5

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่รวดเร็วและวิธีปกติสำหรับจำแนกชนิดเอ็นเตอโรคอคคัสที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และการศึกษาความแม่นยำในวิธีการ

นางสาวจันตนา วโรภาสตระกูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-111-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012966

COMPARATIVE STUDIES BETWEEN RAPID METHODS AND CLASSICAL METHODS FOR IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT YEASTS AND THEIR ACCURACY

MISS CHANTANA WAROPASTRAKUL

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY

GRADUATE SCHOOL CHULALONGKORN UNIVERSITY

1987

ISBN974-568-111-3

Thesis Title	Comparative Study between Rapid Methods and Classical Methods for Identification of Medically Important Yeasts and Their Accuracy
By	Miss Chantana Waropasstrakul
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Kawee Pupaibul, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of graduate school
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Dr. Kriengsag Saitanu, D.V. M., Ph.D.)

Kawee Pupaibul
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Kawee Pupaibul, M.D.)

Angkana Chaiprasert
..... Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Dr. Angkana Chaiprasert, Dr.rer.nat.)

Nongnuch Vanittanakom.
..... Member
(Dr. Nongnuch Vanittanakom, Dr.rer.nat.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง วิธีที่รวดเร็วและวิธีมาตรฐานสำหรับจำแนกชนิดยีสต์ที่สำคัญทางการแพทย์ และการศึกษาความแม่นยำในวิธีการ
ชื่อนิสิต	นางสาวจันตนา วโรภาสตระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กวี ภู่ไพบูลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ
สหสาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา	2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ปัจจุบัน การพิสูจน์ชนิดของยีสต์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีความยุ่งยาก ในกระบวนการเตรียมและดำเนินการของวิธีการทดสอบชนิดต่าง ๆ อีกทั้งเสียเวลาอ่านผลในแต่ละการทดสอบ ถึงแม้ว่าจะมีชุดทดสอบสำเร็จรูป เพื่อการนี้ออกจำหน่ายในเชิงการค้า แต่ก็ยังมีราคาแพงเป็นผลิตภัณฑ์ของต่างประเทศ จึงได้ทำการศึกษาวิธีรวดเร็ว ประหยัดลดขั้นตอนในแต่ละการทดสอบ สามารถทราบผลได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ (assimilation) ของยีสต์ด้วยวิธีมาตรฐาน เปรียบเทียบกับการใช้ microtitor U plate บรรจุอาการเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยดูการเปลี่ยนสีของ indicator พร้อมกับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์อื่น ๆ ได้แก่การสร้างสี จาก L-DOPA บนกระดาษกรอง การทดสอบ ureas และการใช้โปแตสเซียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน ด้วยวิธี swab test การดื้อต่อยา cyclohexiมide การสร้าง germ tube การสร้าง chlamydoconidia และความสามารถเจริญได้ในภาวะเป็นกรด (pH. 1.5) รวมทั้งหมด 7 กลุ่มการทดสอบจากเชื้อยีสต์ทั้งหมด จำนวน 321 ตัวอย่าง ครอบคลุมใน 4 genera 15 species พบว่าเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทุกชนิดตรงกันระหว่างวิธีที่รวดเร็ว และวิธีมาตราฐาน ได้แก่ C. tropicalis, T. glabrata, C. krusei, Tr. cutaneum ($p<0.01$) สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีอื่น ที่ให้ผลเช่นเดียวกับวิธีมาตราฐาน ได้แก่ urease test และการทดสอบนี้ใช้ โปแตสเซียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน ($p<0.01$) นอกจากนี้การสร้างสีจาก L-DOPA มีเชื้อ Cr. neoformans เท่านั้นที่สามารถสร้างสีได้ การดื้อต่อยา cyclohexiมide ที่ความเข้มข้นเท่ากับ

0.1% ของยา C. albicans (97.88%) และ C. tropicalis (11.76%) ดื้อต่อยานี้ การสร้าง germ tube พบว่า C. albicans (98.59%) เท่านั้นที่สามารถสร้าง germ tube ได้ การสร้าง chlamydoconidia ได้ พบว่า C. albicans (92.25%) และ C. tropicalis (1.96%) สามารถสร้าง chlamydoconidia ได้ นอกจากนี้ การทดสอบความสามารถในการเจริญ ในภาวะเป็นกรด พบว่า C. albicans (90.85%) และ C. parapsilosis (11.11%) สามารถเจริญได้ในภาวะเป็นกรด

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ วิธีที่รวดเร็วทุกการทดสอบ ให้ผลเช่นเดียวกับวิธีมาตราฐาน ยกเว้น การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล ซึ่งให้ผลตรงกันเฉพาะในเชื้อบาง species ดังนั้นควรจะได้มีการศึกษาการทดสอบนี้ต่อไป และการทดสอบด้วยวิธีรวดเร็วอื่น ๆ เช่น การสร้างสีจาก L-DOPA บนกระดาษกรอง สามารถนำมาจำแนกเชื้อ Cr. neoformans ได้อย่างถูกต้อง การทดสอบการดื้อยา cycloheximide การสร้าง germ turb การสร้าง chlamydoconidia และความสามารถเจริญได้ในสภาวะเป็นกรด สามารถนำมาใช้ในการจำแนก C. albicans ได้อย่างดี จากการศึกษาดังกล่าว วิธีการทดสอบที่รวดเร็วบางประการสามารถนำมาแทนวิธีมาตราฐานเพื่อใช้ในแผนภูมิการแยกชนิดของยีสต์ที่สำคัญทางการแพทย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Compartive Study between Rapid Methods and Classical methods for Identification of Medically Important Yeasts and Their Accuracy.
Name	Miss Chantana Waropastrakul
Thesis Advisor	Associate Professor Kawee Pupaibul, M.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Dr.Angkana Chaiprasert,Dr.rer.nat.
Inter-Department	Medical Microbiology
Academic Year	1986

ABSTRACT

Currently, a definite identification of medically important yeasts requires knowledge of the results of many tests. All of these tests are time consuming. Anyhow, commercial produced test-kits are available enabling to solve the above problems. However, only few of routine diagnostic laboratories in developing countries afford the price. Hence, there are efforts to promote the study of a rapid, low-cost identification method. In this study, the application of basic physiological and biochemical knowledge is necessary. Such knowledge concerns the growth of different types of yeasts needed the assimilation of different types of sugar. Here, the growth media containing particular type of sugar with indicator were located in microtiter U plate. Hence, the assimilation of the sugar was indicated, thus the pattern cculd be compaired with the standard method (auxanography). Apart from assimilation test, the others such

the color production form L-DOPA paper strip test, the urease test and the assimilation of potassium nitrate as a nitrogen source by swab test, the germ tube test, the chlamydoconidia production test, acidic growth test (pH 1.5), and the resistance to cycloheximide were included in the study. From 321 specimens covering 5 genera and 15 species there were 4 species giving the same result between the rapid method and the standard method ($p<0.01$). Urease test and the nitrate assimilation test also yield results which were comparable, with the standard method ($p<0.01$). Color production test could be only detected for Cr. neoformans. The cycloheximide resistance test at the concentration of 0.01% gave a result that C. albicans (97.88%) and C. tropicalis (11.76%) resisted to growth. Only C. albicans (98.59%) produced germ tube. Chlamydoconidia were observed in C. albicans (92.25%) and C. tropicalis (1.96%). The acidic growth test was performed and resulted that C.albicans (90.85%) and C. parapsilosis (11.11%) were capable to grow.

All the rapid identification methods mentioned above are the result comparable with the standard methods; except only some results of the rapid sugar assimilation test were agreeable with auxanographic method. Therefore, further study is recommended. Further, the color production of L-DOPA could be used to differentiate Cr. neoformans accurately. The differentiation of C. albicans could be performed by using either cycloheximide resistance, germ tube test, chlamydoconidia production test, or acidic growth test.

Finally, the modified flow chart for yeast identification is presented.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thank to Associate Professor Dr. Kawee Pupaibul, Head Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor for his invaluable support, advice and all facility provided in this thesis.

I fell greatfully indebted to Assistant Professor Dr. Angkana Chaiprasert, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, my co-adviser, for her advice, guidance, providing the tested organism and encouragement during this study.

Special thank to Assistant Professor Ariya Chindamporn on her helpful advice, providing the tested yeast during my work.

The author also special thank to Assistant Professor Orawan Naweepab for giving some isolates of Cryptococcus neoformans.

Unforgetable thank are also due to Dr. Kreangsak Saythanu and Dr. Nungnuch Wanithanakom who are kindly served in this thesis committee.

Thanks are also due to Mr. Pramote Sirirote my former advisor at Kasertsart University for his kindness provided some material used in this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thanks are also due to Miss Somrat Chanrit for her kindness suggested me on the statistical method.

Thanks to Graduate School and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for providing grant and support all equipment in this research.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

page

THAI ABSTRACT IV

ENGLISH ABSTRACT.....VI

ACKNOWLEDGEMENT.....VIII

LIST OF TABLES.....XII

LIST OF FIGRUES.....XIII

LIST OF DIAGRAMS.....XIII

LIST OF CHART.....XIII

ABBREVIATION.....XIV

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

1. Review of Literature.....4

1.1 Yeast as the Normal Flora and Saprophytes.....4

1.2 Clinical Significances.....7

1.3 Mechanism of Pathogenesis.....9

1.4 Classification and Identification of Medically Important Yeasts.....13

II. MATERIALS AND METHODS.....20

1. Organism.....20

2. Identification Methods.....21

2.1 Classical Methods.....22

2.1.1 Assimilation test.....22

2.1.2 Fermentation test.....23

2.1.3 Urease test.....25

CONTENT (continue)

page

2.1.4 Nitrate assimilation test.....26
2.1.5 Surface film production test.....27
2.1.6 Temperature tolerance.....27
2.2 Rapid Methods.....28
2.2.1 Assimilation test.....28
2.2.2 Germ tube test.....29
2.2.3 Urease swab test.....32
2.2.4 Nitrate swab test.....33
2.2.5 Chlamydoconidia formation test.....35
2.2.6 Cycloheximide resistance test.....36
2.2.7 L-DOPA paper strip test.....36
2.2.8 India ink-preparation.....37
2.2.9 Growth in acidic pH broth test.....38
III. RESULTS.....39
IV. DISCUSSTION AND CONCLUSION.....60
REFERENCES.....68
APPENDIX.....79
BIOGRAPHY.....95

LIST OF TABLES

Table page

1 Human yeast pathogens.....10

2 Identification of tested strains.....40

3. Characteristic of standard strains.....44

3.1 Characteristic of standard strains (Sugar fermentation)..... 45

3.2 Characteristic of standard strains (Sugar assimilation).....46

4 Results of classical and rapid carbohydrate assimilation test.....47

4.1 Result for C. albicans.....48

4.2 Result for C. tropicalis.....49

4.3 Result for T. glabrata.....50

4.4 Result for C. parapsilosis.....51

4.5 Result for Cr. neoformans.....52

4.6 Result for Tr. cutaneum.....53

4.7 Result for Rh. graminis.....54

5 Result of other rapid methods with classical methods.....57

6 The recommended carbohydrate for differentiate yeasts in the genus Candida and Torulopsis glabrata.....67

LIST OF DIAGRAM

Diaqram page

1. Pattern of carbohydrate in microtiter plate.....29

LIST OF FIGURES

Figures page

1. Pattern of carbohydrate paper disc in auxanographic test....24
2. Rapid carbohydrate assimilation test in microtiter plate....31
3 Reaction of rapid carbohydrate assimilation test.....31
4 Reaction of rapid urease test.....34
5 Reaction of rapid nitrate assimilation test.....34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF CHART

Chart page

1. The recommended chart for identification of medically important yeasts.....66

ABBREVIATION

C.	=	Candida
Cr.	=	Cryptococcus
G.	=	Geotrichum
T.	=	Torulopsis
Tr.	=	Trichosporon
Rh.	=	Rhodotorula
sp.	=	Species
Nx	=	Normality
°C	=	Degree Celcieous
∝	=	Alpha
β	=	Beta
ml	=	Millilitre
no	=	Number
mm	=	Millimetre
gm	=	Gram
DMSO	=	Dimethylsulfoxide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย