บริสุทธิ์และเชื้อที่ปนเปื้อนในสิ่งขับถ่ายด้วยวิธี dilution-neutralization method (EN 1656:2000)

3.3.1 เชื้อสำหรับทดสอบ

- เชื้ออ้างอิง *C. neoformans*

C. neoformans var. *grubii*, WM148, serotype A (Wieland Meyer, Australia)

- ตัวอย่างเชื้อ *C. neoformans* ดังนี้

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อจำนวนทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สิ่งขับถ่ายนกพิราบของแต่ละพื้นที่จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ CN_P/LP1.11/12 CN_P/LP2.11/12 CN_P/KT1.01/12 CN_P/NK1.11/12 และ CN_P/NK2.11/12 เปรียบกับเชื้อ *C. neoformans*, serotype A จากสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกแมว โรค cryptococcosis จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อจากสิ่งขับถ่ายนกเลี้ยงวงศ์ *Psittacidae* จำนวน 1 ตัวอย่าง และเชื้อจากผู้ป่วยโรค systemic cryptococcosis จำนวน 1 ตัวอย่าง

3.3.2 วิธีการยืนยันเชื้อและคุณสมบัติของเชื้อที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ

นำเชื้อจากตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่างจากการคัดเลือกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อนำมาทดสอบยืนยันเชื้อ *C. neoformans*, serotype A ด้วยวิธี multiplex PCR (Ito-Kuwa et al., 2007) และศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Cafarchia et al., 2006) รวมทั้งวัดขนาดแคปซูลของเชื้อ

3.3.3 วิธีเตรียมเชื้อ

เพาะเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เตรียม stock culture suspension โดยนำเชื้อ *C. neoformans* ประมาณ 2-3 โคลนีสผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Sabouraud dextrose broth (SDB) ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ปรับจำนวนเซลล์ของเชื้อ *C. neoformans* ปริมาณ 1×10^6 ถึง 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยการวัดความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสง 0.1 (Chong et al., 2010) และยืนยันด้วยวิธีนับจำนวนเชื้อที่ทดสอบโดยเจือจางด้วยสารละลาย PBS ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-5} และเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ด้วยวิธี spread plate ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน บันทึกผลจำนวนโคลนเชื้อทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 7218:1996

3.3.4 วิธีเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ

เตรียมความเข้มข้นน้ำยาฆ่าเชื้อ กลุ่มควอเทอนารีแอมโนเนียม (ผลิตภัณฑ์ A) กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ผลิตภัณฑ์ B) และ กลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต (ผลิตภัณฑ์ C) เจือจางน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ซึ่งความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับการทดสอบ คือ ร้อยละ 1:50 1:100 1:200 และ 1:300 โดยอ้างตามคำแนะนำจากคำแนะนำการใช้จากบริษัท (Krusel et al., 1963; Dvork, 2008; Kramontong et al., 2010)

3.3.5 วิธีทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มที่ 1 ทดสอบน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อ *C. neoformans* บริสุทธิ์ และกลุ่มที่ 2 ทดสอบน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อ *C. neoformans* บนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบปลอดเชื้อ (organic matter) ซึ่งเริ่มต้นการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อใช้ระดับความเข้มข้นตามคำแนะนำของการศึกษาก่อนหน้านี้นำมาทดสอบกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* var. *grubii*, serotype A จากนั้นจึงเลือกช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาของน้ำยาฆ่าเชื้อทำลายต่อเชื้อ *C. neoformans* ทดสอบกับตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ แมว นก และผู้ป่วย ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 คือ ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทำลายเชื้อ *C. neoformans*

นำเชื้อ *C. neoformans* จาก stock solution culture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (จำนวนเซลล์ 1×10^6 ถึง 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ใส่หลอดทดลองที่มีน้ำยาฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (1:50 1:100 1:200 และ 1:300) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมจับเวลา ช่วงระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อได้แก่ 5, 10, 15 และ 30 นาที ภายหลังจากการสัมผัสยาฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาปรับสภาพความเป็นกลาง D/E neutralization (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

ที่มีส่วนประกอบ โซเดียม-ไทรโอซัลเฟทร้อยละ 6.0 โซเดียมไกลโคลอเรทร้อยละ 1.0 และ โซเดียมไบซัลเฟทร้อยละ 2.5 ทำให้สารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดเป็นกลาง (Engley and Dey, 1970) ผสมให้เข้ากัน ระยะเวลา 5 นาที ต่อจากนั้น เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน และนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 7218:1996

กลุ่มที่ 2 คือ ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทำลายเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบปราศจากเชื้อ (organic matter)

เตรียมสารละลายสารอินทรีย์ (organic matter) ด้วยการผสมสิ่งขับถ่ายจากนกพิราบที่ปราศจากเชื้อ *C. neoformans* กับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ อัตราส่วน 1:9 (Lobova et al., 2004) ต่อจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย organic matter ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละความเข้มข้น (1:50 1:100 1:200 และ 1:300) ปริมาณ 8 มิลลิลิตร จากนั้นเติม stock solution culture (จำนวนเซลล์ 1×10^6 ถึง 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันพร้อมจับเวลา ช่วงระยะเวลาในการสัมผัสกับยาฆ่าเชื้อได้แก่ 5, 10, 15 และ 30 นาที ภายหลังจากการสัมผัสยาฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาปรับสภาพความเป็นกลาง D/E neutralization (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 นาที แล้วเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วยวิธี spread plate ทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน และนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 7218:1996

3.3.6 วิธีทดสอบกลุ่มควบคุมคุณภาพการทดลอง

- การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาปรับสภาพความเป็นกลางหรือสารยับยั้งปฏิกิริยาของน้ำยาฆ่าเชื้อ (neutralizer) ต่อการเจริญของเชื้อ *C. neoformans*

เพื่อทดสอบว่าสารละลาย Dey-Engley Neutralizing (Sigma-Aldrich, USA) ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* บริสุทธิ์ นำปิเปตดูดน้ำยาปรับสภาพความเป็นกลาง ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ผสมกับ stock solution culture (จำนวนเซลล์ 1×10^6 ถึง 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 นาที ต่อจากนั้น เพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วยเทคนิค spread plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 วัน นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 7218:1996 เปรียบเทียบกับผลการเจริญเติบโตของเชื้อจากการผสม stock solution culture กับอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB

- การทดสอบประสิทธิภาพของ neutralizer ต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ

เพื่อทดสอบความสามารถของ neutralizer ในการหยุดปฏิกิริยาของน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับน้ำยาปรับสภาพความเป็นกลาง ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 5 นาที จากนั้น นำมาผสมกับเชื้อบริสุทธิ์ (จำนวนเซลล์ 1×10^6 ถึง 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วน 9:1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมจับเวลาที่ 5, 10, 15 และ 30 นาที แต่ละช่วงเวลาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 วัน นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามมาตรฐาน ISO 7218:1996

3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลการแพร่กระจายเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบของแต่ละพื้นที่สิ่งแวดล้อมและหาความสัมพันธ์ของแหล่งชนิดปนเปื้อนต่ออุบัติการณ์การพบเชื้อด้วยสถิติแบบ Chi-square ($p \leq 0.05$) ด้วยโปรแกรม spss เวอร์ชัน 17.0 วิเคราะห์เปรียบเทียบคุณภาพน้ำยาฆ่าเชื้อที่ทำลายเชื้อ *C. neoformans* ปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบและเชื้อบริสุทธิ์ในแง่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัส

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การระบาดของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบเขตกรุงเทพมหานคร

4.1.1 การเก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ

ตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบจำนวน 164 ตัวอย่างของ 11 เขตกรุงเทพมหานคร จำแนกตามสถานที่เก็บ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ วัดบริเวณพื้นหรือผนังรอบโบสถ์ของวัดจำนวน 21 สถานที่ สวนสาธารณะบริเวณสนามหญ้าหรือพื้นศาลาพักผ่อนจำนวน 8 สถานที่ อาคารเรียนและอาคารพาณิชย์บริเวณพื้นทางเดินหรือระเบียงหรือหลังคาจำนวน 5 สถานที่ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวจัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางกายภาพสิ่งขับถ่ายนกพิราบ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 การแบ่งตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบตามสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่	จำนวนสถานที่	จำนวนตัวอย่าง
วัด	21	103
สวนสาธารณะ	8	38
อาคารเรียนและอาคารพาณิชย์	5	23
รวม	34	164

ตารางที่ 7 การแบ่งตัวอย่างตามลักษณะแหล่งชนิดปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบ

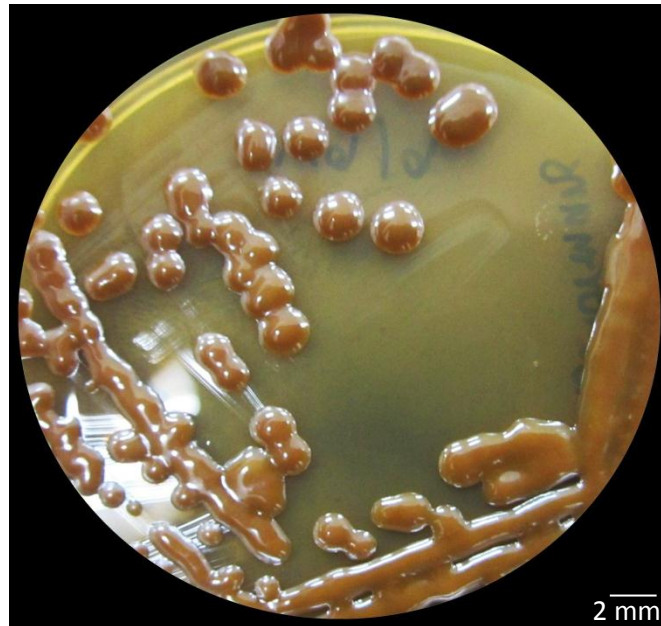
แหล่งชนิดที่ปนเปื้อน	จำนวนตัวอย่าง
ความชื้นของสิ่งขับถ่ายนกพิราบ	
- แบบเปียก	67
- แบบแห้ง	97
สีสัมผัสแสงแดด	
- สัมผัสแสงแดด	99
- ใต้สิ่งกำบังแสงแดด	65
ลักษณะพื้นที่ที่สัมผัส	
- คอนกรีตหรือปูน	110
- พื้นหญ้าหรือพื้นดิน	54

4.1.2 การวินิจฉัยแยกเชื้อ

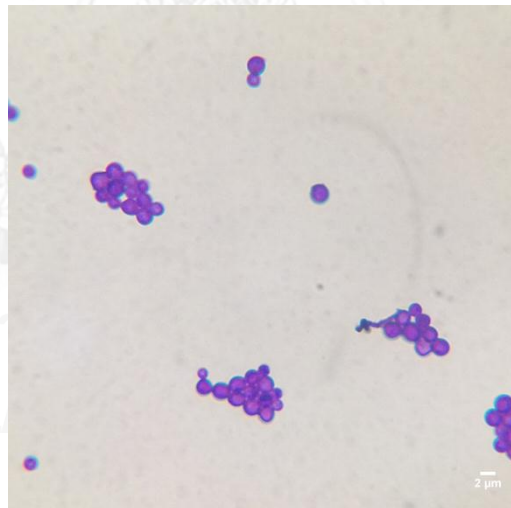
การคัดเลือกเชื้อที่คาดว่าเป็เชื้อ *C. neoformans* ตามลักษณะโคโลนี ขนาด 2-3 มิลลิเมตร กลมมนูน สีขาวหรือสีครีม ผิวหน้าเย้มน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (ภาพที่ 4) และโคโลนี ขนาด 2-3 มิลลิเมตร กลมมนูน สีน้ำตาล ผิวหน้าเย้มน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA (ภาพที่ 5) โดยจากคัดเลือกโคโลนี 2-3 โคโลนีของแต่ละตัวอย่างเพื่อทดสอบระบุการแยกเชื้อขั้นต่อไป จากการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนโคโลนีที่สงสัยทั้งหมด 115 ไอโซเลตในตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่าง ต่อจากนั้น นำไอโซเลตทดสอบระบุคุณลักษณะเชื้อ *C. neoformans* ขึ้นต้นด้วยการย้อมสีแกรม ดูลักษณะเซลล์ติดสีม่วง รูปร่างกลม (ภาพที่ 6) และการย้อมสีหมึกอินเดียสังเกตลักษณะแคปซูลของเชื้อ (ภาพที่ 7) ร่วมกับการให้ผลบวกในการทดสอบ urease (ภาพที่ 8) ที่ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะกับเชื้อ *C. neoformans* สามารถแยกไอโซเลตดังกล่าวที่คาดว่าเป็ *C. neoformans* ได้จำนวน 38 ไอโซเลตในตัวอย่างจำนวน 18 ตัวอย่าง ต่อจากนั้น นำมาทดสอบการใช้น้ำตาลทั้ง 6 ชนิด คือ ซูโครส ทรีฮาโลส แลคโตส มอลโตส และกาแลคโตส (Kwon-Chung., 1998) พบว่า ทุกไอโซเลตให้ผลทดสอบเหมือนกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* CN175 (Prof. Dr.Susumu Kajiwara, Japan) คือ สามารถใช้น้ำตาลซูโครส ทรีฮาโลส มอลโตส กาแลคโตส แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (ตารางที่ 8)



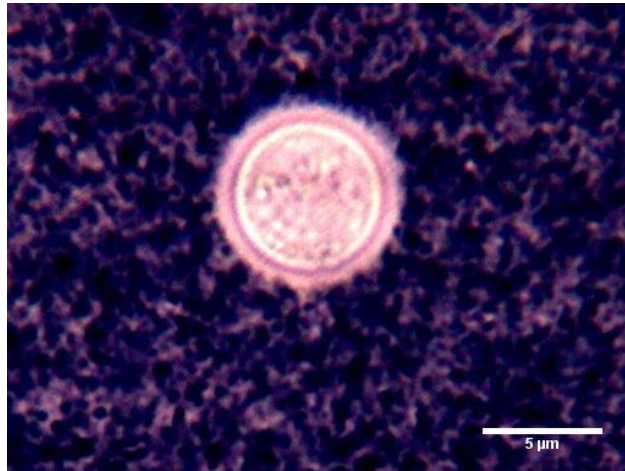
ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 250 เท่า



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ caffeic acid agar



ภาพที่ 6 จุลสัณฐานของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการย้อมสีแกรม (กำลังขยาย 100 เท่า)



ภาพที่ 7 ลักษณะแคปซูลของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยการย้อมสี indian ink



ภาพที่ 8 การใช้ยูเรียของเชื้อ *C. neoformans* ผลบวก (ด้านซ้าย) และผลลบ (ด้านขวา)

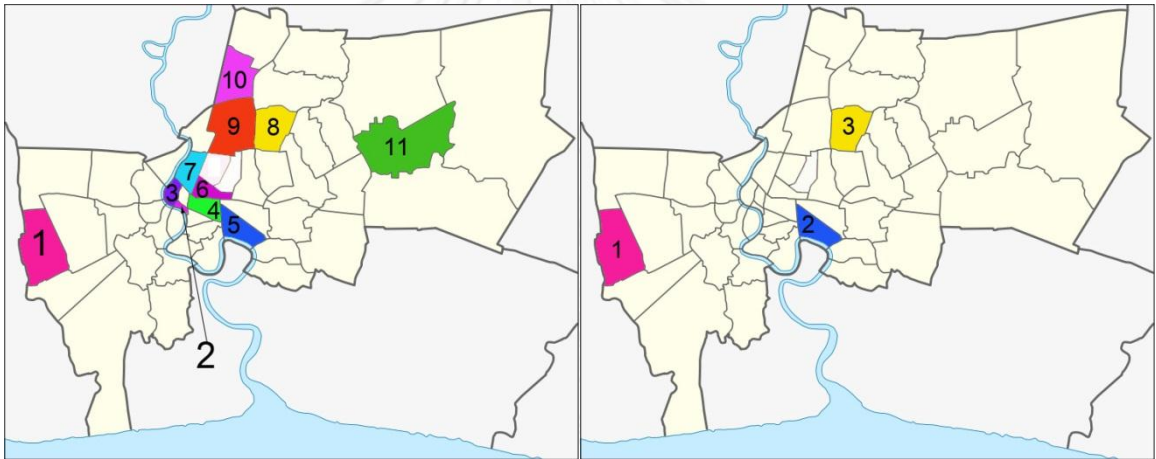
ตารางที่ 8 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบจำนวน 38 ไอโซเลต

Order	Sugar assimilation						Order	Sugar assimilation						
	CA	CS.	Su.	Tre.	Lac.	U.		CA	CS.	Su.	Tre.	Lac.	U.	
1	+	+	+	+	-	+	21	+	+	+	-	-	+	+
2	+	+	+	+	-	+	22	+	+	+	+	-	+	+
3	+	+	+	+	-/v	+	23	+	+	+	+	-	+	+/v
4	+	+	+	+	-	+	24	+	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	-	+	25	+	+	+	+	-	+	+
6	+	+	+	+	-	+	26	+	+	+	+	-	+	+
7	+	+	+	+	-	+	27	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	-	+	28	+	+	+	+	-	+	+
9	+	+	+	+	-	+	29	+	+	+	+	-	+	+
10	+	+	+	+	-/v	+	30	+	+	+	+	-	+	+
11	+	+	+	+	-	+	31	+	+	+	+	-	+	+
12	+	+	+	+	-	+	32	+	+	+	+	-	+	+
13	+	+	+	+	-	+	33	+	+	+	+	-	+	+
14	+	+	+	+	-	+	34	+	+	+	+	-	+	+
15	+	+	+	+	-	+	35	+	+	+	+	-	+	+
16	+	+	+	+	-/v	+	36	+	+	+	+	-	+	+
17	+	+	+	+	-	+	37	+	+	+	+	-	+	+
18	+	+	+	+	-	+	38	+	+	+	+	-	+	+
19	+	+	+	+	-	+	CN 175	+	+	+	+	-	+	+
20	+	+	+	+	-	+		+	+	+	+	-	+	+

หมายเหตุ (+) หมายถึง positive (-) หมายถึง negative (v) หมายถึง variety (w) หมายถึง weak positive

CA, caffeic acid; CS, capsule; Su, Sucrose; Tre, Trehalose; Lac, lactose; Mal, Maltose; Gal, Galactose; Dex, Dextrose; U, urease

ดังนั้น ผลการแยกเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบของ 11 เขต กรุงเทพมหานคร สามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้จาก 3 เขต คือ เขตหนองแขมจำนวน 9 ตัวอย่างจาก 16 ตัวอย่าง เขตลาดพร้าวจำนวน 7 ตัวอย่างจาก 16 ตัวอย่าง เขตคลองเตยจำนวน 2 ตัวอย่างจาก 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 56.25 43.75 และ 13.33 ตามลำดับ และตรวจไม่พบเชื้อ จากตัวอย่างที่ได้จาก เขตพระนคร เขตดุสิต เขตหลักสี่ เขตมีนบุรี เขตราชเทวี เขตจตุจักร เขตปทุมวัน ไม่พบเชื้อ *C. neoformans* (ภาพที่ 9) จากนั้น เลือกเชื้อ *C. neoformans* จากสถานที่ที่พบได้ทั้งหมด 18 ตัวอย่างจากตัวอย่าง 164 ตัวอย่าง จากเขตคลองเตยจำนวน 2 ตัวอย่าง แบ่งเป็น คลองเตยนอก 1 ตัวอย่าง คลองเตยใน 1 ตัวอย่าง เขตลาดพร้าวจำนวน 7 ตัวอย่าง แบ่งเป็น วัดใหม่เสนานิคม 4 ตัวอย่าง วัดลาดพร้าว 3 ตัวอย่าง เขตหนองแขมจำนวน 9 ตัวอย่าง แบ่งเป็น วัดม่วง 3 ตัวอย่าง วัดอุดมรังสี 3 ตัวอย่าง วัดราษฎร์บำรุง 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 9)



ภาพที่ 9 แผนที่เก็บสิ่งขับถ่ายนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร (ด้านซ้าย) และเขตที่พบเชื้อ *C. neoformans* (ด้านขวา)

หมายเหตุ 1=หนองแขม 2=สัมพันธวงศ์ 3=พระนคร 4=ปทุมวัน 5=คลองเตย 6=ราชเทวี 7=ดุสิต 8=ลาดพร้าว 9=จตุจักร 10=หลักสี่ 11=มีนบุรี) และเขตที่พบเชื้อ *C. neoformans* (1=หนองแขม 2 = คลองเตย 3 = ลาดพร้าว)

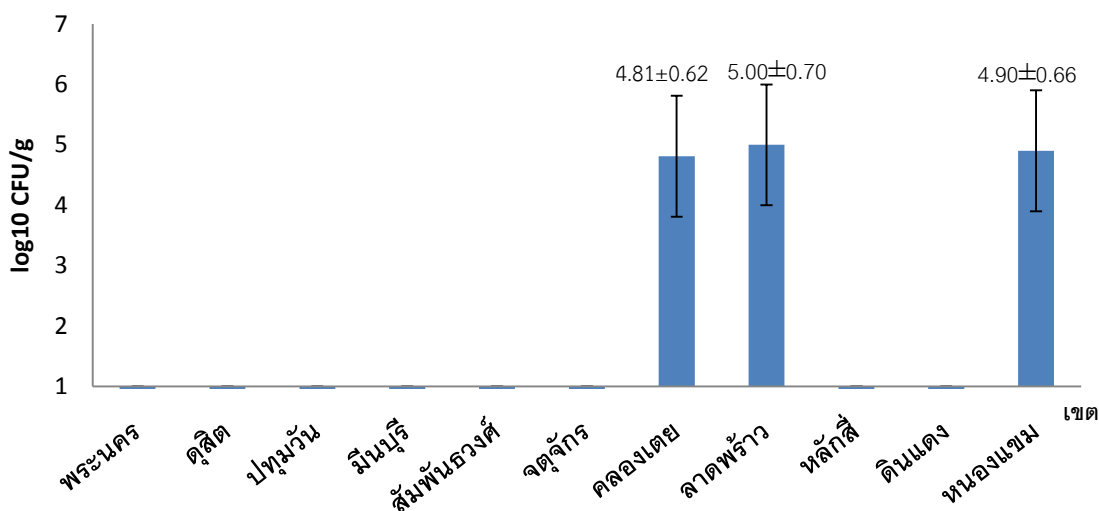
ตารางที่ 9 อุบัติการณ์ของเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบทั้ง 3 เขต กรุงเทพมหานครในช่วงเวลาที่ศึกษา

เขต	สถานที่	จำนวนที่พบ/จำนวนทั้งหมด (%)
หนองแขม		9/16 (56.25%)
	วัดม่วง	3/5 (60%)
	วัดอุดมรังสี	3/6 (50%)
	วัดราษฎร์บำรุง	3/5 (60%)
คลองเตย		2/15 (13.33%)
	คลองเตยนอก	1/5 (20%)
	คลองเตยใน	1/5 (20%)
	อุทยานเบญจสิริ	0/5
ลาดพร้าว		7/16 (43.75%)
	วัดใหม่เสนานิคม	4/5 (80%)
	วัดลาดปลาเค้า	0/6
	วัดลาดพร้าว	3/5 (60%)

ผลการนับจำนวนโคโลนีเชื้อ *C. neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ 18 ตัวอย่าง พบว่า เขตลาดพร้าวมีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อสูงสุด เท่ากับ 2.3×10^5 CFU/g รองลงมา เขตหนองแขม จำนวน 1.69×10^5 CFU/g และเขตสุดท้าย คือ เขตคลองเตย จำนวน 1.14×10^5 CFU/g (ตารางที่ 10) ซึ่งผลการวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานหาค่าการกระจายของเชื้อในแต่ละตัวอย่างของแต่ละเขตพบว่า ทั้ง 3 เขตมีการกระจายของข้อมูลที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยโคโลนีเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ

เขต	สถานที่	รหัสเชื้อ	ค่าเฉลี่ยโคโลนี ($\times 10^5$ CFU/g)
คลองเตย	คลองเตยนอก	CN_P/KT1.01/12	1.15
	คลองเตยใน	CN_P/KT2.01/12	1.30
ลาดพร้าว	วัดใหม่เสนานิคม	CN_P/LP1.11/12	1.62
		CN_P/LP1.21/12	2.44
		CN_P/LP1.31/12	2.10
	วัดลาดปลาเค้า	CN_P/LP1.41/12	2.03
		CN_P/LP2.11/12	2.54
		CN_P/LP2.21/12	2.24
		CN_P/LP2.31/12	1.83
หนองแขม	วัดม่วง	CN_P/NK1.11/12	2.60
		CN_P/NK1.21/12	1.64
		CN_P/NK1.31/12	1.83
	วัดราษฎร์บำรุง	CN_P/NK3.11/12	1.37
		CN_P/NK3.21/12	1.25
		CN_P/NK3.31/13	1.55
	วัดอุดมรังสี	CN_P/NK2.11/12	1.80
		CN_P/NK2.21/12	2.06
		CN_P/NK2.31/12	0.94
		ค่าเฉลี่ยรวม	1.79



ภาพที่ 10 ค่าเฉลี่ยและการกระจายข้อมูลการพบเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบใน 11 เขตกรุงเทพมหานคร

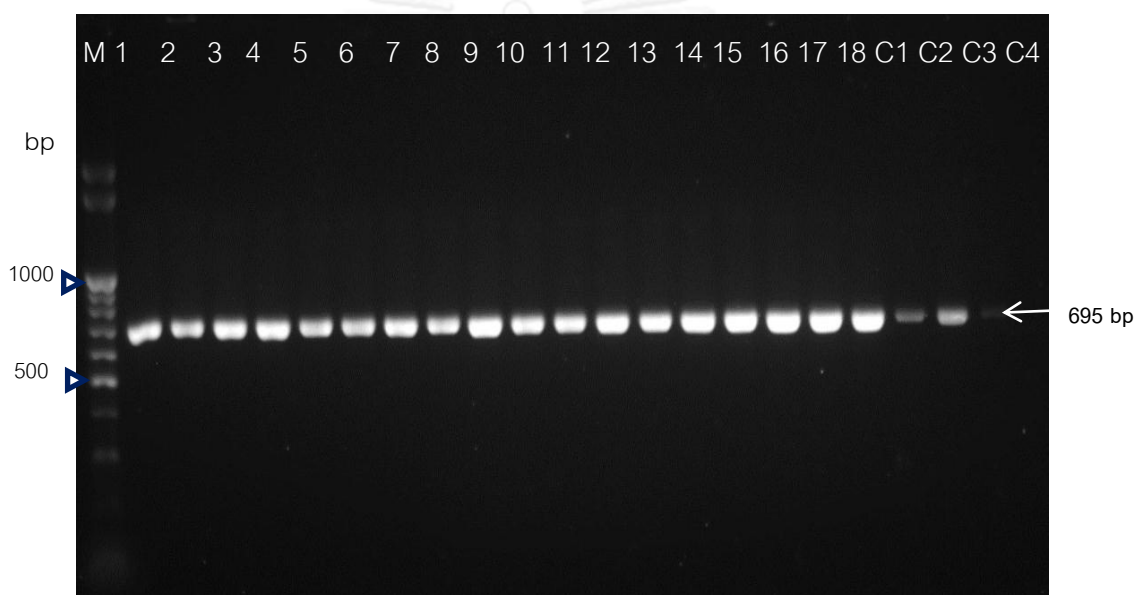
เมื่อนำตัวอย่างที่พบเชื้อ *C. neoformans* จำนวน 18 ตัวอย่าง แยกตามแหล่งชนิดปนเปื้อน และหาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อด้วยวิธี pearson chi-square พบว่า สิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งมีโอกาสพบเชื้อ *C. neoformans* มากกว่าสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.001$) โดยพบเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งร้อยละ 94.44 แบบเปียกร้อยละ 5.55 อีกทั้งปัจจัยของแสงแดดมีผลต่อการพบเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.007$) โดยพบเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบที่สัมผัสแสงแดดร้อยละ 72.22 และใต้สิ่งกำบังร้อยละ 27.77 ขณะที่ปัจจัยด้านการสัมผัสสิ่งขับถ่ายนกพิราบไม่มีผลต่อการพบเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 อัตราการพบเชื้อของแต่ละแหล่งปนเปื้อนและความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อกับแหล่งปนเปื้อน

ชนิดแหล่งปนเปื้อน	จำนวนเชื้อที่พบ/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (%)	P-value
ความชื้นของสิ่งขับถ่ายนกพิราบ		<0.001
- แบบเปียก	1/18 (5.55)	
- แบบแห้ง	17/18 (94.44)	
สัมผัสแสงแดด		0.007
- แสงแดดโดยตรง	13/18 (72.22)	
- ใต้สิ่งกำบัง	5/18 (27.77)	
ลักษณะพื้นที่สัมผัส		0.504
- คอนกรีตหรือปูน	10/18 (55.56)	
- พื้นหญ้าหรือดิน	8/18 (44.44)	

4.1.2 การระบุแยกเชื้อ *C. neoformans*

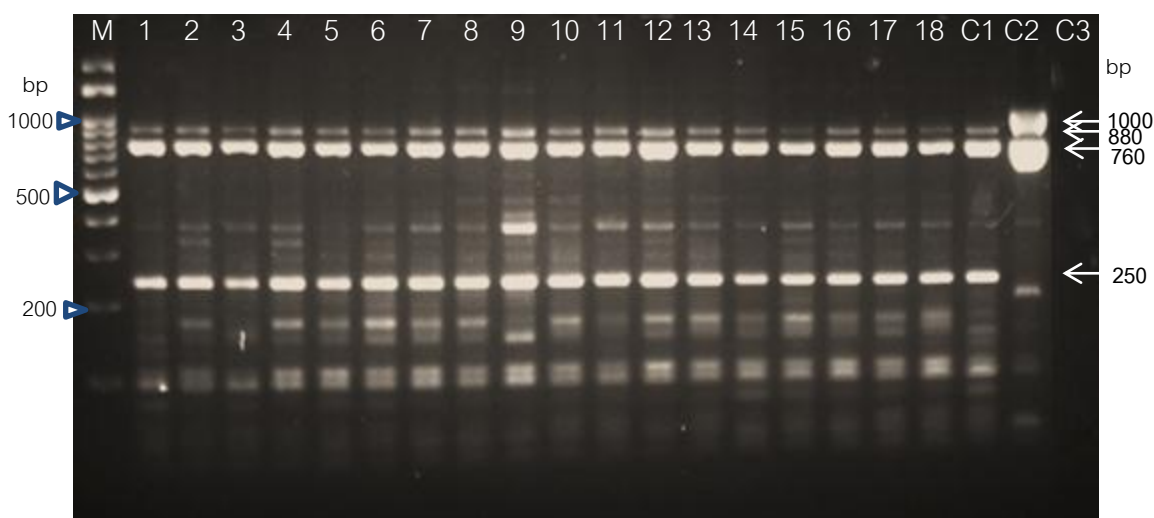
ผลจากการทำ multiplex PCR (Aoki et al., 1999; Leal et al., 2008; Mseddi et al., 2011) เพื่อแยกเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* พบว่า ตัวอย่างทั้ง 18 ตัวอย่าง คือ เชื้อ *C. neoformans* จากการปรากฏ PCR product ขนาด 695 คู่เบสตรงกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* var. *grubii*, WM148, serotype A, *C. neoformans* var. *neoformans*, WM629, serotype D, WM628 *C. neoformans* var. *grubii*/ var. *neoformans* hybrid, serotype AD (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การระบุแยกสปีชีส์เชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบทั้ง 18 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiplex PCR

- | | |
|-----------|--|
| ช่อง M | คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอขนาด 3000 คู่เบส |
| ช่อง 1-18 | คือ เชื้อ <i>Cryptococcus</i> spp. จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ |
| ช่อง C1 | คือ เชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> , WM148, serotype A |
| ช่อง C2 | คือ เชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> , WM629, serotype D |
| ช่อง C3 | คือ เชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> / var. <i>neoformans</i> hybrid, WM628, serotype AD |
| ช่อง C4 | คือ น้ำ Nuclease free water (กลุ่มควบคุมลบ) |

ผลการตรวจแยกซีโรไทป์ จากเชื้อ *C. neoformans* ของตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมูลนกพิราบทั้งหมด 18 ตัวอย่าง คือ ซีโรไทป์ A ซึ่งแสดง PCR product ขนาด 880 760 และ 250 คู่เบสตรงกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* var. *grubii*, WM148, serotype A และไม่ตรงกับเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* var. *neoformans*, WM629, serotype D ที่แสดงผลผลิต PCR ขนาด 1000 กับ 760 คู่เบส (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การระบุแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบทั้ง 18 ตัวอย่างด้วยวิธี multiplex PCR

- | | |
|-----------|--|
| ช่อง M | คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอขนาด 3000 คู่เบส |
| ช่อง 1-18 | คือ เชื้อ <i>C. neoformans</i> จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ |
| ช่อง C1 | คือ เชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> , WM148, serotype A |
| ช่อง C2 | คือ เชื้ออ้างอิง <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> , WM629, serotype D |
| ช่อง C3 | คือ น้ำ Nuclease free water (กลุ่มควบคุมลบ) |

4.2. ผลการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต (ผลิตภัณฑ์ A) กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ผลิตภัณฑ์ B) และกลุ่มควอเทอริแอมโมเนียม (ผลิตภัณฑ์ C) ต่อการฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนอยู่ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ในแง่ของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสที่เหมาะสม

ผลการทดสอบควบคุมคุณภาพเพื่อความมั่นใจผลการทดลอง เริ่มต้นตั้งแต่ยืนยันจำนวนเชื้อสำหรับทดสอบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสง 0.1 (Chong et al., 2010) มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1×10^6 ถึง 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีนับเช็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-4} ตามมาตรฐาน ISO 7218:1996 ในระหว่างการทดสอบควบคุมคุณภาพ โดยทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาปรับสภาพความเป็นกลางหรือสารยับยั้งปฏิกิริยาของน้ำยาฆ่าเชื้อ (D/E neutralizer) ต่อการเจริญของเชื้อและความสามารถหยุดปฏิกิริยาน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด นั้น สาร D/E neutralizer ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* ซึ่งเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และสาร D/E neutralizer สามารถหยุดปฏิกิริยาของน้ำยาฆ่าเชื้อได้เมื่อทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดต่อการทำลายเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* ซีโรไทป์ A เบื้องต้นนั้น พบว่า ช่วงระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสเชื้อที่กำหนดไว้นั้น น้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถหาจุดยุติที่เหมาะสมสำหรับการทำลายเชื้อได้ (ตารางที่ 12) ดังนั้นจึงได้ปรับเปลี่ยนเพิ่มและลดระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสเชื้อจากจุดยุติ เพื่อคัดเลือกช่วงระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อการฆ่าเชื้อ *C. neoformans* (ตารางที่ 13) ผลการประเมินด้วยการนับจำนวนเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่างมีแนวโน้มจำนวนเชื้อที่ลดลงใกล้เคียงกันจากการทำลายด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ 3 ชนิด โดยในสภาวะเชื้อบริสุทธิ์ ประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A สามารถทำลายเชื้อที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ภายในระยะเวลา 1 นาทีหรือ ร้อยละ 0.5 ภายในระยะเวลา 3 นาที ในขณะที่ การฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบต้องใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2 ภายในระยะเวลา 1 นาที และที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 10 นาที (ภาพที่ 13) ส่วนประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B สามารถทำลายเชื้อ *C. neoformans* ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ภายในระยะเวลา 3 นาที หรือ ร้อยละ 0.33 ภายในระยะเวลา 10 นาที ในสภาวะเชื้อปนสิ่งขับถ่ายนกพิราบ น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B ทำลายเชื้อที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ภายในระยะเวลา 1 นาที หรือ ร้อยละ 0.5 ภายในระยะเวลา 5 นาที (ภาพที่ 14) และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C สามารถทำลายเชื้อที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.031 ภายในระยะเวลา 1 นาที ขณะที่ การฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบต้องใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.062 ภายในระยะเวลา 30 นาที (ภาพที่ 15)


ตารางที่ 12 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด

น้ำยาฆ่าเชื้อ/ เข้มข้น (%)	อัตราการรอดชีวิตในระยะเวลาที่ (นาที)															
	<i>C. neoformans</i> บริสุทธิ์								<i>C. neoformans</i> ในสิ่งขับถ่าย นกพิราบ							
	10S	30S	1	3	5	10	15	30	10S	30S	1	3	5	10	15	30
ผลิตภัณฑ์ A																
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
0.5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
0.33	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
ผลิตภัณฑ์ B																
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
0.5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
0.33	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
ผลิตภัณฑ์ C																
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
0.03	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

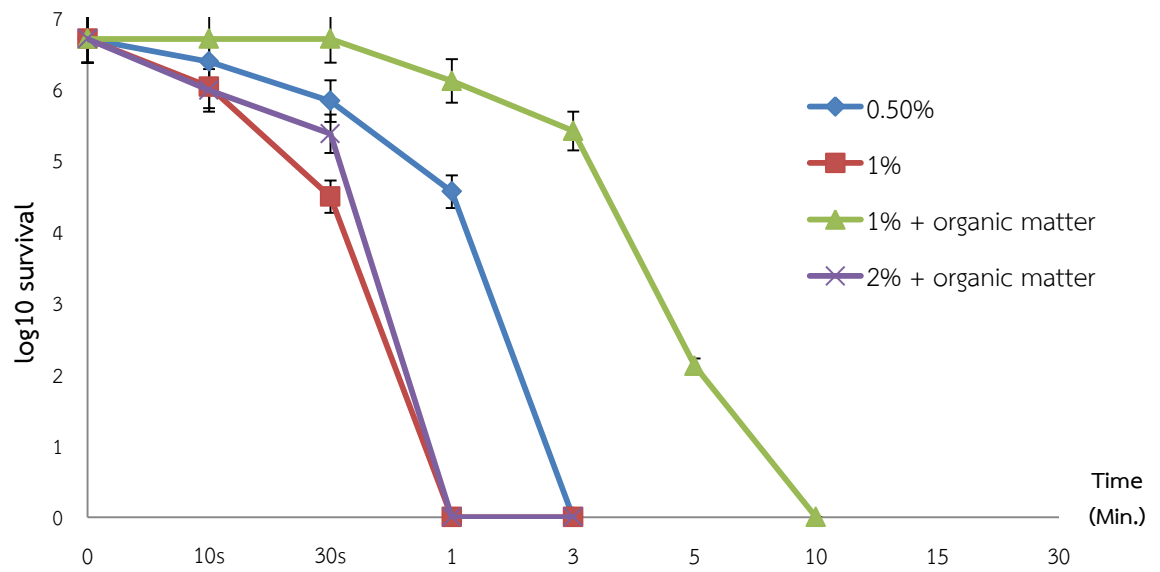
หมายเหตุ (+) หมายถึง มีชีวิต, (-) หมายถึง ตาย

ตารางที่ 13 แสดงผลการคัดเลือกช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด

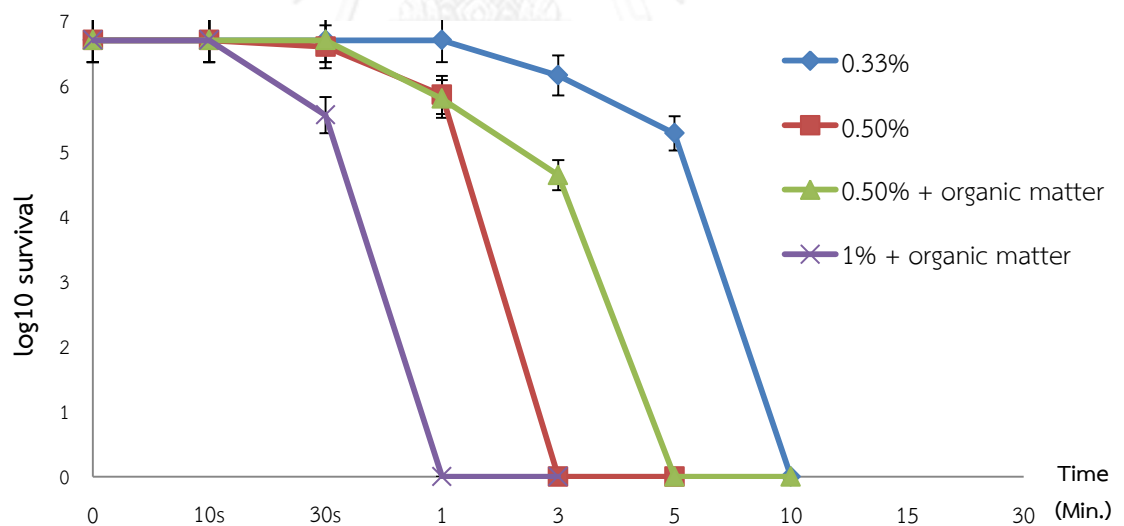
น้ำยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น (%)	ระยะเวลาสัมผัสเชื้อในระยะเวลาที่ (นาที)													
		<i>C. neoformans</i> บริสุทธิ์						<i>C. neoformans</i> ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ							
		10s	30s	1	3	5	10	10s	30s	1	3	5	10	15	30
ผลิตภัณฑ์ A	2%							/	/	/					
	1%		/	/	/					/	/	/			
	0.5%			/	/	/									
ผลิตภัณฑ์ B	1%							/	/	/					
	0.5%			/	/	/			/	/	/				
	0.33%				/	/	/								
ผลิตภัณฑ์ C	0.062%											/	/	/	
	0.031%	/	/	/											

หมายเหตุ  หมายถึง จุดยุติการทดสอบ

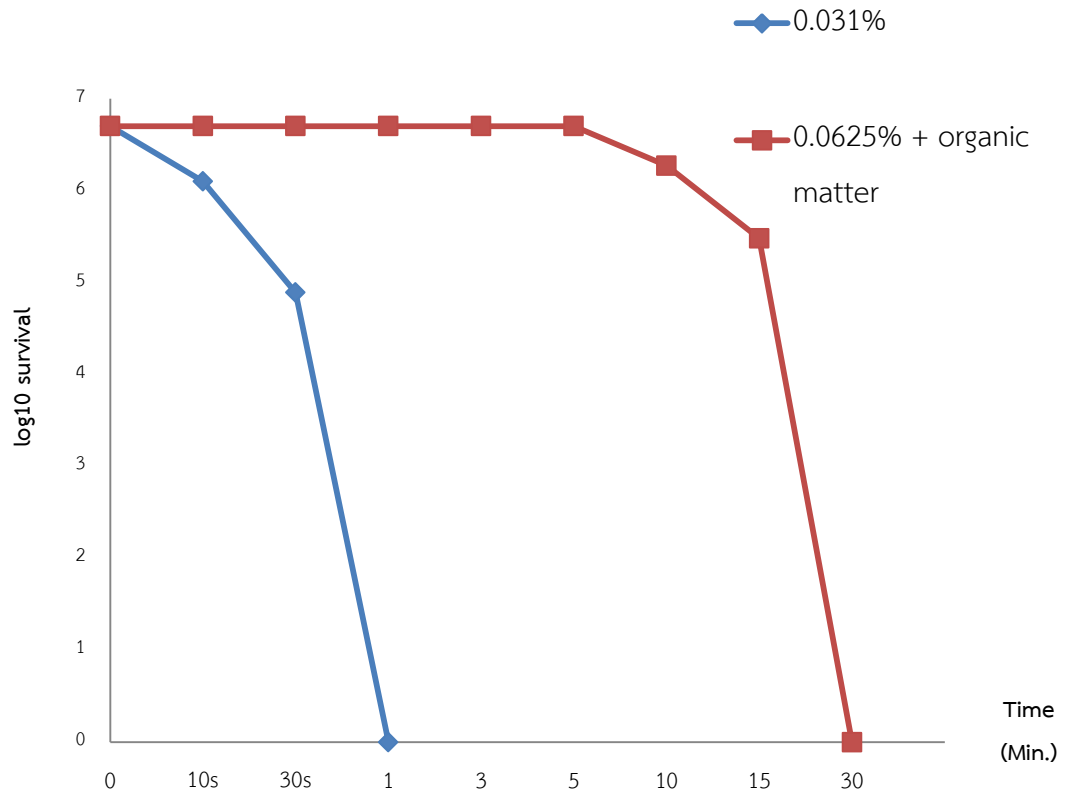
(/) หมายถึง ช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาที่คัดเลือก



ภาพที่ 13 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด



ภาพที่ 14 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด



ภาพที่ 15 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A ภายหลังจากสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่กำหนด

บทที่ 5

อริปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans*

การแยกเชื้อ *C. neoformans* ทางห้องปฏิบัติการ โดยทั่วไปนิยมเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เป็นอาหารสำหรับเพาะเชื้อยีสต์ มีน้ำตาลเด็กโทรสปริมาณมาก ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.6 ทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ caffeic acid agar จัดอยู่ประเภทอาหารคัดเลือกจำเพาะที่เลือกใช้ สำหรับแยกเชื้อ *Cryptococcus* spp. ออกจากเชื้อ *Candida* spp. ด้วยความแตกต่างลักษณะโคโลนี เชื้อ *C. neoformans* มีลักษณะโคโลนีสีน้ำตาล ผิวหน้าเยิ้ม แตกต่างจากโคโลนีของเชื้อ *Candida albican* มีลักษณะโคโลนีสีขาว (Hopper and Blank, 1976) นอกจากนี้การเพาะเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน มูลนก เศษใบไม้ หรือ ตัวอย่างจากผู้ป่วย จำเป็นต้องเพิ่มยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น คลอแรมเฟนิคอล เพนิซิลลิน สเตอริโตมัยซิน เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือ สารไปฟีนอล เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรากลุ่ม saprophyte รวมทั้ง ปัจจัยอุณหภูมิสำหรับการเพาะเชื้อ *C. neoformans* มีความสำคัญอย่างหนึ่ง เพราะ เชื้อ *C. neoformans* เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส แต่ด้วยคุณสมบัติที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้การเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรากลุ่ม saprophyte ได้ (Ma and May, 2009)

การแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร พบเชื้อ *C. neoformans* น้อยกว่าการรายงานก่อนหน้านี้นี้ที่พบเชื้อ *C. neoformans* ในกรุงเทพมหานครร้อยละ 43.33 (Kuroki et al., 2004) เนื่องจาก สถานที่ที่ศึกษามีพื้นที่ในการสำรวจที่กว้าง ชนิดของสถานที่ที่มีความหลากหลาย และปัจจัยที่มีผลต่อการคงอยู่ของเชื้อในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ เช่น สารอาหาร อุณหภูมิและความชื้นของสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ซึ่งจากการศึกษานี้พบเชื้อ *C. neoformans* ทั้งหมด 3 เขต คือ เขตหนองแขม เขตลาดพร้าว และเขตคลองเตย ที่ซึ่งมีอุบัติการณ์ที่แตกต่างกันและสถานที่ที่พบเชื้อมากที่สุด คือ วัด ขณะที่ไม่พบบริเวณสวนสาธารณะ อาจเนื่องมาจาก พื้นที่นั้นอาจมีการคงอยู่ของเชื้อในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ อีกทั้ง เป็นพื้นที่ที่มีปริมาณมูลนกทับถมจำนวนมาก ซึ่งปริมาณของสิ่งขับถ่ายอาจเป็นแหล่งของสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ หรือเป็นที่ปกป้องเชื้อจากสิ่งแวดล้อมภายนอก นอกจากนี้ ผุ้รงนกที่อาศัยในพื้นที่อาจมีการติดเชื้อ *C. neoformans* ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อในพื้นที่นั้น จากการวิจัยครั้งนี้พบปริมาณเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบเฉลี่ย 1.79×10^5 CFU/ml ซึ่งน้อยกว่าการรายงานก่อนหน้านี้นี้ถึง 10 เท่า (Ruiz 1981) อาจเป็นเพราะสิ่งแวดล้อมแต่ละพื้นที่ รวมทั้งแหล่งอาหารของนกมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้องค์ประกอบของสารอาหารในมูลนก (Hubalek, 1975) และปริมาณจำนวนแบคทีเรียหรืออะมีบาที่ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกแตกต่างกัน ทำให้ปริมาณการพบเชื้อ *C. neoformans* ในมูลนกมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ (Ruiz et al., 1981; Kuroki et al., 2004)

การศึกษานี้พบเชื้อ *C. neoformans* ในมูลนกพิราบแบบแห้งมากกว่ามูลนกพิราบแบบเปียก และสามารถพบเชื้อได้ทั้งภายในและภายนอกอาคาร เนื่องมาจาก จำนวนแบคทีเรีย อะมีบาที่ซึ่งแย่งสารอาหารการเจริญเติบโตของเชื้อในสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งมีปริมาณน้อยกว่าแบบเปียก อีกทั้งส่วนประกอบของสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบเปียกมีองค์ประกอบกรดยูริกและค่าความเป็นกรด-ด่างสูง โดยจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. neoformans* ได้ ซึ่งแตกต่างจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งที่มีความกรด-ด่าง 6.4 ถึง 7.2 และสารครีตินินที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ (Zarrin et al., 2010) นอกจากนี้ การสืบพันธุ์ของเชื้อในสิ่งแวดล้อมมีการสืบพันธุ์อาศัยเพศผลิตสปอร์จำนวนมาก โดยสปอร์มีคงทนต่อแสงแดดและอาศัยอยู่ในภาวะไม่เหมาะสมได้อย่างยาวนานถึง 2 ปี จึงเป็นสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งพบเชื้อมากกว่า (Granados and Castaneda, 2005; Wu et al., 2012) ดังนั้น การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อ โดยเฉพาะสิ่งขับถ่ายนกพิราบแบบแห้งที่สามารถพบได้ทุกพื้นที่ทั้งในอาคารหรือนอกอาคาร ควรหาแนวทางการป้องกันลดการแพร่กระจายของเชื้อ

การแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น โดยทั่วโลกรายงานพบเชื้อ *C. neoformans* ร้อยละ 88.6 และร้อยละ 10 ในประเทศไทย (Cogliati, 2013) สำหรับการแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในประเทศไทย มีการรายงานตั้งแต่ปี 1989 ในกรุงเทพมหานครพบร้อยละ 43.33 ปี 2004 ในจังหวัดเชียงใหม่พบร้อยละ 16.4 ปี 2011 ในจังหวัดอุบลราชธานีพบร้อยละ 54.05 ปี 2013 ในจังหวัดชลบุรีพบร้อยละ 10 และจากการวิจัยพบเชื้อ *C. neoformans* ร้อยละ 10.98 ในกรุงเทพมหานคร ดังนั้น การแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบในประเทศไทยมีแนวโน้มการรายงานอย่างต่อเนื่อง ด้วยจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยทางกายภาพมีผลต่อการคงอยู่และเจริญเติบโตในสิ่งขับถ่ายนกพิราบหรือสิ่งแวดล้อม อีกทั้งอาจเนื่องมาจาก ปริมาณนกพิราบที่ติดเชื้อ *C. neoformans* เพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื้อมีการแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น (Haag-Wackernagel and Moch, 2004)

การระบุแยกชนิดเชื้อ *C. neoformans* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แบบ multiplex สามารถแยกแยะระหว่างเชื้อ *C. neoformans* กับ *C. gattii* ได้แม่นยำ (Leal et al., 2008) เหมาะกับการนำมาใช้ตรวจแยกเชื้อ *C. neoformans* ในห้องปฏิบัติการ อีกทั้ง การใช้ multiplex PCR ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *laccase* เพื่อแยกซีโรไทป์ A, B, C, D และ AD ของเชื้อออกนั้น จากผลการวิจัย การปรากฏ PCR product ของเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ แมว ผู้ป่วย และนกแก้วเลี้ยง ปรากฏ PCR product เหมือนกับตัวอย่างเชื้ออ้างอิง เหมือนกับการรายงานของ Ito-Kuwa และคณะ ปี 2007 อธิบายว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *laccase* สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของซีโรไทป์เชื้อ *C. neoformans* ได้ และเหมาะสำหรับนำไปใช้ในการระบุแยกเชื้อและซีโรไทป์จากตัวอย่างเชื้อทางคลินิกและตัวอย่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน มูลนก (Ito-Kuwa et al., 2007) ปัจจุบันการระบุแยกเชื้อและซีโรไทป์ของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลมีหลากหลายเทคนิค เช่น CAP59 gene restriction enzyme analysis (Enache-Angoulvant et al., 2007) nested PCR (Chae et al., 2012) restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Meyer et al., 2003; Kidd et al., 2004) amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Hagen et al., 2010) และ multilocus sequence

typing (MLST) (Chowdhary et al., 2012) การเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ต้องการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบในกรุงเทพมหานคร เป็นซีโรไทป์ A ทั้งหมด ซึ่งซีโรไทป์ A มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการก่อโรค cryptococcosis ที่พบทั้งในคนและสัตว์ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยติดเชื้อ HIV จากการศึกษานักป่วยติดเชื้อ HIV ในประเทศไทยมีอัตราการเกิดโรค cryptococcosis เพิ่มขึ้น โดยเกิดจากสาเหตุการติดเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A เป็นหลัก (Kaocharoen et al., 2013) นอกจากนี้ ซีโรไทป์ A เป็นสาเหตุที่สำคัญก่อโรคในสัตว์ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การระบาดของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A มีความเชื่อมโยงกันระหว่างนกพิราบ สัตว์ และผู้ป่วย ซึ่งในปัจจุบันนกพิราบอพยพมาหาอาหารและสร้างรังอาศัยในเขตเมืองเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความใกล้ชิดระหว่างมนุษย์กับนกพิราบจากการให้อาหารตามแหล่งสาธารณะหรือการสร้างรังของนกตามบริเวณอาคาร (Haag-Wackernagel and Moch, 2004) ส่งผลให้มีปริมาณมูลนกสะสมตามสิ่งแวดล้อมต่างๆจำนวนมาก ทำให้เชื้อเจริญเติบโตและสปอร์ของเชื้อแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม เป็นผลให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อในผู้ป่วยหรือสัตว์ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องมากขึ้น (Soltani et al., 2013)

5.2 ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อต่อการฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ในงานวิจัยนี้เป็นขั้นตอนทดสอบประสิทธิภาพที่จำลองห้องปฏิบัติการให้มีลักษณะคล้ายกับสภาวะสิ่งแวดล้อม การใช้ปริมาณเชื้อ *C. neoformans* เริ่มต้น เท่ากับ 1×10^6 CFU/ml นั้น เนื่องจาก ผลการวิจัยนี้แยกเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ได้เท่ากับ 1.79×10^5 CFU/ml อีกทั้ง เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐาน EU 1656:2002 ที่กำหนดใช้ปริมาณเชื้อยีสต์ 1×10^6 CFU/ml จากพบเชื้อในการศึกษานี้เป็นเชื้อในซีโรไทป์ A ทั้งหมด ดังนั้นวิธีการเลือกตัวอย่างเชื้อจากสิ่งขับถ่ายนกพิราบนั้นจึงเลือกจากความแตกต่างของสถานที่ที่พบ และชนิดของโฮสต์ ได้แก่ เชื้อจากผู้ป่วย แมว และนกแก้วเลี้ยง ระดับความเข้มข้นและช่วงระยะเวลาสัมผัสของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดต่อเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งขับถ่ายนกพิราบ แมว ผู้ป่วย นกแก้วเลี้ยง ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันแสดงให้เห็นด้วยว่าความแข็งแรงของเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับที่มาของเชื้อ และเชื้อ *C. neoformans* ที่พบในสิ่งแวดล้อมอาจเป็นโคลนพันธุ์กรรมเดียวกับเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ และคน (Kaocharoen et al., 2013) ปัจจัยที่สำคัญต่อความทนทานต่อสารฆ่าเชื้อและการมีชีวิต คือ ความหนาของผนังแคปซูลของเซลล์ ซึ่งจากการสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและวัดความหนายืนยันได้ว่าเชื้อที่ทำการศึกษามีความหนาของผนังแคปซูลที่ไม่แตกต่างกัน

สารอินทรีย์ เช่น ดิน มูลสัตว์ เลือด เป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อ ส่งผลให้น้ำยาฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง เนื่องจาก องค์ประกอบในสารอินทรีย์ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ น้ำยาฆ่าเชื้อเข้าไปทำลายเชื้อและลดการออกฤทธิ์ของน้ำยาฆ่าเชื้อได้ (Dvorak, 2008) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า จะต้องใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงหรือระยะเวลาสัมผัสเชื้อเพิ่มมากขึ้นในภาวะที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ (Stringfellow et al., 2009) แต่ การศึกษา

ดังกล่าว เป็นผลของการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทั่วไป รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่สามารถแสดงค่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารฆ่าเชื้อต่อเชื้อ *C. neoformans* ในภาวะปนเปื้อนสารอินทรีย์ ซึ่งนำไปปรับใช้ได้จริงในการลดการปนเปื้อนในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด เนื่องจากคุณสมบัติของสารอินทรีย์แต่ละชนิดอาจทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อแตกต่างกันได้ การวิจัยนี้จึงเลือกใช้สิ่งขับถ่ายนกพิราบปราศจากเชื้อเป็นสารอินทรีย์ในการทดสอบซึ่งเท่ากับเป็นการจำลองเป้าหมายของการทำลายเชื้อในสภาพจริง ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต รวมทั้ง กรดยูริก ที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์และลดประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม การทดสอบนี้เป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบสภาวะแบบเปียก เมื่อนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมที่อยู่ในสภาวะแบบแห้งนั้น อาจทำให้ผลการทดลองไม่เหมือนกัน ดังนั้น การทดสอบนี้เพื่อให้ได้ผลระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใกล้เคียงและเหมาะสมกับการนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมได้

น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A ทำลายเชื้อ *C. neoformans* บริสุทธิ์ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.50 ระยะเวลา 3 นาที และ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 1 นาที ซึ่งช่วงระดับความเข้มข้นและระยะเวลาดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์แนะนำสำหรับใช้ฆ่าเชื้อราและยีสต์ รวมทั้ง ผลดังกล่าวใกล้เคียงกับการศึกษากับเชื้อ *C. albicans* ก่อนนี้ (Kramontong et al., 2010) ในภาวะเชื้อปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบ น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A ที่ 0.5% ไม่สามารถทำลายเชื้อในระยะเวลาที่ศึกษาได้ แต่จะต้องเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น 2 เท่า และระยะเวลามากขึ้น 10 เท่า ด้วยคุณสมบัติของน้ำยาฆ่าเชื้อ Virusnip[®] ที่มีส่วนผสมของ potassium monopersulphate (PMP) และ sodium dichloroisocyanurate (SDIC) ทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดซ์และสารอินทรีย์คัตหลังคลอรีนตามลำดับ ซึ่งมีการออกฤทธิ์คล้ายกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B โดยจะหลังคลอรีนทำลายต่อเชื้อ แต่เมื่ออยู่ในภาวะปนเปื้อนสารอินทรีย์ คลอรีนมีความไวต่อสารอินทรีย์ (McDonnell and Russell, 1999) ทำให้ประสิทธิภาพทำลายเชื้อต่ำลง

น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B มีส่วนผสมของสาร sodium hypochlorite จากการวิจัยนี้ น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B ทำลายเชื้อ *C. neoformans* ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.33 เวลา 10 นาที และ ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 เวลา 3 นาที ช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาดังกล่าวนี้มีใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ และแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อได้จริง ในขณะที่การลดการปนเปื้อนที่อยู่ในสิ่งขับถ่ายของนกพิราบต้องใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มากขึ้นเช่นเดียวกัน

น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C จัดอยู่ในกลุ่มควอเทอনারีแอมโมเนียม มีส่วนผสมของ isopropyl alcohol, tridecl ceteth alcohol และ benzalkonium chloride ซึ่งคุณสมบัติที่ระบุในเอกสารการค้าของผลิตภัณฑ์สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อมีสารอินทรีย์ปนเปื้อน (Conte et al., 2007) ซึ่งจากการวิจัยนี้ น้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C ทำลายเชื้อ *C. neoformans* ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.031 เวลา 1 นาที และในภาวะปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบทำลายเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 0.0625 เวลา 30 นาที ซึ่งช่วงระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าระดับความเข้มข้นของผู้ผลิตน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C ที่กำหนดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 2.5 ยังสามารถฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ได้

น้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาด แต่ละชนิดมีความเป็นพิษ และออกฤทธิ์ทำลายเชื้อที่แตกต่าง ซึ่งการเลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อทำลายเชื้อ *C. neoformans* ในสิ่งแวดล้อม ควรคำนึงถึงระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้เหมาะสม ราคา ความเป็นพิษต่อผู้ใช้ และผลสารเคมีที่ตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายนกพิราบ ผลิตภัณฑ์ C มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อที่ดีที่สุดและมีราคาต่อหน่วยการใช้ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ส่วนในแง่ ผลความเป็นพิษต่อผู้ปฏิบัติงาน น้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด ไม่ทำให้ระคายเคืองต่อผิวหนังและไม่อันตรายต่อเยื่อเมือกระบบทางเดินหายใจ เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นตามคำแนะนำของผู้ผลิตน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด (CDC,2008)

5.3 สรุปผลการวิจัย

พบการแพร่กระจายของเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบร้อยละ 10.97 ในกรุงเทพมหานคร ในเขตหนองแขม เขตคลองเตย เขตลาดพร้าว และมีโอกาสพบเชื้อในสิ่งขับถ่ายชนิดต่างๆ ในทุกสถานที่ที่สำรวจ สามารถแนะนำระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสของน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *C. neoformans* ที่ปนเปื้อนในสิ่งขับถ่ายนกพิราบในสิ่งขับถ่ายนกพิราบอย่างเป็นรูปธรรมได้

รายการอ้างอิง

- ดำรงเดช ปิยะบงการ. 2547. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกพิราบในเขตกรุงเทพมหานคร. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธัญยาการย์ ศรีวรรมาศ. 2554. การตรวจหาเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกภายในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 13(4): 21.
- สุดา ชันติยา. 2546. การวิเคราะห์รูปแบบ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Ajello L. 1958. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. Am J Hyg. 67(1): 72-77.
- Alteras I, Feuerman E, Bashan D, Lehrer N and Bercovitch A. 1976. New isolation of *Cryptococcus neoformans* (*Sanfelice*) Vuillemin from soil in Israel. Mykosen. 19(6): 189-192.
- Aoki FH, Imai T, Tanaka R, Mikami Y, Taguchi H, Nishimura NF, Nishimura K, Miyaji M, Schreiber AZ and Branchini ML. 1999. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. J Clin Microbiol. 37(2): 315-320.
- Barnett JA. 2010. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. Yeast. 27(11): 875-904.
- Benham RW. 1950. Cryptococcosis and blastomycosis. Ann N Y Acad Sci. 50(10): 1299-1314.
- Bohm KH, Weiland E, Abdallah IS and Sasu M. 1970. The behavior of *Cryptococcus neoformans* in soil. I. Occurrence in soil, survival in seasand, efficiency comparison of different demonstration methods. Mycopathol Mycol Appl. 42(1): 57-63.
- Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G and Doering TL. 2003. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2(4): 655-663.
- Cafarchia C, Romito D, Iatta R, Camarda A, Montagna MT and Otranto D. 2006. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. Med Mycol. 44(6): 485-492.
- Casadevall A, Rosas AL and Nosanchuk JD. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol. 3(4): 354-358.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. [Online] Available from : http://www.cdc.gov/hicpac/disinfection_sterilization/6_0disinfection.html [2014, Jan 30]

- Chae HS, Jang GE, Kim NH, Son HR, Lee JH, Kim SH, Park GN, Jo HJ, Kim JT and Chang KS. 2012. Classification of *Cryptococcus neoformans* and yeast-like fungus isolates from pigeon droppings by colony phenotyping and ITS genotyping and their seasonal variations in Korea. *Avian Dis.* 56(1): 58-64.
- Chayakulkeeree M and Perfect JR. 2006. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 20(3): 507-544.
- Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK and Kwon-Chung KJ. 2008. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg Infect Dis.* 14(5): 755-762.
- Chen LC, Blank ES and Casadevall A. 1996. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3(5): 570-574.
- Chen SC, Muller M, Zhou JZ, Wright LC and Sorrell TC. 1997. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. *J Infect Dis.* 175(2): 414-420.
- Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S and Carter D. 2010. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol.* 48(11): 4115-4120.
- Chowdhary A, Rhandhawa HS, Prakash A and Meis JF. 2012. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. *Crit Rev Microbiol.* 38(1): 1-16.
- Cogliati M. 2013. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013: 675213.
- Conte M, Bagattini M, Trotra AM and Triassi M. 2007. Assessment of the efficacy of Umonium38 on multidrug-resistant nosocomial pathogens. *J Prev Med Hyg.* 48(2): 50-53.
- Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ and Rocha MF. 2010. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia.* 169(3): 207-213.
- De Jesus M, Nicola AM, Rodrigues ML, Janbon G and Casadevall A. 2009. Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryot Cell.* 8(1): 96-103.
- Denning DW, Armstrong RW, Lewis BH and Stevens DA. 1991. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 91(3): 267-272.

- Denning DW, Stevens DA and Hamilton JR. 1990. Comparison of *Guizotia abyssinica* seed extract (birdseed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol.* 28(11): 2565-2567.
- Dvorak K. 2008. t 101. The center for food security and public health, Iowa state university.[Online]Availablefrom:
<http://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfectant101.pdf>. [2014, Jan 2]
- Duncan C, Stephen C, Lester S and Bartlett KH. 2005. Sub-clinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis. *Med Mycol.* 43(6): 511-516.
- Duston M, McHenry MC, Braun WF, Fieker DH, Gavan TL and Novick AC. 1981. Cryptococcal meningitis causing fever of unknown origin in renal transplant recipients: report of two cases initially diagnosed by urine cultures. *Transplantation.* 32(4): 334-336.
- Ellerbroek PM, Walenkamp AM, Hoepelman AI and Coenjaerts FE. 2004. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Curr Med Chem.* 11(2): 253-266.
- Ellis DH and Pfeiffer TJ. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* 28(7): 1642-1644.
- Emmons CW. 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol.* 62(6): 685-690.
- Emmons CW. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg.* 62(3): 227-232.
- [EN 1656:2000] European standard. 2002. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants used in veterinary field-test method and requirement.
- Enache-Angoulvant A, Chandener J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, Poirot JL and Hennequin C. 2007. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J Clin Microbiol.* 45(4): 1261-1265.
- Engley FB and Dey BP. 1970. A universal neutralizing medium for antimicrobial chemical. In proceedings of the 56th Mid-year meeting of the chemical specialties manufactures association. 100-106.
- Feldmesser M, Kress Y and Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology.* 147(Pt 8): 2355-2365.

- Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P and Casadevall A. 2000. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun.* 68(7): 4225-4237.
- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F and Wright L. 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect.* 8(4): 1006-1015.
- Garcia-Rivera J, Eisenman HC, Nosanchuk JD, Aisen P, Zaragoza O, Moadel T, Dadachova E and Casadevall A. 2005. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. *Fungal Genet Biol.* 42(12): 989-998.
- Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 13(1): 122-143, table of contents.
- Granados DP and Castaneda E. 2005. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogota, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol.* 49(2): 282-290.
- Gugnani HC, Gupta NP and Shrivastav JB. 1972. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in Delhi Zoological Park and its recovery from the sputum of an employee. *Indian J Med Res.* 60(2): 182-185.
- Haag-Wackernagel D and Moch H. 2004. Health hazards posed by feral pigeons. *J Infect.* 48(4): 307-313.
- Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, Boekhout T and Meis JF. 2010. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(12): 5139-5145.
- Hedayati MT, Mayahi S, Fakhar M, Shokohi T and Majidi M. 2011. *Cryptococcus neoformans* isolation from swallow (*Hirundo rustica*) excreta in Iran. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 53(3): 125-127.
- Hopfer RL and Blank F. 1976. Caffeic acid-containing medium for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 2(2): 115-120.
- Hubalek Z. 1975. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a pigeon habitat. *Folia Parasitol (Praha).* 22(1): 73-79.
- Hull CM and Heitman J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet.* 36: 557-615.

- Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA and Heitman J. 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol.* 3(10): 753-764.
- Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y and Kaufman L. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 16(1): 22-29.
- Irokanulo EA, Akueshi CO and Makinde AA. 1994. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes A and D using creatinine dextrose bromothymol blue thymine medium. *Br J Biomed Sci.* 51(2): 100-103.
- Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S and Vidotto V. 2007. Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses.* 50(4): 277-281.
- [ISO 7218:1996] International Organization for standardization. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs-general rules for microbiological examinations 2nd Ed. 2-15.
- Jacobson ES. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 13(4): 708-717.
- Jang YH, Lee SJ, Lee JH, Chae HS, Kim SH and Choe NH. 2011. Prevalence of yeast-like fungi and evaluation of several virulence factors from feral pigeons in Seoul, Korea. *Lett Appl Microbiol.* 52(4): 367-371.
- Katiyar R, Deorukhkar SC and Saini S. 2011. Comparison of different media for the pigment production of *C. neoformans*. *J Clin Diagn Res.* 5(6): 1187-1189.
- Kaocharoen S, Ngamskulrungraj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, Banlunara W, Poonwan N, Chaiprasert A, Meyer W and Chindamporn A. 2013. Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(7): 2297.
- Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E and Chandy R. 2004a. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Clin Microbiol Infect.* 10(6): 590-592.
- Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E and Chandy R. 2004b. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 42(10): 4796-4798.
- Khan ZU, Pal M, Randhawa HS and Sandhu RS. 1978. Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons. *J Med Microbiol.* 11(2): 215-218.
- Kidd SE, Bach PJ, Hingston AO, Mak S, Chow Y, MacDougall L, Kronstad JW and Bartlett KH. 2007a. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis.* 13(1): 51-57.

- Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW and Bartlett KH. 2007b. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 73(5): 1433-1443.
- Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ and Meyer W. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(49): 17258-17263.
- Kozel TR. 1995. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 3(8): 295-299.
- Kozel TR and Gotschlich EC. 1982. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol.* 129(4): 1675-1680.
- Kozel TR, Levitz SM, Dromer F, Gates MA, Thorkildson P and Janbon G. 2003. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O acetylation or xylosyl side chains. *Infect Immun.* 71(5): 2868-2875.
- Kramomtong L, Niyomtham W, Talummuk S, Chaianate P and Sievert KI. 2010. In vitro testing of the efficacy of organic releasing chlorine (VirusnipTM) against *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Candida albicans* and *Trichophyton mentagophytes*. *Thai J Vet Med.* 43(3): 329-336
- Krockenberger MB, Canfield PJ and Malik R. 2003. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): a review of 43 cases of cryptococcosis. *Med Mycol.* 41(3): 225-234.
- Kruse RH, Green TD, Chambers RC and Jones MW. 1963. Disinfection of Aerosolized Pathogenic Fungi on Laboratory Surfaces. I. Tissue Phase. *Appl Microbiol.* 11: 436-445.
- Kumarasamy N, Solomon S, Flanigan TP, Hemalatha R, Thyagarajan SP and Mayer KH. 2003. Natural history of human immunodeficiency virus disease in southern India. *Clin Infect Dis.* 36(1): 79-85.
- Kuroki M, Phichaichumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, Miyazaki T, Kakeya H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Ishida Y and Kohno S. 2004. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. *Yeast.* 21(10): 809-812.
- Kwon-Chung KJ. 1975. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia.* 67(6): 1197-1200.

- Kwon-Chung KJ, Polacheck I and Bennett JE. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol.* 15(3): 535-537.
- Kwon-Chung KJ, Edman JC and Wickes BL. 1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 60(2): 602-605.
- Kwon-Chung KJ, Varma A, Edman JC and Bennett JE. 1992. Selection of *ura5* and *ura3* mutants from the two varieties of *C. neoformans* on 5-fluoroorotic acid medium. *J Med Vet Mycol.* 30(1): 61-69.
- Kwon-Chung KJ, Goldman WE, Klein B and Szaniszló PJ. 1998. Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. *Med Mycol.* 36(1): 38-44.
- Kwon-Chung KJ and Varma A. 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 6(4): 574-587
- Lakshmi V, Sudha T, Teja VD and Umabala P. 2007. Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. *Indian J Med Microbiol.* 25(2): 146-149.
- Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC and Vainstein MH. 2008. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med Mycol.* 46(4): 377-383.
- Lin X and Heitman J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol.* 60: 69-105.
- Littman ML and Borok R. 1968. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl.* 35(3): 329-345.
- Litvintseva AP, Carbone I, Rossouw J, Thakur R, Govender NP and Mitchell TG. 2011. Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa. *PLoS One.* 6(5): e19688.
- Litvintseva AP and Mitchell TG. 2009. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. *Infect Immun.* 77(8): 3188-3195.
- Lobova D, Samola J and Cizek A, 2004. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Med Microbiol.* 53: 287-291.
- Loperena-Alvarez Y, Ren P, Li X, Schoonmaker-Bopp DJ, Ruiz A, Chaturvedi V and Rios-Velazquez C. 2010. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. *Mycopathologia.* 170(4): 279-285.

- Ma H and May RC. 2009. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol.* 67: 131-190.
- McClelland CM, Fu J, Woodlee GL, Seymour TS and Wickes BL. 2002. Isolation and characterization of the *Cryptococcus neoformans* MATa pheromone gene. *Genetics.* 160(3): 935-947.
- McDonnell G and Russell AD. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12(1): 147-179.
- McFadden DC, De Jesus M and Casadevall A. 2006. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem.* 281(4): 1868-1875.
- McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A and Zhang SX. 2011. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 49(8): 3050-3053.
- Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M and Castaneda E. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 9(2): 189-195.
- Missall TA, Moran JM, Corbett JA and Lodge JK. 2005. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryot Cell.* 4(1): 202-208.
- Mitchell TG and Perfect JR. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev.* 8(4): 515-548.
- Montenegro H and Paula CR. 2000. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. *Med Mycol.* 38(5): 385-390.
- Mseddi F, Sellami A, Jarboui MA, Sellami H, Makni F and Ayadi A. 2011. First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. *Mycopathologia.* 171(5): 355-360.
- Nakamura Y, Kano R, Sato H, Watanabe S, Takahashi H and Hasegawa A. 1998. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. *Mycoses.* 41(1-2): 35-40.
- Nandhakumar B, Kumar CP, Prabu D and Menon T. 2006. Mustard seed agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 44(2): 674.
- Nandhakumar B, Menon T and Kumar CP. 2007. A new henna-based medium for the differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Microbiol.* 56(Pt 4): 568.

- Nielsen K, De Obaldia AL and Heitman J. 2007. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell*. 6(6): 949-959.
- Nosanchuk JD and Casadevall A. 2003. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology*. 149(7): 1945-1951.
- Nosanchuk JD and Casadevall A. 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(11): 3519-3528.
- Nosanchuk JD, Valadon P, Feldmesser M and Casadevall A. 1999. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. *Mol Cell Biol*. 19(1): 745-750.
- Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J and Heitman J. 1997. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*. 16(10): 2576-2589.
- Okabayashi K, Hasegawa A and Watanabe T. 2007. Microreview: capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 163(1): 1-8.
- Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR and Huffnagle GB. 2004. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol*. 164(5): 1761-1771.
- Paliwal DK and Randhawa HS. 1978. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 7(4): 346-348.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG and Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 23(4): 525-530.
- Polacheck I. 1991. The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. *Zentralbl Bakteriol*. 276(1): 120-123.
- Pulverer G and Korth H. 1971. *Cryptococcus neoformans*: pigment formation on polyphenols. *Med Microbiol Immunol*. 157(1): 46-51.
- Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Prakash A, Khan ZU and Xu J. 2011. Seasonal variations in the prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decayed wood inside trunk hollows of diverse tree species in north-western India: a retrospective study. *Med Mycol*. 49(3): 320-323.

- Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Preeti Sinha K, Khan ZU, Sun S and Xu J. 2008. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Med Mycol.* 46(8): 823-833.
- Randhawa HS, Kowshik T and Khan ZU. 2005. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Med Mycol.* 43(1): 67-71.
- Randhawa HS, Kowshik T, Preeti Sinha K, Chowdhary A, Khan ZU, Yan Z, Xu J and Kumar A. 2006. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med Mycol.* 44(7): 623-630.
- Rodrigues ML, Alviano CS and Travassos LR. 1999. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes Infect.* 1(4): 293-301.
- Ruiz A, Fromtling RA and Bulmer GS. 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infect Immun.* 31(2): 560-563.
- Salkin IF and Hurd NJ. 1982. New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. *J Clin Microbiol.* 15(1): 169-171.
- Salkowski CA and Balish E. 1991. Cutaneous cryptococcosis in athymic and beige-athymic mice. *Infect Immun.* 59(5): 1785-1789.
- Schmeding KA, Jong SC and Hugh R. 1984. Biochemical variation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 84(2-3): 121-131.
- Sethi KK and Randhawa HS. 1968. Survival of *Cryptococcus neoformans* in the gastrointestinal tract of pigeons following ingestion of the organism. *J Infect Dis.* 118(2): 135-138.
- Simwami SP, Khayhan K, Henk DA, Aanensen DM, Boekhout T, Hagen F, Brouwer AE, Harrison TS, Donnelly CA and Fisher MC. 2011. Low diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus sequence types from Thailand are consistent with an ancestral African origin. *PLoS Pathog.* 7(4): e1001343.
- Soltani M, Bayat M, Hashemi SJ, Zia M and Pestechian N. 2013. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other opportunistic fungi from pigeon droppings. *J Res Med Sci.* 18(1): 56-60.
- Sriburee P, Khayhan S, Khamwan C, Panjaisee S and Tharavichitkul P. 2004. Serotype and PCR-fingerprints of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia.* 158(1): 25-31.

- Steenbergen JN and Casadevall A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 5(7): 667-675.
- Stringfellow K, Anderson P, Caldwell D, Lee J, Byrd J, McReynolds J, Carey J, Nisbet D and Farnell M. 2009. Evaluation of disinfectants commonly used by the commercial poultry industry under simulated field conditions. *Poult Sci.* 88(6): 1151-1155.
- Taylor RL and Duangmani C. 1968. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Thailand. *Am J Epidemiol.* 87(2): 318-322.
- Tendolkar U, Tainwala S, Jog S and Mathur M. 2003. Use of a new medium - tobacco agar, for pigment production of *Cryptococcus neoformans*. *Indian J Med Microbiol.* 21(4): 277-279.
- The center for food security & Public health. 2013. Cryptococcosis [Online] Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/cryptococcosis.pdf> [2014, Jan 8]
- Tucker SC and Casadevall A. 2002. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(5): 3165-3170.
- Vajpayee M, Kanswal S, Seth P and Wig N. 2003. Spectrum of opportunistic infections and profile of CD4+ counts among AIDS patients in North India. *Infection.* 31(5): 336-340.
- Vickers RM, McElligott JJ, Jr., Rihs JD and Postic B. 1974. Medium containing trypan blue and antibiotics for the detection of *Cryptococcus neoformans* in clinical samples. *Appl Microbiol.* 27(1): 38-42.
- Vidotto V, Aoki S, Ponton J, Quindos G, Koga-Ito CY and Pugliese A. 2004. A new caffeic acid minimal synthetic medium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Rev Iberoam Micol.* 21(2): 87-89.
- Villena SN, Pinheiro RO, Pinheiro CS, Nunes MP, Takiya CM, DosReis GA, Previato JO, Mendonca-Previato L and Freire-de-Lima CG. 2008. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell Microbiol.* 10(6): 1274-1285.
- Vitale RG, Pascuccelli V and Afeltra J. 2012. Influence of capsule size on the in vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. *J Med Microbiol.* 61(Pt 3): 384-388.
- Walcott C. 1996. Pigeon homing: observations, experiments and confusions. *J Exp Biol.* 199(1): 21-27.

- Wettingfeld RF, Schmidt EC, Naegele CF and Doerner AA. 1956. Systemic cryptococcosis without central nervous system involvement: a case report. *Ann Intern Med.* 44(6): 1259-1264.
- Wong B, Perfect JR, Beggs S and Wright KA. 1990. Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. *Infect Immun.* 58(6): 1664-1670.
- Wu Y, Du PC, Li WG and Lu JX. 2012. Identification and molecular analysis of pathogenic yeasts in droppings of domestic pigeons in Beijing, China. *Mycopathologia.* 174(3): 203-214.
- Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H and Osumi M. 2002. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis.* 55(4): 122-125.
- Yauch LE, Lam JS and Levitz SM. 2006. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog.* 2(11): e120.
- Zaragoza O and Casadevall A. 2004. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online.* 6: 10-15.
- Zarrin M, Jorfi M, Amirrajab N and Rostami M. 2010. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Ahwaz, Iran. *Turk J Med Sci* 40(2): 303-316.
- Zerpa R, Huicho L and Guillen A. 1996. Modified India ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol.* 34(9): 2290-2291.
- Zhu X and Williamson PR. 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 5(1): 1-10.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Sabouraud dextrose agar (SDA)		
Enzymatic digest of Casein	5	กรัม
Enzymatic digest of animal tissue	5	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar powder	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
2. Caffeic acid agar (CA)		
Sabouraud dextrose agar	1	กรัม
Potato dextrose agar	1	กรัม
Agar powder	1.5	กรัม
Distilled water	70	มิลลิลิตร
Caffeic acid	0.05	กรัม
Distilled water	30	มิลลิลิตร
3. Peptone solution diluents (PDS)		
Peptone	1	กรัม
Sodium Chloride	8.5	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
pH 7.0 ± 0.2		
4. 0.85% Normal saline		
Sodium chloride	0.85	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
5. Yeast extract peptone dextrose broth (YPDB)		
Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

6. Yeast extract peptone dextrose agar (YPDA)

Yeast extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar powder	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

7. 10X Phosphate buffered saline

Sodium chloride	40	กรัม
Potassium chloride	1	กรัม
Disodium hydrogen phosphate	14.5	กรัม
Monopotassium phosphate	1	กรัม
Distilled water	500	มิลลิลิตร
pH 7.2 ± 0.2		

8. 60% glycerol

Glycerol	30	มิลลิลิตร
Distilled water	20	มิลลิลิตร

9. Urea agar

Peptone	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Monopotassium phosphate	2	กรัม
Agar powder	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
Phenol red	6	มิลลิลิตร
20% Urea	20	มิลลิลิตร
50% Glucose	4	มิลลิลิตร

หมายเหตุ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ต่อจากนั้น จึงเติม 20%Urea และ 50% glucose ตามลำดับ

10. Broth sugar

Peptone	10 กรัม
Beef extract	3 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร
Bromthymol blue	0.2 มิลลิลิตร

11. D/E neutralizing agar

Pancreatic digest of casein	5 กรัม
Yeast extracts	2.5 กรัม
Dextrose	10 กรัม
Sodium thioglycollate	1.0 กรัม
Sodium thiosulfate	6.0 กรัม
Sodium bisulfate	2.5 กรัม
Polysorbate 80	5.0 กรัม
Lecithin	7.0 กรัม
Bromcresol purple	0.02 กรัม
Distilled water	1 ลิตร

12. 10X Tris Borate EDTA (TBE)

Tris Base	108 กรัม
Boric acid	55 กรัม
EDTA (pH8.0)	40 มิลลิลิตร
Distilled water	1 ลิตร

ภาคผนวก ข

อัตราการรอดของเชื้ออ้างอิง *C. neoformans* ภายหลังจากการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 14 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบภายหลังการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ A

น้ำยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น	เชื้อ	จำนวนการรอดชีวิต ($\times 10^5$ CFU/g) ในระยะเวลาที่ (นาที)															
			<i>C. neoformans</i> บริสุทธิ์								<i>C. neoformans</i> ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ							
			0.10	0.30	1.00	3.00	5.00	10.00	0.10	0.30	1.00	3.00	5.00	10.00	15.00	30.00		
Virusnip®	2	1	-	-	-	-	-	-	21.15	5.75	0	0	-	-	-	-		
		2	-	-	-	-	-	-	17.10	6.50	0	0	-	-	-	-		
		3	-	-	-	-	-	-	20.50	1.70	0	0	-	-	-	-		
		4	-	-	-	-	-	-	2.20	0.20	0	0	-	-	-	-		
		5	-	-	-	-	-	-	1.46	0.44	0	0	-	-	-	-		
		6	-	-	-	-	-	-	14.10	6.80	0	0	-	-	-	-		
		7	-	-	-	-	-	-	13.60	5.00	0	0	-	-	-	-		
		8	-	-	-	-	-	-	16.55	4.85	0	0	-	-	-	-		
	1	1	5.55	0.15	0	0	0	-	-	-	14.25	4.00	0	0	-	-		
		2	4.50	0.10	0	0	0	-	-	-	23.20	3.90	0	0	-	-		
		3	13.00	5.00	0	0	0	-	-	-	17.10	0.60	0	0	-	-		
		4	4.80	0.45	0	0	0	-	-	-	11.05	3.85	0.15	0	-	-		
		5	4.85	0.60	0	0	0	-	-	-	12.15	4.00	0.50	0	-	-		
		6	17.20	0.20	0	0	0	-	-	-	9.50	2.15	0.30	0	-	-		
		7	12.80	0.10	0	0	0	-	-	-	11.75	4.65	0	0	-	-		
		8	11.30	0.20	0	0	0	-	-	-	9.20	1.30	0.05	0	-	-		
0.5	1	26.00	12.00	0.20	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	2	30.00	15.60	0.70	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	3	16.80	3.80	0.10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	4	23.00	5.85	0.10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	5	30.00	5.75	0.11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	6	30.00	3.55	0.10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	7	30.00	2.20	0.10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	8	30.00	2.50	1.40	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

หมายเหตุ (-) หมายถึง ช่วงระยะเวลาและความเข้มข้นที่ไม่เกิดการทดสอบ

ตารางที่ 15 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบภายหลังการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ B

น้ำยาฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น	เชื้อ	จำนวนการรอดชีวิต ($\times 10^5$ CFU/g) ในระยะเวลาที่ (นาที)															
			<i>C. neoformans</i> บริสุทธิ์								<i>C. neoformans</i> ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ							
			0.10	0.30	1.00	3.00	5.00	10.00	0.10	0.30	1.00	3.00	5.00	10.00	15.00	30.00		
Clorox®	1	1	-	-	-	-	-	-	-	0.95	0	0	-	-	-	-		
		2	-	-	-	-	-	-	-	4.50	0	0	-	-	-	-		
		3	-	-	-	-	-	-	-	1.60	0	0	-	-	-	-		
		4	-	-	-	-	-	-	-	4.50	0	0	-	-	-	-		
		5	-	-	-	-	-	-	-	3.30	0	0	-	-	-	-		
		6	-	-	-	-	-	-	-	2.30	0	0	-	-	-	-		
		7	-	-	-	-	-	-	-	1.00	0	0	-	-	-	-		
		8	-	-	-	-	-	-	-	8.65	0	0	-	-	-	-		
0.5	1	1	-	40.00	7.80	0	0	-	-	-	8.70	3.80	0	0	-	-		
		2	-	40.00	8.85	0	0	-	-	-	7.85	0.50	0	0	-	-		
		3	-	40.00	5.65	0	0	-	-	-	5.55	0.35	0	0	-	-		
		4	-	40.00	9.03	0	0	-	-	-	7.55	0.80	0	0	-	-		
		5	-	40.00	6.95	0	0	-	-	-	3.53	0.15	0	0	-	-		
		6	-	40.00	8.35	0	0	-	-	-	3.75	0.35	0	0	-	-		
		7	-	17.30	2.90	0	0	-	-	-	6.90	0.25	0	0	-	-		
		8	-	20.85	9.01	0	0	-	-	-	9.85	0.15	0	0	-	-		
0.31	1	1	-	-	-	15.65	2.65	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		2	-	-	-	15.70	6.80	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		3	-	-	-	14.90	1.65	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		4	-	-	-	18.85	2.00	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		5	-	-	-	15.00	0.90	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		6	-	-	-	15.35	1.55	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		7	-	-	-	7.15	0.85	0	-	-	-	-	-	-	-	-		
		8	-	-	-	15.15	1.90	0	-	-	-	-	-	-	-	-		

หมายเหตุ (-) หมายถึง ช่วงระยะเวลาและความเข้มข้นที่ไม่มีการทดสอบ

ตารางที่ 16 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *C. neoformans* ซีโรไทป์ A จากสิ่งขับถ่ายนกพิราบภายหลังการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ C

หมายเลขเชื้อ	ความเข้มข้น	เชื้อ	จำนวนการรอดชีวิต ($\times 10^5$ CFU/g) ในระยะเวลาที่ (นาที)															
			<i>C. neoformans</i> บริสุทธิ์								<i>C. neoformans</i> ในสิ่งขับถ่ายนกพิราบ							
			0.10	0.30	1.00	3.00	5.00	10.00	10.00	0.10	0.30	1.00	3.00	5.00	10.00	10.00	15.00	30.00
Umonium38®	0.062	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.75	1.10	0
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.15	2.30	0
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.55	2.85	0
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.45	0.85	0
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.50	2.70	0
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.70	3.85	0
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.45	6.65	0.50
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.00	12.95	4.85
		0.031	1	2.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	2	10.00	3.65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	3	14.60	4.85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	4	13.60	2.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	5	16.20	2.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	6	16.35	2.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	7	11.20	3.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
	8	17.70	6.20	3.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	

หมายเหตุ (-) หมายถึง ช่วงระยะเวลาและความเข้มข้นที่ไม่มีการทดสอบ

ภาคผนวก ค
ส่วนประกอบของน้ำผลิตภัณฑ์น้ำยาฆ่าเชื้อ

1. กลุ่มโพแทสเซียม โมโนเปอร์ซัลเฟต (ผลิตภัณฑ์ A)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (%W/W)
- Potassium peroxymonosulphate	50.0
- Sodium dichloroisocyanurate	5.0

2. กลุ่มโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ผลิตภัณฑ์ B)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (%W/W)
- Sodium hypochlorite	6.0
- Other ingredients	5.0

3. กลุ่มควอเทอนารีแอมโมเนียม (ผลิตภัณฑ์ C)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (%W/W)
- N-benzyl-N-dodecyl-N,N-dimethyl-ammonium Chlorite/ N-benzyl-N,N-dimethyl-N-tetradecyl-ammonium Chlorite	100

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปฐมพร คลังวิเชียร เกิดเมื่อวันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการสัตวแพทย์) เกียรตินิยมอันดับที่ 1 คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2550

ผลงานที่นำเสนอในงานวิชาการ มีดังนี้

1. เรื่อง Preliminary surveillance of yeasts from pigeon droppings in temple areas and pet shops in Bangkok. ในงานการประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เลี้ยง ครั้งที่ 18 วันที่ 13-16 พฤษภาคม พ.ศ. 2555
2. เรื่อง Incidence of Cryptococcus neoformans from pigeon droppings in Bangkok and Nakhonpathom province, Thailand, during 2012. ในงานการประชุมวิชาการนานาชาติทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 38 วันที่ 13-16 มกราคม พ.ศ. 2556