

THESIS TITLE Study of Morphological and Biochemical Characteristics of Trichophyton rubrum in Relation to Drug Sensitivity

NAME Miss Payom Benyakun

THESIS FOR Master of Science in Microbiology
Chiang Mai University 1986

ABSTRACT

Dermatomycoses at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital and Chiang Mai Christian Clinic were investigated during April 1984 to May 1985. Trichophyton rubrum was the most frequently found as causative agent (73.03%). Sixty-five isolates of T. rubrum were isolated from 15 cases of tinea corporis, 15 of tinea manuum, 11 of tinea cruris, 5 of tinea unguium, 5 of tinea pedis and 14 of multiple lesions. About 40% of all isolates infected the patients for a period of less than one year but 60% infected the patients for one or more years. Eleven and 3 isolates were not able to produce red pigment on Cornmeal dextrose agar and Potato dextrose agar, respectively. Macroscopic characteristics of T. rubrum isolates on Mycosel agar plates for 15 days at room temperature (25° - 30°c) were also investigated. Most of T. rubrum isolates produced red pigment. Brown pigment producing isolates were second most frequently found. Only 3 isolates produced yellow pigment. The mostly found colonial texture was velvet (60%). The rest of them formed powdery, fluffy and glabrous texture in 15.38%, 12.31% and 12.31%, respectively. Most isolates formed radial furrows on the colonial surface. Average diameter of colony on Mycosel agar after culturing at room temperature for 15 days was 2.8 cm. According to microscopic characteristics, most of T. rubrum isolates produced conidia

within 3 days. The microscopic appearance of predominant microconidia (group 1) was found in 44.61% and the appearance of numerous microconidia and macroconidia (group 2) was found in 12.31%. However, 43.08% had almost sterile hyphae (group 3). With respect to biochemical characteristics, most of the isolates assimilated glycerol and sorbitol except arabinose. Furthermore, most of isolates produced lipase enzyme and liquefied gelatin but not hydrolysed casein in vitro.

According to macroscopic characteristics, most isolates of tinea pedis produced brown pigment with powdery colony and absence of radial furrow on Mycosel agar while isolates of other sites produced red pigment with velvety colony and presence of radial furrows. The isolates of microscopic appearance group 1 were found in tinea unguium whereas those of group 2 and group 3 were found in almost every sites of lesion. According to biochemical characteristics, more isolates of tinea unguium could hydrolyse casein and liquefy gelatin than those of other sites. However, all characteristics of isolates from lesions of shorter duration were similar to those of longer duration.

In vitro drug responsiveness of 65 isolates showed that they were most sensitive to tolclate in Tolmicen[®] cream with the mean of 0.010 µg/ml. They were variable sensitive to ketoconazole in Nizoral[®] tablet, clotrimazole in Canesten[®] solution, miconazole nitrate in Daktarin[®] cream, griseofulvin in Fulcin[®] tablet and ciclopirox olamine in Batrafen[®] cream with the mean MIC of 0.601, 0.184, 0.367, 1.513 and 33.901 µg/ml, respectively.

Tolclate sensitive *T. rubrum* isolates were obtained from tinea unguium and multiple lesions. They produced yellow pigment with glabrous texture on Mycosel agar and not produced red pigment on Potato dextrose agar. These isolates produced

conidia within 3 days and assimilated only sorbitol but not produced lipase enzyme. Meanwhile, isolates of more sensitive to ketoconazole were obtained from tinea pedis and tinea corporis. They also produced yellow pigment on Mycosel agar and not produce red pigment on Potato dextrose agar. Microscopic appearance of these isolates was group 2. Furthermore, they did not hydrolyse casein. Isolates of more sensitive to clotrimazole were obtained from lesions of shorter duration. They produced red pigment on Potato dextrose agar and showed microscopic appearance group 2. These isolates were able to assimilate glycerol. Isolates of more sensitive to miconazole nitrate produced conidia within 3 days and showed microscopic appearance group 2 with the ability to liquefy gelatin. Isolates of more sensitive to griseofulvin produced yellow pigment with glabrous or fluffy colony on Mycosel agar. They did not produced red pigment on Potato dextrose agar. These isolates did not assimilate glycerol and not produce lipase enzyme. They, however, liquefied gelatin.

It was also found that pH of media affected MIC of clotrimazole, miconazole nitrate, ketoconazole and ciclopirox olamine. These drugs were more effective at alkaline pH(8.0) than neutral(7.0) and acid pH(5.8). But pH of media did not affect MIC of tolclate and griseofulvin. It was also found that 0.025% fluocinolone acetonide increased antifungal activity of griseofulvin against *T. rubrum* but fluocinolone acetonide at 0.001%, 0.010% and 0.025% did not affect sensitivity of this organism against other tested drugs.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษาคุณสมบัติทางกายรูปวิทยาและชีวเคมีของ Trichophyton rubrum ที่เกี่ยวข้องกับความไวของเชื้อค่อยา

ผู้เขียน

นางสาวไพยม เบญญากุล

วิทยานิพนธ์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2529

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อราจากผู้ป่วยที่เป็นโรคกลากที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และ เชียงใหม่คริสเตียนคลินิก ระหว่างเดือนเมษายน 2527 ถึงเดือนพฤษภาคม 2528 พบเชื้อ Trichophyton rubrum เป็นสาเหตุของโรคนี้มากที่สุด (73.03%) เชื้อ T. rubrum จำนวน 65 ไอโซเลตแยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคกลากประเภทที่เนียบอร์ปอริส 15 ราย ที่เนียบนุอัม 15 ราย ที่เนียบครูริส 11 ราย ที่เนียบอันเจียม 5 ราย ที่เนียบทีดิส 5 ราย และมัลติเปิ้ลลีชั่น 14 ราย ประมาณ 40 % ของไอโซเลตทั้งหมดแยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้เป็นเวลานานน้อยกว่า 1 ปี และ 60% ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคในระยะเวลายาวกว่า 1 ปี มีเชื้ออยู่ 11 ไอโซเลต และ 3 ไอโซเลตที่ไม่สร้างสีแดงบนวุ้นคอนนัลเคโคโรส และไปเคโคโคโคโรสตามลำดับ ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติที่เห็นคล้ายตาเปล่าของเชื้อที่เลี้ยงบนจานที่มีวุ้นมายโคเซลนาน 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25°- 30°ซ.) พบว่าส่วนมากของ T. rubrum ไอโซเลต สร้างสีแดง ร่องลงมาคือสีน้ำตาล และมีเพียง 3 ไอโซเลตที่สร้างสีเหลืองบนวุ้นชนิดนี้ ลักษณะของเนื้อโคโลนีที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้คือเนื้อกำมะหยี่ (velvet) ซึ่งพบจำนวน 60% ไอโซเลต ที่เหลือมีเนื้อแบบเป็นผง (powdery) แบบฟู (fluffy) และแบบเรียบ (glabrous) โดยพบในจำนวน 15.38%, 12.31% และ 12.31% ตามลำดับ ไอโซเลตส่วนมากจะมีร่องบนผิวโคโลนี และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนี 2.8 เซนติเมตร หลังจากเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 15 วัน จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า

ไอโซเลทส่วนมากสร้างโคนิเดียภายใน 3 วัน และลักษณะที่ปรากฏจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีไมโครโคนิเดียเป็นจำนวนมาก (ลักษณะกลุ่มที่ 1) ส่วนใหญ่พบในเชื้อจำนวน 44.61% ลักษณะที่มีทั้งไมโครโคนิเดียและแมโครโคนิเดียเป็นจำนวนมาก (ลักษณะกลุ่มที่ 2) ซึ่งพบในเชื้อจำนวน 12.31% อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวน 43.08% ที่พบแต่ไฮฟาซึ่งไม่ค่อยมีไมโครโคนิเดียหรือแมโครโคนิเดีย (ลักษณะกลุ่มที่ 3) จากคุณสมบัติทางชีวเคมีของ เชื้อนี้ พบว่าเชื้อส่วนมากใช้กลีเซอรอล และซอร์บิทอลเป็นอาหารได้ แต่ไม่สามารถใช้อะราบิโนสได้ นอกจากนี้เชื้อส่วนมากสร้างเอนไซม์ไลเปส และทำให้เจลาตินเหลวได้ แต่ส่วนมากไม่สามารถไฮโดรไลส์เคซีอินได้

จากคุณสมบัติที่เห็นได้ชัดว่า ไอโซเลทที่ได้จากทีเนียบัตติสส่วนมากสร้างสีน้ำตาล มีเนื้อเป็นผงและไม่มีร่องบนผิวโคโลนี เมื่อเลี้ยงบนวุ้นมายโคเซล ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากตำแหน่งอื่นมักจะสร้างสีแดงและมีเนื้อแบบกำมะหยี่ และมีร่องบนผิวโคโลนี จากลักษณะที่ปรากฏจากกล้องจุลทรรศน์พบว่าในไอโซเลทจากทีเนียบัตติส เจ็มพบเฉพาะลักษณะของกลุ่มที่ 1 ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกจากตำแหน่งอื่นมีลักษณะที่ปรากฏจากกล้องจุลทรรศน์ของลักษณะของกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ด้วย จากคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าไอโซเลทจากทีเนียบัตติส เจ็มสามารถไฮโดรไลส์เคซีอิน และทำให้เจลาตินเหลวได้มากกว่าเชื้อที่แยกได้จากตำแหน่งอื่น อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของไอโซเลทที่แยกได้จากแผลที่เป็นโรคน้อยกว่า 1 ปี เหมือนกับไอโซเลทที่แยกได้จากแผลที่เป็นโรคไม่น้อยกว่า 1 ปี

การตอบสนองต่อยาเมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่าเชื้อนี้ไวต่อยาทอลซีเคลทในทอลมิ เช่นครีมมากกว่าชนิดอื่น โดยมีค่าเฉลี่ยของ MIC 0.010 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อชนิดนี้มีความไวต่อยาซิโคโคนาโซลในยาเม็คโนโซรัล โคลโดรมาโซลในสารละลายคาเนสเตน ไมโคนาโซลในครีมในคาคทารินครีม กริซิโอฟูลวินในยาเม็คฟูลซัน และไฮโคลไพร์อกโอดามีนในมาทราเฟนครีมด้วยค่าเฉลี่ย MIC 0.601 0.184 0.367 1.513 และ 33.901 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ไอโซเลทซึ่งค่อนข้างไวต่อทอลซีเคลทแยกได้จากทีเนียบัตติส เจ็ม มีลติ เบิ้ลลิซัน และเชื้อเหล่านี้มักจะสร้างสีเหลืองและมีโคโลนีเรียบบนวุ้นมายโคเซล แต่เชื้อนี้มักจะไม่ใช่สีแดงบน

วุ้นไปเต้โคโคโตรส เชื้อเหล่านี้สร้างโคโคนิเดียภายใน 3 วัน และใช้ซอร์บิทอล เป็นอาหารแต่ไม่ใช้กลีเซอรอล และไม่ย่อยสร้างเอนไซม์ไลเปส ในขณะที่ไอโซเลทซึ่งค่อนข้างไวต่อคีโตโคนาโซล ได้จากที่เนี่ยทีคิสและที่เนี่ยคอร์ปอริส เชื้อเหล่านี้สร้างสี เหลืองบนวุ้นมายโคเซลและไม่สร้างสีแดงบนวุ้นมายโคเซล ลักษณะที่ปรากฏในกล้องจุลทรรศน์ของ เชื้อนี้ส่วนใหญ่พบลักษณะของกลุ่มที่ 2 นอกจากนี้เชื้อเหล่านี้มักจะไม่ใช่โครไลส์เคซิอิน แต่ไอโซเลทที่ค่อนข้างไวต่อโคลโคโรมาโซล แยกได้จากผลแบบเฉียบพลัน และสร้างสีแดงบนวุ้นไปเต้โคโคโตรส เชื้อเหล่านี้มีไมโครโคโคนิเดีย และแมคโครโคโคนิเดียเป็นจำนวนมาก และเชื้อเหล่านี้สามารถใช้กลีเซอรอล เป็นอาหารได้ ไอโซเลทซึ่งค่อนข้างไวต่อไมโคนาโซลในเตรทสร้างโคโคนิเดียภายใน 3 วัน และมีลักษณะที่ปรากฏจากกล้องจุลทรรศน์ เป็นกลุ่มที่ 2 นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เจลาตินเหลวได้ ไอโซเลทซึ่งค่อนข้างไวต่อกรีซีโอฟูลวินสร้างสีเหลืองและมีโคโลนีเรียบ หรือฟูบนวุ้นมายโคเซล และเชื้อเหล่านี้ไม่ย่อยสร้างสีแดงบนวุ้นไปเต้โคโคโตรสและไม่ใช้กลีเซอรอล เป็นอาหาร แต่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส และทำให้เจลาตินเหลวได้

ความเป็นกรดต่างของอาหารมีผลต่อการหาค่า MIC ของ *T. rubrum* ไอโซเลท ค่อยาโคลโคโรมาโซล ไมโคนาโซลในเตรท คีโตโคนาโซลและไซโคลไพร์อก ไอลามิน ยาเหล่านี้ยับยั้งเชื้อที่พีเอชเป็นค่า (8.0) ได้ดีกว่าที่พีเอชเป็นกลาง (7.0) และเป็นกรด (5.8) แต่ความเป็นกรดต่างของอาหารไม่มีผลต่อการหาค่า MIC ของทอลซีเคิลทและกรีซีโอฟูลวิน และยังพบว่า 0.025% ของฟลูออซิโนโลนอะเซทโคโคไนด์จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ต่อต้าน เชื้อ *T. rubrum* ของยากรีซีโอฟูลวิน แต่ฟลูออซิโนโลนอะเซทโคโคไนด์ที่ความเข้มข้น 0.001% 0.01% และ 0.025% ไม่มีผลต่อความไวของ เชื้อค้อยาชนิดอื่น