

การเหนี่ยวนำการสร้างสาหร่ายราในหลอดทดลองของเชื้อ *Malassezia* species ที่แยกได้จาก
ผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดี

Induction of Fungal Filament Synthesis *in vitro* of *Malassezia* Species Isolated from
Pityriasis Versicolor Patients and Healthy Subjects

เพราพิลาศ อินตะยศ (Proawpilart Intayot)* สิริดา ชังฉิม (Sirida Youngchim)**

นงนุช วนิตยธนาคม (Nongnuch Vanittanakom)***

บทคัดย่อ

การศึกษาก่อโรคของเชื้อ *Malassezia* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคเกลื้อนจำเป็นต้องกระตุ้นให้มีการสร้างสาหร่ายราในหลอดทดลอง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เชื้อ *Malassezia* spp. ที่แยกได้จากรอยโรคที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อนและผิวหนังของคนสุขภาพดีให้มีการสร้างสาหร่ายราในหลอดทดลอง โดยสามารถแยกเชื้อ *Malassezia* จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 8 คนและจากคนสุขภาพดีจำนวน 165 คน นำมาแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี biochemical test และวิธี PCR amplification ซึ่งผลการแยกชนิดพบเชื้อ *M. furfur* (n=6) และ *M. globosa* (n=2) จากผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อน ในขณะที่ผิวหนังของคนสุขภาพดีพบเชื้อ *M. sympodialis*(46.06%), *M. furfur* (40.00%), *M. dermatis* (9.09%), *M. slooffiae*(3.64%) และ *M. japonica*(1.21%) สำหรับการศึกษาการสร้างสาหร่ายราในหลอดทดลองของเชื้อ *M. furfur* พบมีการสร้างสาหร่ายรา 39% (28 จาก 72 isolates) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Minimal medium ที่มี 1mM L-DOPA ร่วมกับ 2,000 µg/ml kojic acid บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะ Microaerophilic เป็นระยะเวลา 5-7 วัน

ABSTRACT

To study pathogenicity of *Malassezia*, the causative agent of pityriasis versicolor, it is necessary to obtain the hyphae form *in vitro*. The aim of this research was to determine the optimal condition that induced filament production *in vitro* of *Malassezia* species isolated from pityriasis versicolor patients and healthy subjects. *Malassezia* spp. was collected from 8 patients with pityriasis versicolor and 165 healthy volunteers. Differentiation of *Malassezia* spp. was performed by using biochemical test and PCR amplification. The result showed that *M. furfur* (n=6) and *M. globosa* (n=2) were isolated from lesional skin of pityriasis versicolor. In addition, the most frequently isolated species in healthy skin were *M. sympodialis*(46.06%), *M. furfur*(40.00%) following by *M. dermatis*(9.09%), *M. slooffiae*(3.64%) and *M. japonica*(1.21%). To investigate the filament induction *in vitro*, 39% (28 in 72 isolates) of *M. furfur* was capable to produce filament when inoculated in Minimal medium with 1mM L-DOPA and 2,000 µg/ml kojic acid under microaerophilic condition for 5-7 days at 30°C.

คำสำคัญ: โรคเกลื้อน การสร้างสาหร่ายราในหลอดทดลอง

Key Words: Pityriasis versicolor, Filament production *in vitro*

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

โรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor) หรือ Tinea versicolor เป็นโรคผิวหนังเกิดจากการติดเชื้อ *Malassezia* spp. พบที่บริเวณผิวหนังด้านนอกชั้น stratum corneum (Adamski *et al.*, 1995) ลักษณะของโรคเกลื้อนจะมีผื่นที่ผิวหนังรูปวงกลมหรือวงรี ลักษณะแบนราบมีขอบเขตชัดเจน ผิวลักษณะของผื่นจะไม่เรียบ มีลักษณะเป็นขุยละเอียดมีสีจางหรือเข้มกว่าสีของผิวหนังปกติ และพบได้มากบริเวณด้านบนของลำตัว คอและแขน (Marcon *et al.*, 1992) โรคนี้มีรายงานพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะบริเวณที่มีภูมิอากาศร้อนชื้นจะพบความชุกของโรคได้มากกว่าบริเวณที่มีภูมิอากาศหนาวเย็น (Hellgren *et al.*, 1983; Acosta *et al.*, 2004) โดยพบว่าเชื้อ *M. globosa* เป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในโรคเกลื้อน (Nakabayashi *et al.*, 2000; Aspiroz *et al.*, 2002; Morishita *et al.*, 2006) ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อ *Malassezia* spp. เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) บนผิวหนังของคนและสัตว์เลื้อยคลาน (Leeming *et al.*, 1989) เมื่อมีปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญได้มากขึ้น เช่น การมีอุณหภูมิสูง, การมีเหงื่อออกมากกว่าปกติ โดยปัจจัยเหล่านี้จะทำให้เชื้อเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์ยีสต์รูปร่างกลมรีที่พบเป็น normal flora บนผิวหนังให้มีการงอกเป็นสาขารวมพบได้บริเวณรอยโรคบนผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเกลื้อนในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้โดยใช้ขุยผิวหนังบริเวณผื่นเป็นตัวอย่างในการตรวจ นำมาหยดด้วย KOH แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์ยีสต์อยู่ร่วมกับสาขารูปท่อนสั้นๆ เรียกลักษณะนี้ว่า spaghetti and meat ball (Faergemann, 1994) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่มีไขมัน พบว่าเชื้อที่เจริญบนอาหารมีลักษณะเป็นอีสต์โคโลนีและเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์ยีสต์เท่านั้นแต่ไม่พบลักษณะสาขาท่อนสั้นๆ ดังที่พบบนรอยโรคที่ผิวหนัง (Marcon *et al.*, 1992) ดังนั้นการสร้างสาขารวมเชื้อ *Malassezia* spp. พบได้เฉพาะบริเวณรอยโรคที่ผิวหนังเท่านั้น (Tosti *et al.*, 1972) ซึ่งในการศึกษาของ Salkin และ Gordon (ค.ศ.

1977) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. orbicularis* (*M. furfur*) ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนลงบนอาหาร Sabouraud glucose agar ที่เติม olive oil ทำให้เชื้อ *P. orbicularis* งอกเป็นสาขารวมได้และถ้าเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. orbicularis* และ *P. ovale* ลงบนอาหารร่วมกับ cholesterol และ cholesteryl stearate สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสาขารวมได้ร้อยละ 20 (Nazzaro-Porro *et al.*, 1977) ต่อมาได้มีการเติมกรดอะมิโนไกลซีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อ *P. orbicularis* สาขารวมมาตรฐานจำนวน 3 สาขารวมงอกสาขารวมโดยมีร้อยละการสร้างสาขารวมเท่ากับ 0.25, 2.85 และ 2.90 (Dom *et al.*, 1977) นอกจากนี้แล้วได้มีการพัฒนาวิธีการเพิ่มอัตราการสร้างสาขารวมโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. orbicularis* และ *P. ovale* ในอาหารที่มีส่วนประกอบของเซลล์ผิวหนังของ stratum corneum และนำไปบ่มเพาะเลี้ยงในสภาวะ microaerophilic ทำให้มีการสร้างสาขารวมสูงขึ้นเป็นร้อยละ 24 (Faergemann *et al.*, 1989) ซึ่งการชักนำการสร้างสาขารวมของเชื้อ *Malassezia* spp. โดยการใช้เซลล์ผิวหนังของ stratum corneum เป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยากและไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ทั่วไป

ต่อมา Saadazadeh *et al.* (2001) ได้พัฒนาอาหาร Mycelial culture medium เพื่อชักนำการสร้างสาขารวมของ *Malassezia* spp. โดยใช้เชื้อที่แยกได้จากรอยโรคที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อนและผิวหนังของคนปกติพบว่าเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถชักนำให้สร้างสาขารวมได้ ในขณะที่เชื้อที่แยกจากผิวหนังคนปกติไม่พบการสร้างสาขารวม อีกทั้งยังพบว่าเมื่อนำเชื้อที่สร้างสาขารวมมาทำการ subculture มากกว่า 1 ครั้งจะทำให้ร้อยละการสร้างสาขารวมลดลง แสดงได้ว่าที่สภาวะนี้ไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้สร้างสาขารวม และในการศึกษาของ Youngchim *et al.* (2013) พบว่าเมื่อใช้ L-DOPA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเมลานินของเชื้อ *M. furfur* ร่วมกับ kojic acid ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสร้าง DOPA ในอาหาร Minimal medium agar สามารถกระตุ้นให้เชื้อ *M. furfur* NBRC 0656 สร้างสาขารวมได้แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาในเชื้อ *Malassezia* spp. อื่นๆ ที่เป็นเชื้อสาเหตุของการเกิดโรคเกลื้อน ดังนั้นการกระตุ้นให้เชื้อ *Malassezia* spp. สร้าง

สาขารานหลอดทดลองจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาการก่อโรคที่ผิวหนังได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เชื้อ *Malassezia* spp. ที่แยกได้จากรอยโรคที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อนและผิวหนังของคนสุขภาพดีให้มีการสร้างสาขารานหลอดทดลอง

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจากรอยโรคที่ผิวหนังผู้ป่วยโรคเกลื้อนจากคลินิกโรคผิวหนังโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่และตัวอย่างเชื้อของผู้ที่มีสุขภาพดีในช่วงระยะเวลาปี 2553-2556 ซึ่งได้เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 8 คนและคนสุขภาพดีจำนวน 165 คน โดยนำขุยที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อนและตัวอย่างจากผิวหนังปกติที่เก็บด้วยวิธี scotch tape มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร modified Dixon agar แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CHROM agar

ทำการตรวจคัดกรองเชื้อ *Malassezia* spp. เพื่อแยกจากเชื้อ normal flora ชนิดอื่นด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar ลงบน CHROM agar ที่เติม tween 40 ลงไป (Kaneko *et al.*, 2007) นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าของอาหาร โดยเชื้อ *Malassezia* spp. จะมีโคโลนีสีชมพู ผิวหน้าขุ่น ทำให้สามารถจำแนกลักษณะเด่นนี้จากเชื้อยีสต์ชนิดอื่นๆ ได้ อีกทั้งสามารถแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. โดยสังเกตการเกิดตะกอน (precipitate production) ของสีที่บริเวณโคโลนีของเชื้อบนอาหาร

การแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี Biochemical test (Guého *et al.*, 2010)

1. การเจริญบนอาหาร Sabouraud dextrose

agar

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Malassezia* spp. บนอาหาร Sabouraud dextrose agar แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร

2. การสร้างเอนไซม์ Catalase

ใช้ห้วงเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดแล้วหยด 3% hydrogen peroxide ลงไปโดยผลบวกจะพบฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งเชื้อ *Malassezia* spp. ทุกสายพันธุ์จะให้ผลบวกยกเว้นเชื้อ *M. restricta* ที่ให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์ catalase

3. การทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase

ใช้เข็มเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้น stab ลงบน esculin agar tube นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยผลบวกพบ esculin agar tube เปลี่ยนเป็นสีดำ ในขณะที่ผลลบไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

4. การใช้ Tweens 20, 40, 60, 80 และ

Cremophor EL

ใช้ห้วงเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ลงใน sterile deionized water ปรึบความขุ่นเท่ากับ McFarland standard number 3.0 จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายที่มีเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรกับอาหาร Sabouraud dextrose agar ปริมาตร 18 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน Petri dish ขนาด 9 มิลลิเมตรแล้ว

เจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลุม เพื่อหยด Tween 20, 40, 60 และ 80 ตาม เจ็มนาฬิกาและหลุมตรงกลางสำหรับ Cremophor EL หลังจากนั้นหยดสารแต่ละชนิดปริมาณ 15 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน

การสกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อ *Malassezia* spp.

เลี้ยงเชื้อ *Malassezia* spp. ลงบนอาหาร modified Dixon broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วันแล้วนำเชื้อทั้งหมดมาสกัด DNA โดยปั่นล้างเซลล์ ด้วย PBS ที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ใส่ microtube ที่มี lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulphate) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ glass bead ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร นำไปเข้า เครื่อง mini-beadbeater ที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 30 วินาที, 60 วินาที และ 40 วินาทีตามลำดับ เมื่อเซลล์ แตกแล้วจึงทำการสกัด DNA โดยนำไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูด สารละลายใสด้านบนจำนวน 300-400 ไมโครลิตรใส่ หลอด microtube ใหม่ โดยระวังไม่ให้มีตะกอนปน ขึ้นมา จากนั้นเติม phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของสารละลายแล้ว vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาดูด สารละลายด้านบนใส่หลอด microtube ใหม่โดยระวัง ไม่ให้มีตะกอนปน จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายแล้วเติม absolute ethanol จำนวนสองเท่าของปริมาตร ผสมให้ เข้ากันจากนั้นนำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลาย ด้านบนทิ้งแล้วเติม 70% ethanol (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรและ 400 ไมโครลิตร

ตามลำดับ นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีแล้วดูดสารละลายด้านบนทิ้ง จากนั้น เปิดฝา microtube ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้ง แล้วเติม nuclease free water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณ DNA ด้วยค่าดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (OD_{260}) ปรับความเข้มข้น DNA ให้มี ปริมาณ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตรด้วย nuclease free water

การทำ PCR amplification เพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp.

นำ DNA ที่สกัดแล้วมาตรวจยืนยันชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี PCR amplification โดยใช้ primers จำนวน 2 คู่ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ intergenic spacer หรือ internal transcribed spacer (ITS) ของยีน rRNA โดยมีรายละเอียดของ primers (ตารางที่ 1) ซึ่งการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR amplification จะ ใช้ *Taq* DNA polymerase เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ทำโดยตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่ม ปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบ ดังนี้ ขั้นที่ 1 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 2 Annealing ที่ อุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 3 Extension ที่ อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที ทำทั้ง 3 ขั้นตอน จำนวน 30 รอบ เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์สามารถ ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 ชุด primers ที่ใช้ในการทำ PCR amplification เพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp.

Primer name	Nucleotide sequences (5'→3')	Length of product (bps)	reference
<i>M. dermatis</i> M.d-F M.d-R	CGCACCTTGCGCTCCATGGT AGCCTGGTTTCCCAGGCAGCGG	136	Morishita <i>et al.</i> , 2006
<i>M. furfur</i> M.f-F 5.8S-R	CTACTCGCGTACAACGTCTCTG TTCGCTGCGTTCTTCATCGA	230	Affes <i>et al.</i> , 2009
<i>M. globosa</i> M.g-F 5.8S-R	CAATAAGTGTGTCTCTGCGG TTCGCTGCGTTCTTCATCGA	270	Affes <i>et al.</i> , 2009
<i>M. japonica</i> M.j-F M.j-R	CGTATGTGGATCTTATCCTAT TGACTAGTGTCGTAGGCACGGTA	218	Morishita <i>et al.</i> , 2006
<i>M. obtusa</i> M.ob-F 5.8S-R	ACCCGTGTGCACACTGTTGAG TTCGCTGCGTTCTTCATCGA	180	Sugita <i>et al.</i> , 2001
<i>M. restricta</i> M.re-F M. rt-R	CTTGTTGGACCGTCACTGG TTCGCTGCGTTCTTCATCGA	320	Affes <i>et al.</i> , 2009
<i>M. slooffiae</i> M.sl-F 5.8S-R	ACGCACGCTAACACAACGTG TTCGCTGCGTTCTTCATCGA	230	Sugita <i>et al.</i> , 2001
<i>M. sympodialis</i> M.sl-F 5.8S-R	CGGACGCAAACACGTCTCTG TTCGCTGCGTTCTTCATCGA	190	Affes <i>et al.</i> , 2009
<i>M. yamatoensis</i> M.y-F M.y-R	CGATCAAACCTTCTGTGTCCAG TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA	125	Morishita <i>et al.</i> , 2006

การกระตุ้นการสร้างสายราในหลอดทดลอง

นำ isolates ทั้งหมดของเชื้อ *Malassezia* spp. ที่ถูกจำแนกชนิดออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆด้วยวิธี PCR amplification มากระตุ้นให้มีการสร้างสายราโดยนำเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน มาเจือจางด้วย 0.85% normal saline solution (NSS) นำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer เตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้น $1-5 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายปริมาณ 300 ไมโครลิตรลงบนอาหาร Minimal medium agar (MM) (MgSO_4 (10 mM) 2.4 g/L, KH_2PO_4 (29.4 mM) 4.0 g/L, Glycine (50.0 mM), 0.2% tween 80, 0.2% tween 40, 0.5% agar, pH 4.6) มีความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.5% และมีการเติม L-DOPA (1.0 mM) ร่วมกับ kojic acid ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรลงไป โดยมีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม L-DOPA และอาหารที่มีการเติม L-DOPA หรือ kojic acid เพียงอย่างเดียวเป็น control จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะ Microaerophilic condition ที่มีปริมาณออกซิเจน 6-12% เป็นระยะเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เจริญบนอาหารมาตรวจดูการสร้างสายราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการวิจัย

การแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. จากรอยโรคที่ผิวหนังผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดี

เมื่อทำการแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. จากรอยโรคที่ผิวหนังผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดีจำนวน 173 isolates ด้วยวิธี Biochemical test สามารถจำแนกเชื้อ *Malassezia* spp. ออกเป็น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis* และ *M. slooffiae* จากนั้นนำมายืนยันผลการแยกชนิดอีกครั้งด้วยวิธี PCR amplification พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน (ตารางที่ 2) นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Malassezia* จำนวน 46 isolates ที่ไม่สามารถแยก species ด้วยวิธี Biochemical test ได้ แต่พบว่าวิธี PCR สามารถแยกเชื้อ *Malassezia* ในระดับ species ได้ (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 1) ซึ่งสามารถแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. ได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. globosa* และ *M. japonica* และเชื้อ *Malassezia* ในกลุ่มนี้จะทำการส่งวิเคราะห์หิวคลีโอไทด์ (genome sequencing) ต่อไปเพื่อยืนยันผลการทดลอง นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 8 ราย พบเชื้อ *M. furfur* จำนวน 6 isolates และ *M. globosa* จำนวน 2 isolates และคนสุขภาพดีนั้นจะพบเชื้อ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae* และ *M. japonica* (ตารางที่ 4 และรูปที่ 2)

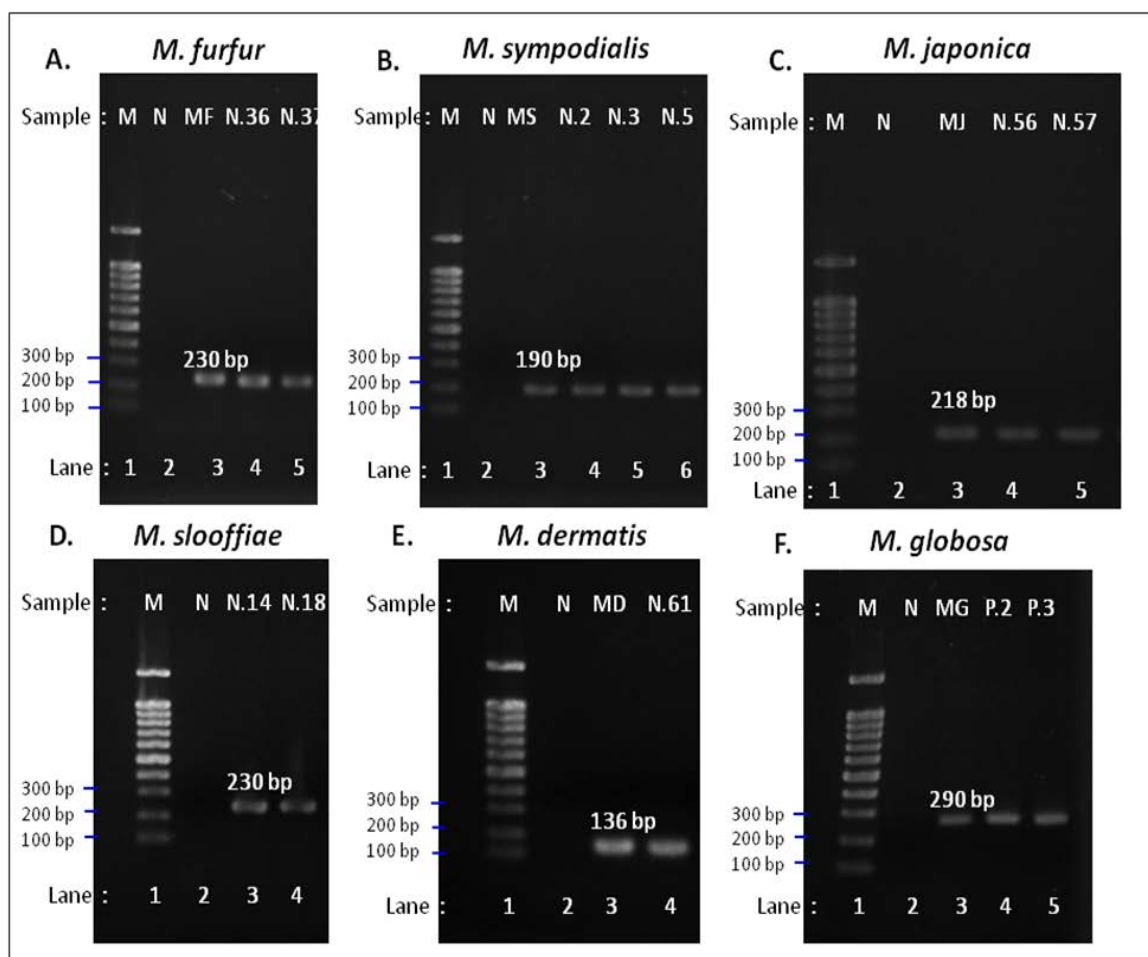
ตารางที่ 2 ผลการแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดีด้วยวิธี Biochemical test และวิธี PCR amplification ที่ให้ผลสอดคล้องกัน

strains	number of isolates (%)
<i>M. sympodialis</i>	59(46.45)
<i>M. furfur</i>	59(46.45)
<i>M. dermatis</i>	5(3.94)
<i>M. slooffiae</i>	4(3.15)
Total	127(100)

ตารางที่ 3 ผลการแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี PCR amplification ในเชื้อที่ไม่สามารถแยกชนิดด้วยวิธี

Biochemical test

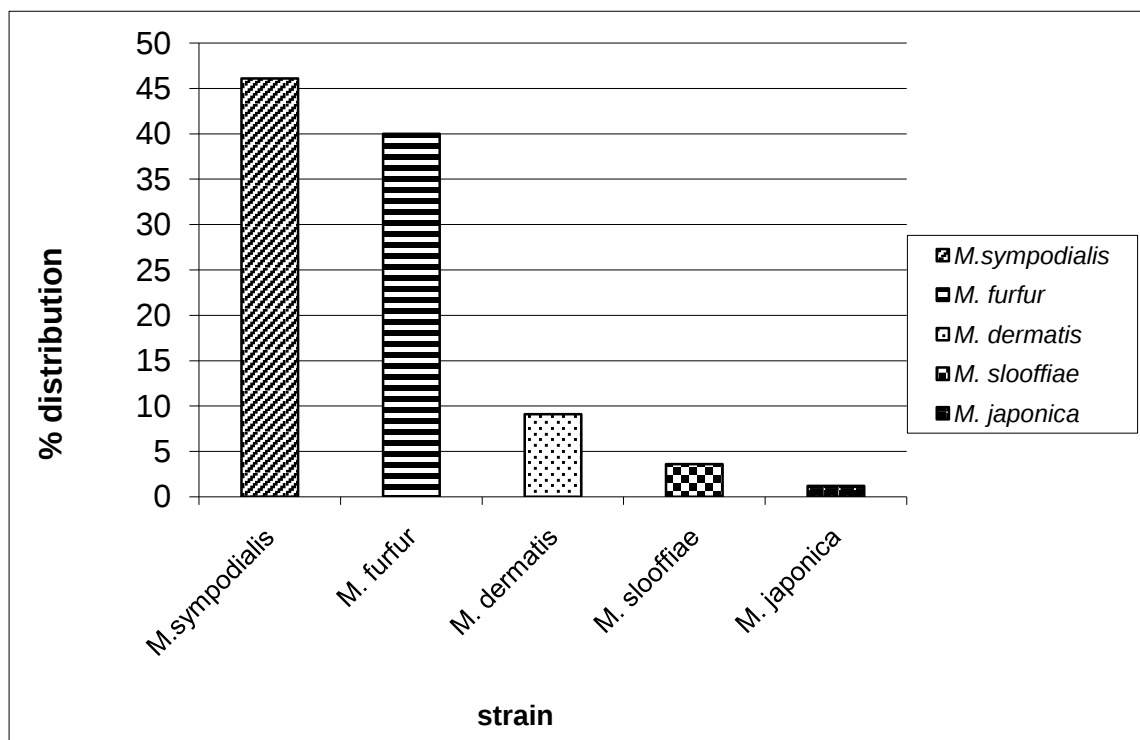
strains	number of isolates (%)
<i>M. sympodialis</i>	17(36.95)
<i>M. furfur</i>	13(28.26)
<i>M. dermatis</i>	10(21.74)
<i>M. slooffiae</i>	2(4.35)
<i>M. globosa</i>	2(4.35)
<i>M. japonica</i>	2(4.35)
Total	46(100)



รูปที่ 1 แสดงการแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี PCR amplification (A) *M. furfur*, (B) *M. sympodialis*, (C) *M. japonica*, (D) *M. slooffiae*, (E) *M. dermatis* และ (F) *M. globosa*; lane M: DNA marker, N: negative control

ตารางที่ 4 ผลการแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ของคนสุขภาพดีด้วย วิธี PCR amplification

strains	number of isolates (%)
<i>M. sympodialis</i>	76(46.06)
<i>M. furfur</i>	66(40.00)
<i>M. dermatis</i>	15(9.09)
<i>M. slooffiae</i>	6(3.64)
<i>M. japonica</i>	2(1.21)
Total	165(100)

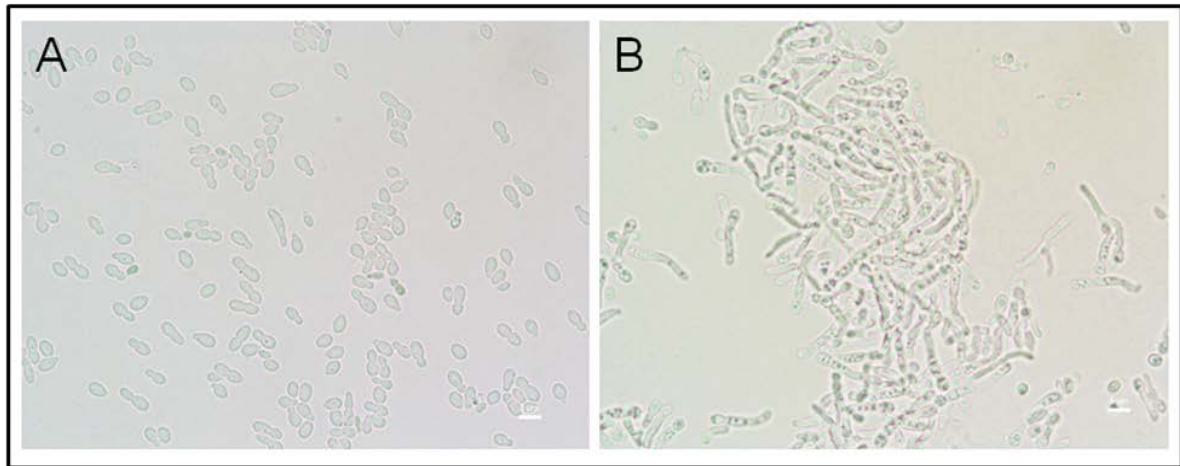


รูปที่ 2 แสดงร้อยละชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. ในคนปกติที่แยกด้วยวิธี PCR amplification

การกระตุ้นการสร้างสายราในหลอดทดลอง

การศึกษาการกระตุ้นให้เชื้อ *Malassezia* spp. มีการสร้างสายราในหลอดทดลองพบว่าเมื่อนำเชื้อ *M. furfur* ที่แยกจากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดีจำนวน 72 isolates มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Minimal medium ที่

สภาวะต่างๆ พบว่า *M. furfur* จำนวน 28 isolates มีการสร้างสายราเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Minimal medium ที่มีการเติม 1mM L-DOPA ร่วมกับ 2,000 µg/ml kojic acid (รูปที่ 3B)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *M. furfur* (A) เชื้อ *M. furfur* บนอาหาร Minimal medium , (B) เชื้อ *M. furfur* บนอาหาร Minimal medium ที่มีการเติม 1mM L-DOPA ร่วมกับ 2,000 µg/ml kojic acid

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เชื้อ *Malassezia* spp. จัดเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบบนผิวหนังของคนและสัตว์ เลื้อยคูน และเมื่อมีปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญ ที่มากขึ้นทำให้เชื้อสามารถที่จะก่อโรคที่ผิวหนังได้ซึ่ง โรคที่มีความสำคัญ ได้แก่ โรคเกลื้อน ดังนั้นจึงมีการศึกษาแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ที่อยู่บน ผิวหนังคนสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคเกลื้อน โดยในปี Nakabayashi *et al.* (2000) ได้แยกชนิดเชื้อในคน สุขภาพดีจำนวน 35 คน ด้วยวิธี Biochemical test พบ เชื้อ *M. globosa* (22%), *M. sympodialis* (10%) และ *M. furfur* (3%), *M. slooffiae* (1%) , *M. restricta* (1%) และในผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 22 คนพบเชื้อ *M. globosa* มากที่สุดคิดเป็น 55% ในขณะที่เชื้อ species อื่นๆ ให้ผลที่ต่ำกว่า 10% ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Tarazooie *et al.* (2004) ซึ่งพบว่าเชื้อ *M. globosa* เป็นสาเหตุก่อโรคมกที่สุดคิดเป็น 53.3 % นอกจากนี้ในการศึกษาของ Saghazadeh *et al.* (2010) ได้ทำการแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. จากคนสุขภาพ ดีจำนวน 34 คนด้วยวิธี Biochemical test เช่นกัน พบ เชื้อ *M. globosa* (52.9%), *M. sympodialis* (23.5%), *M. furfur* (11.8%), *M. restricta* (5.9%), *M. obtuse* (2.9%) และ *M. slooffiae* (2.9%) ตามลำดับ สำหรับใน

การศึกษาครั้งนี้ได้แยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดี โดยแบ่งเป็น ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 8 คนและคน สุขภาพดีจำนวน 165 คน พบว่าเมื่อนำมาแยกชนิดด้วย วิธี Biochemical test สามารถจำแนกชนิดได้จำนวน 127 isolates แบ่งเป็น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis* และ *M. slooffiae* ซึ่งให้ผลสอดคล้องเมื่อนำมายืนยันผลด้วยวิธี PCR amplification โดยมีตัวอย่างจำนวน 46 isolates ที่ไม่ สามารถแยกชนิดได้ด้วยวิธี Biochemical test แต่เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกชนิดด้วยวิธี PCR amplification สามารถแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. โดยแบ่งออกเป็น 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. globosa* และ *M. japonica* ซึ่งตัวอย่างจากรอยโรคที่ผิวหนังของ ผู้ป่วยโรคเกลื้อนจะพบเชื้อ *M. furfur* และ *M. globosa* ในขณะที่ตัวอย่างจากผิวหนังคนสุขภาพดีจะพบเชื้อ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae* และ *M. japonica* ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้นี้จะมีความ แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับ สภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศจึงทำให้ พบเชื้อที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี PCR

amplification ให้ผลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือได้ดีกว่าวิธี Biochemical test เนื่องจากวิธี PCR amplification มีการใช้ primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จึงทำให้สามารถจำแนกเชื้อแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้ อีกทั้งผลของการใช้ Biochemical test ของเชื้อแต่ละชนิดไม่สามารถแยกจากกันได้ อย่างชัดเจนจึงทำให้ยากต่อการแปลผล สำหรับการกระตุ้นการสร้างสาหร่ายในหลอดทดลองนั้นในการศึกษาที่ผ่านมาแม้จะสามารถชักนำให้เชื้อ *Malassezia* spp. มีการสร้างสาหร่ายในหลอดทดลองได้แต่พบว่าวิธีการที่ยู้ง่าย ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้และบางสภาวะยังทำให้เกิดการสร้างสาหร่ายที่ไม่คงที่ โดยการสร้างสาหร่ายของเชื้อ *Malassezia* spp เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้เป็นข้อบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Malassezia* spp ที่ไม่ได้คำนึงถึงปริมาณ หรือเปอร์เซ็นต์ของการสร้างสาหร่าย และในการศึกษาของ Youngchim *et al.* (2013) พบว่าในการชักนำให้เชื้อ *M. furfur* NRBC 0656 สร้างสาหร่ายได้นั้น ต้องอาศัย L-DOPA (substrate ในการสร้างเมลานิน) ร่วมกับ kojic acid (สารที่ใช้ในการยับยั้งการสร้างเมลานิน) และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิด ได้มีการทดลองในการศึกษาเรียบร้อยแล้ว ดังนั้นจึงได้นำสภาวะนี้มาใช้เป็น screening test ในการชักนำให้เชื้อ *Malassezia* spp ที่แยกได้จากผู้ป่วยและคนสุขภาพดีให้มีการสร้างสาหร่าย โดยผลการทดลองพบเชื้อ *M. furfur* จำนวน 28 isolates จาก 72 isolates ซึ่งคิดเป็น 39% มีการสร้างสาหร่ายในสภาวะที่มีการเติมสาร 1 mM L-DOPA ร่วมกับ 2000 µg/ml kojic acid มีความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.5% ที่สภาวะ Microaerophilic สำหรับเชื้อสายพันธุ์อื่น ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. globosa* และ *M. japonica* จำนวน 101 isolates นั้นต้องนำมาทดสอบการสร้างสาหร่ายในสภาวะนี้ด้วย ซึ่งขั้นตอนในการกระตุ้นการสร้างสาหร่ายด้วยวิธีนี้มีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก สามารถนำมาใช้กระตุ้นให้เชื้อมีการสร้างสาหร่ายได้จริง ทั้งนี้ยังต้องมีการพัฒนาวิธีการกระตุ้นการ

สร้างสาหร่ายในเชื้อสายพันธุ์อื่นๆซึ่งยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาและพัฒนาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. สิริดา ยังฉิม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัย และสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Acosta ME, Cazorla D. 2004. Clinical-epidemiological aspects of pityriasis versicolor (PV) in a fishing community of semiarid region from Falcon State, Venezuela. *Rev Iberoam Micol.* 21(4): 191-194.
- Adamski Z. 1995. Studies of a role played by lipophilic yeasts *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*, *Pityrosporum orbiculare*) in different dermatoses. *Postepy Dermatol (Poznan).* 12: 349-454.
- Affes M, Salah SB, Makni F, Sellami H, Ayadi A. 2009. Molecular identification of *Malassezia* species isolated from dermatitis affections. *Mycoses.* 52(3): 251-256.
- Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. 2002. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologia.* 154(3): 111-117.
- Dorn M, Roehnert K. 1977. Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J Invest Dermatol.* 69(2): 244-248.

- Faergemann J. 1989. A new model for growth and filament production of *Pityrosporum ovale* (*orbicular*) on human stratum corneum *in vitro*. J Invest Dermatol. 92: 117–119.
- Faergemann J. 1994. *Pityrosporum* infections. J Am Acad Dermatol. 31: 18-20.
- Guého E, Boekhout T, Begerow D. In: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegraki A. 2010. *Malassezia* and the Skin. New York: Springer Science and Clinical Practice: 17-64.
- Hellgren L, Vincent J. 1983. The incidence of tinea versicolor in central Sweden. J Med Microbiol. 16(4): 501-503.
- Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S, Okamura N. 2007. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. J Clin Microbiol. 45(11): 3737-3742.
- Leeming JP, Notman FH, Holland KT. 1989. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. J Appl Bacteriol. 67(1): 47-52.
- Marcon MJ, Powell DA. 1992. Human infections due to *Malassezia* spp. Clin Microbiol Rev. 5(2): 101-119.
- Morishita N, Sei Y, Sugita T. 2006. Molecular analysis of *Malassezia* microflora from patients with pityriasis versicolor. Mycopathologia. 161(2): 61-65.
- Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. 2000. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Med Mycol. 38(5): 337-341.
- Nazzaro-Porro M, Passi S, Caprilli F, Mercantini R. 1977. Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. J Invest Dermatol. 69(6): 531-534.
- Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Holland KT, Ingham E. 2001. Production of the mycelia phase of *Malassezia in vitro*. Med Mycol. 39(6): 487-493.
- Saghazadeh M., Farshi S., Hashemi J., Mansouri P., Khosravi A.R. 2010. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, and normal subjects. Journal de Mycologie Médicale 20: 279-282.
- Salkin IF, Gordon MA. 1977. Polymorphism of *Malassezia furfur*. Can J Microbiol. 23(4): 471-475.
- Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, Nishikawa A. 2001. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. J Clin Microbiol. 39(10): 486-490.
- Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomorodian K, Saadat F, Zeraati H, Hallaji Z, Rezaie S. 2004. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol. 4(5): 1-6.
- Tosti A, Villardita S, Fazzini ML. 1972. The parasitic colonisation of the horny layer in tinea versicolor. J Invest Dermatol. 59(3): 233-237.
- Youngchim S, Nosanchuk JD, Pornsuwan S, Kajiwar S, Vanittanakom N. 2013. The role of L-DOPA on melanization and mycelia production in *Malassezia furfur*. Plos One. 8(6):e63764.doi:10.1371/journal.pone.006374