การพัฒนาสูตรอาหารเหลว สำหรับแยกเชื้อวัณโรคจากน้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอด น้ำในช่องท้อง และน้ำในโพรงเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง

นางสาว มะลิ วิโรจน์แสงทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-159-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018327 i 15192325

DEVELOPMENT OF LIQUID MEDIA FOR ISOLATION OF *Mycobacterium tuberculosis* FROM PLEURAL EFFUSION , ASCITIC FLUID AND CEREBROSPINAL FLUID

MISS MALI WIROTESANGTHONG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology
Chulalongkorn University
1992

ISBN 974-581-159-9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Development of Liquid Media for Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from pleural effusion, ascitic fluid and cerebrospinal fluid
By	Miss Mali Wirotesangthong
Department	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Amorn Leelarasamee, M.Med.Sc.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Pintip Pongpech, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree/

Thavorn Vajrabhaya

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Vimolmas Lipipun ..... Chairman

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

Amorn Lee ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Amorn Leelarasamee, M.Med.Sc., Newcastle)

Pintip Pongpech ..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

Saree Virunhaphol ..... Member

(Associate Professor Saree Virunhaphol, M.Sc. in Pharm)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C275368 : ภาควิชาจุลชีววิทยา
คำสำคัญ : เชื้อวัณโรค/ อาหารเหลว/ การแยกเชื้อ

มะลิ วิโรจน์แสงทอง : การพัฒนาสูตรอาหารเหลวสำหรับแยกเชื้อวัณโรค จากน้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอด น้ำในช่องท้อง และน้ำในโพรงเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง อ.ที่ปรึกษา : รศ.นพ.อมร ลีลารัศมี, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร, 120 หน้า
ISBN 974-581-159-9

ในการศึกษาเรื่องการใช้อาหารเหลวในการแยกเชื้อวัณโรค จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่มีเชื้อจำนวนน้อย ได้แก่ น้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอด น้ำในช่องท้อง และน้ำในโพรงเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง พบว่าให้ผลดีกว่าการใช้วิธีเพาะเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในงานประจำ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเหลวมาตรฐานที่มีจำหน่าย พบว่า อาหารเหลว ชื่อ Middlebrook 7H9 เป็นอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งใช้เป็นแบบอย่างในการพัฒนาสูตรอาหารเหลวชนิดใหม่ขึ้นมา ความเข้มข้นของ albumin ในสูตรอาหารเหลวควรมี albumin 5% ส่วนแหล่งของ albumin พบว่า bovine albumin ให้ผลดีกว่า human albumin การเติมยาปฏิชีวนะในอาหารเหลวสูตรพัฒนาไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค และมีประโยชน์ในการลดเชื้อปนเปื้อนเมื่อทำการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย ประสิทธิภาพของอาหารเหลวสูตรพัฒนาในการเลี้ยงเชื้อ M. tuberculosis H37Rv ไม่แตกต่างจากอาหารเหลวสูตรมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่ราคาถูกกว่า คือ เพียงเศษหนึ่งส่วนห้าของราคาของอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน ส่วนการแยกเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจดังกล่าวข้างต้น จำนวน 94 ราย ซึ่งผู้ป่วยถูกวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรค 24 ราย โดยแยกเชื้อวัณโรคได้จากน้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอด 15 ราย, น้ำในโพรงเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง 8 ราย และน้ำในช่องท้อง 1 ราย พบว่าการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเหลวสูตรมาตรฐาน อาหารเหลวสูตรพัฒนาและอาหาร L-J พบว่าผลบวก 8,5 และ 4 ราย ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การแยกเชื้อวัณโรคโดยใช้อาหารเหลวนั้น เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสำหรับแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำ โดยเฉพาะสิ่งส่งตรวจที่มีเชื้อจำนวนน้อย วิธีนี้จึงมีประโยชน์มากกว่าการใช้อาหารแข็งในงานประจำ และถึงแม้ว่าอาหารเหลวสูตรพัฒนาจะมีประสิทธิภาพในการแยกเชื้อวัณโรคต่ำกว่าอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้ก็จะเป็นแนวทางที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการพยายามที่จะพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต มะลิ วิโรจน์แสงทอง
สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อมร ลีลารัศมี
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C275368 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD : MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS / LIQUID MEDIA / ISOLATION
MALI WIROTESANGTHONG : DEVELOPMENT OF LIQUID MEDIA FOR ISOLATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM PLEURAL EFFUSION, ASCITIC FLUID AND CEREBROSPINAL FLUID. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF.AMORN LEELARASAMEE, M.MED.SC. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF.PINTIP PONGPECH, PH.D. 120 PP. ISBN 974-581-159-9

The use of liquid media for isolation of M. tuberculosis from pleural effusion, ascitic fluid and CSF was found to be more efficient than conventional methods. Middlebrook 7H9 medium was selected to be the standard liquid media in the effort to develop a new liquid media in this study.

The developed liquid media should be contained 5% albumin. Bovine albumin was more efficient than human albumin. The addition of antibiotics was not harmful to the growth of this organism and also useful for the decontamination of specimens. The efficacy of the developed liquid media was not significantly difference from the standard liquid media ($P > 0.05$) in culturing M. tuberculosis H37Rv. However, the cost of the developed liquid media was one fifth of that of the standard liquid media. The use of both liquid media for isolation of M. tuberculosis from the specimens were compared with Lowenstein-Jensen (L-J) media. There were twenty-four positive for M. tuberculosis out of the ninty-four specimens. This organism was isolated from fifteen pleural effusions, one ascitic fluid and eight CSF. By using standard liquid media, developed liquid media and L-J media, positive results were obtained in 8,5 and 4 specimens respectively.

In this study, it was confirmed that the use of liquid media was the efficient method for isolation of tubercle bacilli from liquid specimens which contained few organisms and this method was more useful than conventional media. Eventhough, the efficacy of the developed liquid medium was less than that of the standard liquid medium but the results obtained from this study would provide useful informations for further study in this aspect.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต Mali Wirotesangthong

สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Amorn Lee

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Pintip Pongpech

Acknowledgements

I would like to express my deepest appreciation and grateful thanks to my advisor, Associate Professor Amorn Leelarasamee M.Med.Sc. of the Division of Infectious Disease, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University and my co-advisor, Assistant Professor Pintip Pongpech,Ph.D. of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their excellent instruction, encouragement and guidance throughout the course of this thesis.

I also wish to express my sincere thanks to the chairman, Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D., the former Head of the Department of Microbiology and the member of my graduate committee, Associate Professor Saree Virunhaphol of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University for their very useful suggestions and encouragement.

It is a pleasure to emphasize my deep thanks to Lecturer Juree Jearanaisilavong, M.Sc. of the Division of Mycobacteriology, Department of Microbiology, Miss. Suwanna Trakulsomboon, M.Sc., Mrs. Surapee Teinkrim , M.Sc. and Mrs. Kritsana Janyapoon, M.Sc. of the Divison of Infectious Disease, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital , Mahidol University for their kindness, helpful suggestions and providing facility of laboratory.

Finally, a greateful acknowledgement goes to the Chulalongkorn University Graduate School which provided partly support for this thesis.

Content

		Page
Abstract (Thai)		iv
Abstract (English)		v
Acknowledgements		vi
Contents		vii
List of Tables		viii
Abbreviations		x
Chapter		
I	Introduction	1
II	Review of literature	4
III	Meterials and methods	47
IV	Results	56
V	Discussion	75
VI	Conclusion	87
References		89
Appendix		103
Vitae		111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Table		Page
1	Classification of non-Runyon group.....	43
2	Classification of Runyon group.....	44
3	Number of positive AFB staining, positive culture and identify result from various specimens, data from mycobacterial laboratory, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand	46
4	Standardization of *M. tuberculosis* H37Rv inoculum	60
5	Visible colonies of *M. tuberculosis* H37Rv in various formulas of liquid culture media at 17,20,23,26,29 and 32 days	61
6.1	Effect of various concentrations of albumin on visible growth of *M. tuberculosis* H37Rv at various periods incubated in 7H9 liquid media	63
6.2	Efficacy of human albumin, bovine albumin in 7H9 media on growth of *M. tuberculosis* H37Rv compared to L-J media at various incubation periods	64
6.3	Colony count of nine strains of *M. tuberculosis* in 7H9 liquid media with and without antibiotics	64
6.4	Incidence of growth of nine strains of *M. tuberculosis* in liquid media with and without antibiotics	66
6.5	Efficacy of developed liquid media and standard liquid media in supporting the growth of *M. tuberculosis* H37Rv at various inculation periods	67
7.1	The laboratory result of isolation of *M. tuberculosis* from clinical specimens	68
7.2	Distribution of patients with pleural effusion by history, symptomatology and investigated results	69

Table (continue) Page

7.3 Distribution of patients with ascites by history, symptomatology and investigated results 71

7.4 Distribution of patients with suspected tuberculous meningitis by history symptomatology and investigated results 73

7.5 The colonies count of *M. tuberculosis* from clinical specimens and time of visible colonies 75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abbrevations

ADC	=	Albumin-dextrose-catalase
AFB	=	Acid - fast bacilli
BCG	=	Bacillus Calmette Güerin
°C	=	degree celsius
CFU	=	Colony forming unit
CSF	=	Cerebrospinal fluid
ELISA	=	Enzyme - linked immunosorbent assay
g	=	Gram
GPI	=	Guinea - pig inoculation
hr	=	Hour
L,l	=	Litre
L-J	=	Lowenstein-Jensen
μ	=	Micron
μg	=	Microgram
min	=	Minute
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
NALC	=	N-acetyl-L-cysteine
No.,no.	=	Number
OADC	=	Oleic - albumin - dextrose - catalase
PBS	=	Phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
%	=	Percent
RIA	=	Radioimmunoassay
TB	=	Tuberculosis
TBM	=	Tuberculous meningitis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย