หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเหนี่ยวนำการสร้างสายราในหลอดทดลองของเชื้อ *Malassezia* species ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและผู้มีสุขภาพดี
ผู้เขียน	นางสาวเพราพิลาศ อินตะยศ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร. สิริดา ยังฉิม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร. พจนา ศรีบุรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อ *Malassezia* spp. เป็นเชื้อที่ต้องการไขมันในการเจริญโดยพบเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังของคน โดยเชื้อนี้สามารถก่อโรคผิวหนังได้หลายโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเกลื้อน ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกเชื้อ *Malassezia* จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 15 คนและจากคนสุขภาพดีจำนวน 165 คน นำมาแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี biochemical test เปรียบเทียบกับวิธี PCR amplification ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Malassezia* จำนวน 70.56 % (127/180) นั้นให้ผลการจำแนกในระดับ species ที่สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี โดยสามารถจำแนกเชื้อ *Malassezia* ได้ 4 species ได้แก่ *M. furfur* (46.45%), *M. sympodialis* (46.45%), *M. dermatis* (3.94%) และ *M. slooffiae* (3.15%) ส่วนเชื้อ *Malassezia* จำนวนที่เหลืออีก 53 isolates พบว่าต้องใช้วิธี PCR amplification เท่านั้นในการจำแนก species และได้ทำการตรวจสอบยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นผลการจำแนกเชื้อ *Malassezia* จำนวนทั้งหมด 180 ไอโซเลต พบว่าสามารถแยกได้ 6 สปีชีร์ ได้แก่ *M. furfur* (42.79%), *M. sympodialis* (42.22%), *M. dermatis* (8.33%), *M. slooffiae* (3.33%), *M. globosa* (2.22%) และ *M. japonica* (1.11%) ซึ่งผลการแยกชนิดพบเชื้อ *M. furfur* (73.33%) และ *M. globosa* (26.67%) จากผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อน ในขณะที่ผิวหนังของคนสุขภาพดีพบเชื้อ *M. sympodialis* (46.06%), *M. furfur* (40.00%), *M. dermatis* (9.09%), *M. slooffiae* (3.64%) และ *M. japonica* (1.21%) จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี PCR amplification เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือในการจำแนก species ของเชื้อ *Malassezia* ได้อย่างถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมี เมื่อนำเชื้อ *Malassezia* spp มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสายราในหลอดทดลอง พบว่า เชื้อ *M. furfur* เท่านั้นที่มีการสร้างสายราได้ และพบ 48% (37 จาก 77) โดยพบสภาวะที่ชักนำให้สร้างสายรา 3แบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้แก่ เพาะเลี้ยงบนอาหาร Minimal medium (MM) ที่มี L-DOPA ร่วมกับ kojic acid, อาหาร MM ที่มี L-DOPA และบนอาหาร MM เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าสภาวะที่สามารถกระตุ้นการสร้างสายราได้มากที่สุดซึ่งพบสูงถึง 40.26% (31จาก77) เป็นการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Minimal medium ที่มี L-DOPA ร่วมกับ kojic acid ในขณะที่เชื้อ *Malassezia* spp.อื่นๆไม่สามารถสร้างสายราได้เลย ต่อมาเมื่อนำเชื้อ *M. furfur* ที่อยู่ใน yeast phase และ mycelail phase มาทำการวิเคราะห์โปรตีน พบความแตกต่างของโปรตีน ขนาด 41 และ 48 kDa ใน yeast phase ที่มากกว่า mycelail phase ดังนั้น การพบความแตกต่างของโปรตีน ต้องมีการศึกษาต่อไป ซึ่งอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อนี้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Induction of Fungal Filament Synthesis *in vitro* of *Malassezia* species Isolated from Pityriasis Versicolor Patients and Healthy Subjects
Author	Miss Proawpilart Intayot
Degree	Master of Science (Microbiology)
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim Advisor Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Co-advisor Assoc. Prof. Pojana Sriburee Co-advisor

ABSTRACT

Malassezia spp. are lipophilic yeasts that consider as part of normal flora organisms of human skin. It has been associated with various human skin diseases, especially pityriasis versicolor (PV). *Malassezia* spp. were isolated from 15 patients with PV and 165 healthy volunteers. *Malassezia* spp. were differentiated by using biochemical test and PCR amplification. From the correlation results of these two methods, 70.56% (127/180) of agreement was found in species identification of *Malassezia* resulted in *M. furfur* (46.45%), *M. sympodialis* (46.45%), *M. dermatis* (3.94%) and *M. slooffiae* (3.15%). In addition, 53 isolates of *Malassezia* spp. were differentiated by PCR amplification only and then confirmed by nucleotide sequence analysis. Totally, 180 isolates of *Malassezia* spp were identified into 6 species including *M. furfur* (42.79%), *M. sympodialis* (42.22%), *M. dermatis* (8.33%), *M. slooffiae* (3.33%), *M. globosa* (2.22%) and *M. japonica* (1.11%). Only *M. furfur* (73.33%) and *M. globosa* (26.67%) were isolated from lesional skin of PV. In addition, *Malassezia*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

spp. isolated from skin of healthy volunteers were identified as *M. sympodialis* (46.06%), *M. furfur* (40.00%), following by *M. dermatis* (9.09%), *M. slooffiae* (3.64%) and *M. japonica* (1.21%). This finding suggested that PCR method can be used as a potential tool for the species identification of *Malassezia* spp. when compared with the biochemical method. The result of filament induction *in vitro* revealed that only 48% (37/77) of *M. furfur* was able to produce the mycelial but not found in other species of *Malassezia*. The conditions that induced *M. furfur* to synthesis hyphae were classified into 3 groups: Minimal medium (MM) with L-DOPA and kojic acid, MM with L-DOPA, and MM only. In total, 83.78% (31/37) different isolates of *M. furfur* was able to produce the hyphae when grown on MM with L-DOPA and kojic acid. The protein profile of *M. furfur* yeast and mycelial form was compared. It revealed that protein bands of 41 and 48 kDa were more expressed in the yeast form than in the mycelial form. The difference of these proteins expression will need more studies. It may probably be involved in the pathogenesis of this fungus.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved