ความชุกของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกพิราบในบางแสน จังหวัดชลบุรี ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry

Prevalence of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon Droppings in Bangsean, Chon Buri by MALDI-TOF mass spectrometry technique

ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย[*], ศุภลักษณ์ สุมาลี[**], ศิริวัฒณา ลาภหลาย[**], พิมรา ทองแสง[***], รุ่งนภา นวลมะลัง[*], อภิญญา บุญเขียน[*], มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[*,**]**

*คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

**สาขาวิชาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์

***สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์

****หน่วยวิจัยด้านนวัตกรรมเซนเซอร์ทางเคมีและชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา

Natthapaninee Thanomsridetchai[*], Supphalak Sumali[**], Siriwattana Labhlay[**], Pimara Thongsaeng[***], Rungnapa Nualmalang[*], Apinya Bunkhean[*], Marut Tangwattanachuleeporn[*,**]**

*Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

**Department of Biology and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University

***Department of Health Sciences, Faculty of Science and Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University

****Research Unit for Sensor Innovation, Burapha University

บทคัดย่อ

เชื้อ *Cryptococcus neoformans* เป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่ก่อโรค cryptococcosis ในมนุษย์ มักพบได้ในมูลนกธรรมชาติ เช่น นกพิราบ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความชุกของเชื้อราชนิดนี้ โดยทำการเก็บมูลนกพิราบจำนวน 300 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อโดยเพาะเลี้ยงบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่ใส่ยา Chloramphenicol ทำการสุ่มเขี่ยเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Cryptococcus* spp. ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อได้ 136 ไอโซเลท และทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การสร้างเอนไซม์ฟีนอลออกซีเดส และการสร้างแคปซูล จากการทดลองพบว่ามี 27 ไอโซเลท ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *C. neoformans* จึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวด้วยวิธี Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) เพื่อยืนยันผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ผลที่ได้พบว่าเชื้อทั้ง 27 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *C. neoformans* คิดเป็นร้อยละ 9

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความชุกของเชื้อ *C. neoformans* ในมูลนกพิราบ และเป็นฐานข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในการปนเปื้อนของเชื้อราในสิ่งแวดล้อม ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่ายังควรส่งเสริมให้มีการจัดการสุขาภิบาลในการกำจัดมูลนกพิราบ เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ *C. neoformans* อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยยังพบเชื้อราชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในมูลนกพิราบ เช่น *Lodderomyces* spp. ซึ่งมีรายงานการก่อโรคในมนุษย์ ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์, มูลนกพิราบ, บางแสน, จังหวัดชลบุรี, มัลดิทอฟแมสสเปคโตรเมทรี

Abstract

Cryptococcus neoformans is an opportunistic human pathogenic yeast that causes cryptococcosis. It's often founded in natural birds dropping such as pigeon. Therefore, lead to the objective to study the prevalence of *C. neoformans*. Diagnostic testing was performed by collected 300 samples and cultured in Sabouraud's dextrose agar medium containing 0.4 g/L Chloramphenicol, colony randomly that were expected to be *Cryptococcus* spp. The candidate yeast 136 isolates were separated and examined biochemical reaction such as capabilities to produce enzyme urease, phenol oxidase and capsule. The results shown that 27 isolates were assumed to be *C. neoformans*. Then confirm species of each isolates with Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The ratio of *C. neoformans* is 9 percent of 300 Isolates. The results from this study presence the prevalence of *C. neoformans* from pigeon dropping and database in epidemiology of contamination of fungi in environment. This indicates that the sanitary management of pigeon droppings should be promoted as a guideline for the control and prevention of *C. neoformans* infection. Furthermore, in this study the researchers also found other fungi contaminate pigeon droppings such as *Lodderomyces* spp., which has been reported to cause disease in humans. The researcher is continuing further studies.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, pigeon droppings, Bangsean, Chon Buri province, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

บทนำ

จังหวัดชลบุรี ประกอบด้วยสถานที่สำคัญอาทิ ด้านการท่องเที่ยว เช่น หาดบางแสน วิหารเทพสถิตฯ ตลาดปลาอ่างศิลา สถานศึกษาขนาดใหญ่อย่างมหาวิทยาลัยบูรพา ตลอดจนศูนย์ราชการอย่างสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล รวมไปถึงสถานที่ออกกำลังกายในสวนสาธารณะ หรือแม้กระทั่งสถานพยาบาลชั้นนำหลายแห่ง แม้ว่าสถานที่เหล่านี้จะมีการสัญจรพลุกพล่าน และดึงดูดความสนใจของนักท่องเที่ยวในหลายช่วงอายุจากทุกภาคของประเทศไทย จนเกิดการรวมตัวกันเป็นจำนวนมากในสถานที่ดังกล่าว แต่ปัจจัยเหล่านี้ไม่ได้ส่งผลให้จำนวนนกพิราบที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ลดน้อยลง แต่กลับมีปริมาณมากขึ้นจากการได้รับอาหารจากนักท่องเที่ยวและร้านค้าในบริเวณใกล้เคียง[1] นำมาซึ่งปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากมูลนกพิราบและอันตรายแฝงในรูปแบบของเชื้อก่อโรคต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (cryptococcal meningitis) เนื่องจากในมูลนกมีสารครีอาร์ทินิน (Creatinin) ที่เป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนซึ่งมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดต่างๆ เช่น *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum* เป็นต้น[2]

เชื้อ *Cryptococcus neoformans* เป็นยีสต์ที่มีรูปร่างกลมหรือรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 - 8.0 ไมครอนและมีการสร้างแคปซูล เชื้อ *C. neoformans* สามารถพบได้ในดินที่มีอินทรีย์สารอุดมสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ปีก เช่น ไก่ นก เป็นต้น เชื้อ *C. neoformans* สามารถเจริญได้ในหลอดอาหารและลำไส้ของนก โดยไม่ส่งผลให้เกิดโรคในนก เชื้อ *C. neoformans* เป็นยีสต์ที่ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Cryptococcosis) สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้จากการสัมผัสมูลนกโดยตรงหรือการสูดดมเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไปสะสมในร่างกายในคนปกติ (พบในเด็กและผู้สูงอายุ)[3] และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเชื้อ *C. neoformans* จะสามารถเจริญเติบโตและก่อโรคได้ที่ปอด นอกจากนี้ยังสามารถแพร่กระจายไปในหลอดเลือดและระบบประสาทส่วนกลางรวมถึงอวัยวะอื่นๆ ของร่างกายอีกด้วย[4] มีรายงานการติดเชื้อในคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องที่ได้รับเชื้อ *C. neoformans* จากนกเลี้ยง แต่ไม่มีการแสดงอาการและการติดต่อระหว่างมนุษย์กับมนุษย์ด้วยกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบการติดเชื้อ *C. neoformans* จากแม่สู่ลูก (Vertical transmission) โดยแม่มีการติดเชื้อ HIV และมีภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อ *Cryptococcus* spp. ทำให้ทารกสามารถได้รับเชื้อด้วย ปัจจุบันพบว่าอุบัติการณ์ของโรค Cryptococcosis มีเพิ่มสูงขึ้น โดยเป็นสาเหตุอันดับที่สี่ของการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรค AIDs แม้จะมีการพัฒนายาต้านไวรัส HIV ที่มีประสิทธิภาพมาก แต่ด้วยปัญหาในการเข้าถึงยาต้านไวรัสในประเทศที่กำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทย ทำให้อุบัติการณ์ของโรค Cryptococcosis ยังคงสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง[5] จากรายงานของสำนักระบาดวิทยาพบว่าประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 39,662 ราย ในปี พ.ศ. 2547 ทั้งนี้ยังไม่มีการเปิดเผยจำนวนผู้ป่วย Cryptococcosis ภายในจังหวัดชลบุรีในปัจจุบัน[6]

อย่างไรก็ตามแม้ว่าในสถานพยาบาล จะมีผู้เชี่ยวชาญในการวินิจฉัยสาเหตุของโรค Cryptococcosis แต่ไม่สามารถปฏิเสธได้ว่าการวินิจฉัยใช้ระยะเวลายาวนานจากการเพาะเชื้อ ทำให้ผู้ป่วย

หลายรายเข้าสู่ภาวะวิกฤติ และเสียชีวิตในที่สุด ด้วยเหตุนี้หากมีเครื่องมืออย่าง MALDI-TOF mass spectrometry ที่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ถึงระดับสปีชีร์ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงต่อ 96 ตัวอย่าง อีกทั้งขั้นตอนการวิเคราะห์ทำได้ง่าย แม้มีประสบการณ์ในการใช้เครื่องมือน้อยกว่า 1 สัปดาห์ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นแนวทางแก่หน่วยงานสาธารณสุขทุกฝ่าย ในการยกระดับประสิทธิภาพการวินิจฉัยให้มีความรวดเร็วแม่นยำ นำไปสู่ประสิทธิผลในการรักษาที่ดียิ่งขึ้น

ดังนั้นเพื่อสะท้อนถึงต้นต่อของปัญหาการเจ็บป่วยจาก Cryptococcosis ได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว ผู้วิจัยยังมุ่งนำเสนอการใช้เทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *C. neoformans* ในพื้นที่จังหวัดชลบุรี

วิธีการศึกษา

เชื้อ *C. neoformans* หากดูด้วยตาเปล่าจะมองเห็นเป็นโคโลนีสีขาวหรือครีม มีลักษณะมันวาวเนื่องมาจากการสร้างแคปซูล แต่การวินิจฉัยเพื่อยืนยันในปัจจุบันและเป็นที่ยอมรับคือการศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อบนอาหารจำเพาะประเภทต่างๆ แต่วิธีการเหล่านี้ใช้ระยะเวลานานและมีวิธีการเตรียมที่ซับซ้อน อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญในการวินิจฉัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีความหลากหลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งนำเสนอเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF ในขั้นตอนการยืนยันผลการวินิจฉัย การทดลองดำเนินการตามวิธีการของ Tangwattanachuleeporn M และคณะ[7]

1. การเก็บตัวอย่างมูลนกพิราบและการตรวจหาเชื้อ *C. neoformans*

เก็บตัวอย่างมูลนกพิราบจาก บริเวณพื้นทางเดินเท้า ระเบียงของอาคาร บันไดหนีไฟ และสวนสาธารณะของพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในช่วงเวลา 16.00-17.00 น. ในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงสิงหาคม แบ่งเป็นเดือนละ 100 ตัวอย่าง (รูปที่ 1) โดยตัวอย่างมูลนกพิราบจำนวน 300 ตัวอย่าง บรรจุในถุงปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการชั่งตัวอย่างมูลนกพิราบ 5 g ละลายใน 0.85% NaCl ปริมาตร 45 ml แล้วนำไป Vortex เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำ (Supernatant) 100 µl ไปเพาะเลี้ยงโดย Spread plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (Himedia:India) ที่มียา 0.4 g/L Chloramphenicol แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 3 - 5 วัน ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไป

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *C. neoformans* โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test)

2.1 พิสูจน์การสร้างแคปซูลด้วย India ink assay

หยดหมึกสีดำลงบนสไลด์จำนวน 1 หยด ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่คัดแยกได้จากมูลนกพิราบกระจายในหยดหมึก ปิดด้วย cover slip แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า สังเกตการสร้างแคปซูลได้จากลักษณะแวววาวสะท้อนแสงล้อมรอบเซลล์ของเชื้อรา (Positive)

2.2 พิสูจน์การสร้างเอนไซม์ Urease

เตรียม Urea base agar plate (Himedia:India) ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่คัดแยกได้จากมูลนกพิราบ เขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ประมาณ 24-48 ชั่วโมง สังเกตการสร้างเอนไซม์ Urease ได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู (Positive)

2.3 พิสูจน์การสร้างเอนไซม์ Phenoloxidase

เตรียม Caffeic acid agar plate (Criterion: USA) ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่คัดแยกได้จากมูลนกพิราบ เขี่ยเชื้อลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 37°C ประมาณ 24-48 ชั่วโมง สังเกตการสร้างเอนไซม์ Phenoloxidase ได้จากการสีของโคโลนีของเชื้อ ซึ่งจะมีสีน้ำตาลเข้ม (Positive)

หากพบว่าเชื้อให้ผลบวกต่อการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ มีการสร้างแคปซูล, เอนไซม์ Urease และ เอนไซม์ Phenoloxidase จะถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ต่อไป ทุกการทดสอบจะดำเนินการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยมี Positive control (*C. neoformans*) และ Negative control (*C. albicans*)

3. การพิสูจน์เชื้อ *C. neoformans* โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

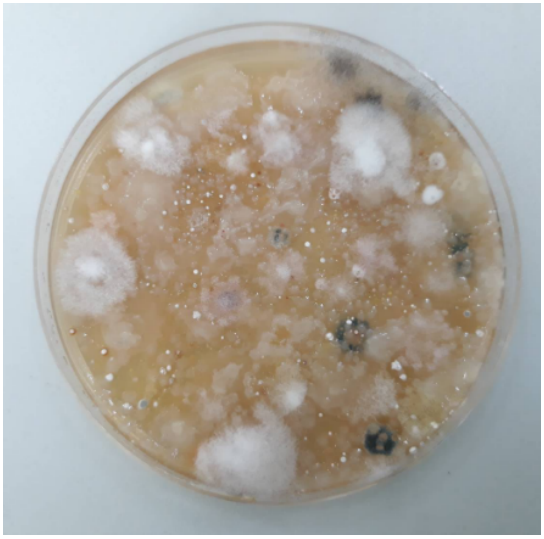
ใช้วิธี Extraction method โดยเขี่ยโคโลนีเชื้อ 1 µl (1 loop) ใส่ใน HPLC-grade water 300 µl จากนั้นเติมเอทานอล 900 µl แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13000-15000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วใช้ปิเปตต์แยกส่วน supernatant ออก ทำการปั่นเหวี่ยงและแยกส่วน supernatant ออกซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำมาผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที เติม 70% formic acid 25 µl ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม 100% Acetonitrile 25 µl ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13000-15000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วน supernatant 1 µl หยดลงบน MALDI target plate ผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนแห้งแล้วจึงหยด HCCA matrix solution 1 µl รอให้สารแห้ง นำไปวิเคราะห์เอกลักษณ์ของเชื้อด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ชุดควบคุมคือเชื้อ Bacteria standard solution ดำเนินการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

รูปที่ 1 แสดงมูลนกพิราบบริเวณสวนสาธารณะ (ซ้าย) และมูลนกพิราบบริเวณบันไดหนีไฟอาคาร (ขวา)

ผลการศึกษา

1. การตรวจหาเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างมูลนกพิราบ

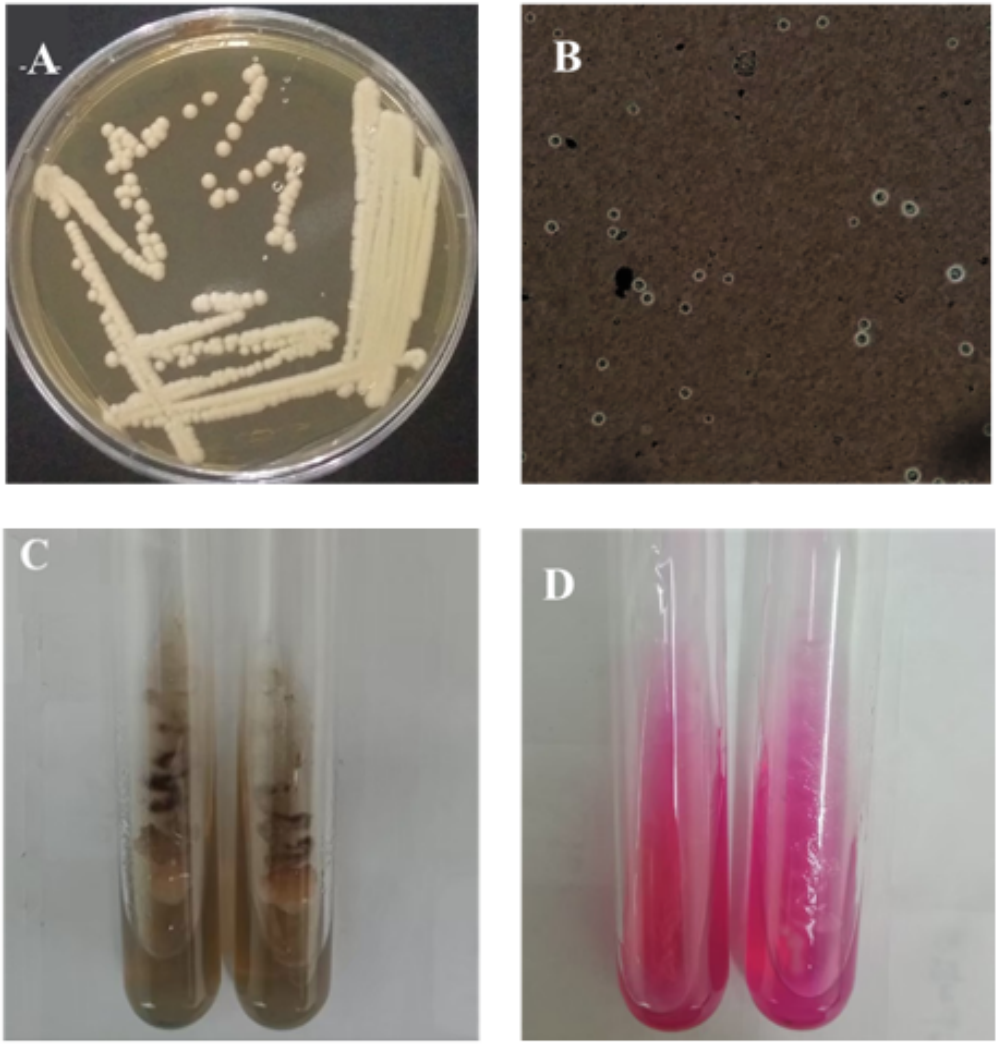
จากการสำรวจเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างมูลนกที่เก็บได้จากสถานที่ต่าง ๆ โดยมีแหล่งที่มาแตกต่างกันตามที่อยู่อาศัย อาทิ อาศัยตามอาคาร อาศัยตามสวนสาธารณะ สามารถเก็บตัวอย่างมูลนกพิราบได้ 300 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างมูลนกพิราบที่เก็บได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA+ 0.4 g/L Chloramphenicol พบว่ามีเชื้อเจริญ จากนั้นได้ทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อที่เจริญโดยเลือกจากเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวครีม และมีเมือกที่ผิวบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 136 isolated จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไป (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร SDA + 0.4 g/L Chloramphenicol

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *C. neoformans* โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test)

เชื้อ *C. neoformans* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA จะมีลักษณะโคโลนีทึบแสง ขอบเรียบ สีขาวครีม และมีเมือกที่ผิว (รูปที่ 3A) เมื่อนำมาย้อมดูด้วยสี India ink จะเห็นลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นเซลล์กลมมีแคปซูลล้อมรอบ (รูปที่ 3B) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อนี้ นอกจากนี้เชื้อ *C. neoformans* ยังสามารถสร้างเอนไซม์ Urease คือสามารถเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพูเข้ม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Urea agar (รูปที่ 3C) และเชื้อ *C. neoformans* ยังสามารถสร้างเอนไซม์ Phenoloxidase ทำให้มีการสร้างโคโลนีสีน้ำตาลบนอาหาร Caffeic acid agar (รูปที่ 3D) ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test) ทั้ง 3 การทดสอบพบว่า มี 27 isolates ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *C. neoformans*



รูปที่ 3 แสดง (A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* (B) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *C. neoformans* (C) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Phenoloxidase (D) ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ Urease

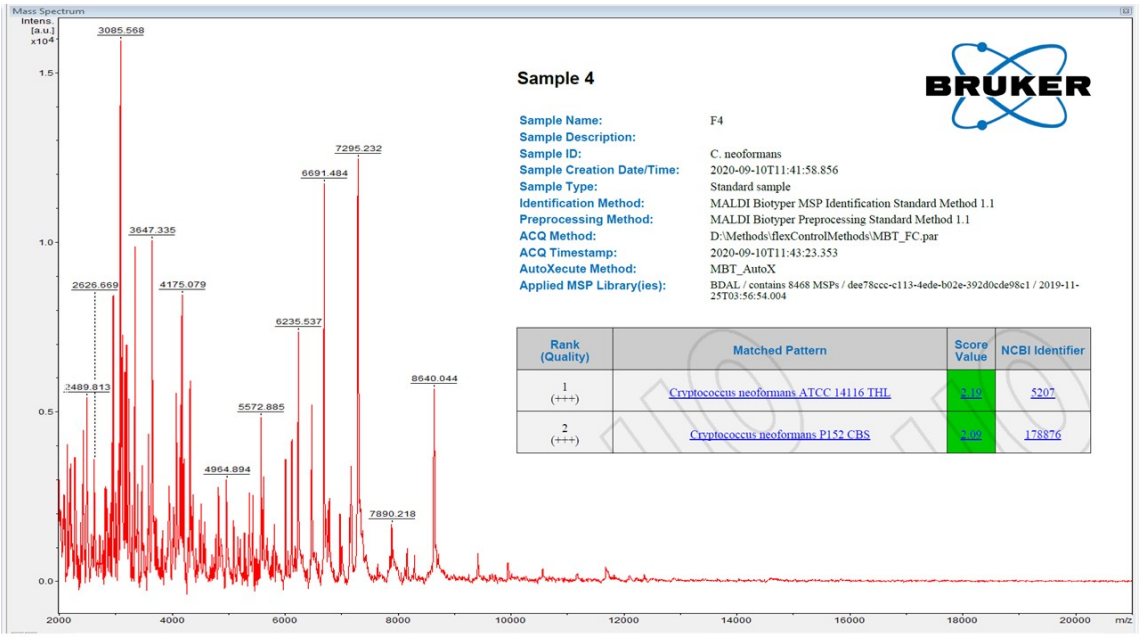
3. การพิสูจน์เชื้อ *C. neoformans* โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ให้ผลบวกของทั้ง 3 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี จำนวน 27 isolated นั้นเป็นเชื้อ *C. neoformans* (score value = 2.09) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของเชื้อ *C. neoformans*

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวเคมีและเทคนิค MALDI-TOF MS				
		Capsule	Urease	Phenoloxidase	MALDI-TOF	ผลการวินิจฉัย
พื้นทางเดินเท้า	PgCB8	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB14	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB28	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB65	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB72	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
ระเบียงอาคาร	PgCB83	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB84	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB96	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB122	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB137	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB143	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB148	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB150	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
บันไดหนีไฟ	PgCB161	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB164	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB188	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB189	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB193	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB201	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB223	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
สวนสาธารณะ	PgCB228	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB229	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB281	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB284	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB228	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB274	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*
	PgCB291	+	+	+	*C. neoformans*	*C. neoformans*

หมายเหตุ: แสดงข้อมูลเฉพาะเชื้อ *C. neoformans*



รูปที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์เชื้อ *C. neoformans* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างมูลนกพิราบ ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

อภิปรายผล

เชื้อ *C. neoformans* เป็นยีสต์ที่ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Cryptococcosis) สามารถพบได้ในดินที่มีอินทรีย์สารอุดมสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ปีก เช่น ไก่ นก เป็นต้น การก่อโรคในมนุษย์สามารถเกิดโดยตรงจากการสัมผัสมูลนก หรือทางอ้อมจากการสูดดมเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไปสะสมในร่างกาย ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อ *C. neoformans* จะสามารถเจริญและก่อโรคได้ที่ปอด นอกจากนี้ยังสามารถแพร่กระจายไปในหลอดเลือดและระบบประสาทส่วนกลาง รวมถึงอวัยวะอื่นๆ ของร่างกายได้อีกด้วย[2,4]

จังหวัดชลบุรี เป็นจังหวัดหนึ่งในภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งจัดเป็นแหล่งชุมชนที่มีมนุษย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้ยังจัดเป็นแหล่งท่องเที่ยวและพื้นที่เศรษฐกิจ ที่สร้างรายได้ให้กับคนในชุมชนอีกด้วย ปัจจุบันพบว่าพื้นที่นี้มีนกพิราบอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นหน่วยงานราชการ วัดวาอาราม โรงเรียน และสวนสาธารณะ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความชุกของเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างมูลนกพิราบจำนวน 300 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อได้ 136 isolates และพบว่ามี 27 isolates ที่เป็นเชื้อ *C. neoformans* โดยคิดเป็นร้อยละ 9 ปัจจัยที่ส่งผลให้พบเชื้อ *C. neoformans* ร้อยละ 9 เกิดจากสาเหตุหลายประการ อาทิ แหล่งที่นกอยู่อาศัยเป็นแหล่งที่อยู่ประจำ หรือเป็นเพียงพื้นที่หากิน ตลอดจนการทำความสะอาดอยู่เสมอ อาจส่งผลให้จำนวนเชื้อปนเปื้อนลดน้อยลง ตลอดจนในมูลนกพิราบมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญของเชื้อชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีการคัดแยกเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบในจังหวัดชลบุรี ได้ร้อยละ 107 รวมถึงในจังหวัดอื่นๆ ของประเทศไทย เช่น

ในเชียงใหม่แยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย 76 ไอโซเลท และจากสิ่งแวดล้อม 56 ไอโซเลท พบว่ามี 50 ไอโซเลท คือ *C. neoformans* เมื่อทดสอบด้วยวิธี PCR-fingerprints[8] ในขณะที่ความชุกของเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบในพื้นที่กรุงเทพมหานคร พบว่ามีมากถึงร้อยละ 9.099 อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบเชื้อ *C. neoformans* จากตัวอย่างมูลนกพิราบที่เก็บจากในมหาวิทยาลัย เช่น อุบลราชธานี[10] นครนายก[11] ซึ่งพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ร้อยละ 10-16 ซึ่งผลจากการพบเชื้อนี้สอดคล้องกับการรายงานการแยกเชื้อจากตัวอย่างคนไข้[12] ซึ่งสายพันธุ์ที่มักพบในไทย คือ serotype A13-15 เช่นเดียวกับที่มีรายงานในประเทศมาเลเซีย[16] เวียดนาม[17] ซึ่งแยกได้จากสิ่งแวดล้อมและจากผู้ป่วย HIV+ แม้ว่าการศึกษาย้อนหลังยังไม่พบการดื้อยาของเชื้อ[18,19] แต่การศึกษาเพื่อการเฝ้าระวังก็ยังมีความสำคัญมาก เพราะนอกจากเชื้อ *C. neoformans* แล้วทางทีมผู้วิจัยยังพบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ในมูลนกพิราบ เช่น *Lodderomyces* spp. และเชื้อราชนิดอื่นๆ อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อราฉวยโอกาสอื่นๆ ในมูลนกพิราบ เช่น *Candida* spp., *Rhodotolula* spp., *Tricosporon* spp., *Saccharomyces* spp. และ *Aspergillus* spp. อีกด้วย[20] ซึ่งเชื้อราเหล่านี้มีรายงานการก่อภาวะติดเชื้อราในกระแสเลือดในคนได้[20,21] ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* จากมูลนกพิราบได้ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าควรส่งเสริมให้มีการจัดการสุขาภิบาลในการกำจัดมูลนกพิราบ โดยแนวทางที่สามารถกระทำได้ทันทีคือการงดให้อาหารในบริเวณดังกล่าวและมีการทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเป็นการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ *C. neoformans* และเชื้อราชนิดอื่นๆ จากมูลนกพิราบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. สุวภาพ ประภาสวัสดิ์. ทรรศนคติ และความพึงพอใจของนักท่องเที่ยวที่มีต่อการท่องเที่ยวแบบวันเดียว ณ หาดบางแสน จังหวัดชลบุรีของประชากรเขตกรุงเทพมหานคร. การศึกษาเฉพาะบุคคลตามหลักสูตรบริหารธุรกิจบัณฑิตมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยกรุงเทพ, 2554.
2. Pollock C. Fungal diseases of columbiformes and anseriformes. Vet Clin North Am Exot Anim Pract, 2003; 6(2): 351-361.
3. Mada PK, Jamil RT, Alam MU. *Cryptococcus* [online]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431060/. (accessed : 20 February 2021)
4. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am, 2016; 30(1): 179-206.
5. Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS. Lancet Infect Dis, 2017; 17(11): e334-e343.
6. สำนักงานระบาดวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วย AIDs. [ระบบออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/pics/parasitic1.html. (วันที่สืบค้นข้อมูล : 20 กุมภาพันธ์ 2564)
7. Tangwattanachuleeporn M, Somparn P, Poolpol K, Gross U, Weig M, Bader O. Prevalence and antifungal susceptibility

of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Chon Buri Province, Eastern Thailand. Med Mycol J, 2013; 54(3): 303-307.

8. Sriburee P, Khayhan S, Khamwan C, Panjaisee S, Tharavichitkul P. Serotype and PCR-fingerprints of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. Mycopathologia, 2004; 158(1): 25-31.
9. Soogarun S, Wiwanitkit V, Palasuwan A, Pradniwat P, Suwansaksri J, Lertlum T, Maungkote T. Detection of *Cryptococcus neoformans* in bird excreta. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2006; 37(4): 768-770.
10. ธันยาการย์ ศรีวรมาศ และธารินีไชยวงศ์. การตรวจหาเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกภายในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2554; 13(4): 14-21.
11. ภัทธกร บุบผัน, อภิสรา โสมทัศน์, พรสวรรค์ จินพุทธ, ณัฐชาติ ประมงคล, อนุกูล ศรีธวัชพงศ์. การตรวจหาเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกภายในบริเวณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 2560; 9(18): 128-135.
12. Poonwan N, Mikami Y, Poosuwan S, Boon-Long J, Mekha N, Kusum M, et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from clinical specimens in Thailand and their susceptibility to various antifungal agents. Eur J Epidemiol, 1997; 13(3): 335-340.
13. Kaocharoen S, Ngamskulrungroj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, Banlunara W, et al. Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex in Thailand. PLoS Negl Trop Dis, 2013; 7(7): e2297.
14. Ashton PM, Thanh LT, Trieu PH, Van Anh D, Trinh NM, Beardsley J, et al. Three phylogenetic groups have driven the recent population expansion of *Cryptococcus neoformans*. Nat Commun, 2019; 10(1): 2035-2044.
15. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. Lancet Infect Dis, 2017; 17(8): 873-881.
16. Tay ST, Lim HC, Tajuddin TH, Rohani MY, Hamimah H, Thong KL. Determination of molecular types and genetic heterogeneity of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in Malaysia. Med Mycol, 2006; 44(7): 617-622.
17. Day JN, Qihui S, Thanh LT, Trieu PH, Van AD, Thu NH, et al. Comparative

genomics of *Cryptococcus neoformans* var. grubii associated with meningitis in HIV infected and uninfected patients in Vietnam. PLoS Negl Trop Dis, 2017; 11(6): e0005628.

18. Krangvichain P, Niyomtham W, Prapasarakul N. Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. J Vet Med Sci, 2016; 78(3): 391-396.
19. Worasilchai N, Tangwattanachuleeporn M, Meesilpavikkai K, Folba C, Kangogo M, Groß U, et al. Diversity and Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Isolates in Thailand. Med Mycol, 2017; 55(6): 680-685.
20. Abulreesh HH, Organji SR, Elbanna K, Osman GEH, Almalki MHK, Abdel-Malek AY, et al. Diversity, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Patterns of Pathogenic and Opportunistic Yeast Species in Rock Pigeon (Columba livia) Fecal Droppings in Western Saudi Arabia. Pol J Microbiol, 2019; 68(4): 493-504.
21. Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, Zaragoza Ó, Almirante B, Cuenca-Estrella M, et al. Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. Med Mycol, 2017; 55(2): 125-136.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภท Basic Research Fund ประจำปีงบประมาณ 2564 สัญญาเลขที่ ววน.7/2564 และงบประมาณส่วนหนึ่งมาจากหน่วยวิจัยด้านนวัตกรรมเซนเซอร์ทางเคมีและชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา (RUSI)