การแยกชนิดของเชื้อมาลาสเซเซีย โดยวิธีทางชีวโมเลกุล ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นอินแฟนไทล์ ซีบอเรอิค เดอร์มาไททิส

นางสาวจัญจุรี สมาธิ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชากุมารเวชศาสตร์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1867-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR DIFFERENTIATION OF MALASSEZIA SPECIES IN INFANTILE SEBORRHEIC DERMATITIS

Miss Chanchuree Samathi

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pediatrics

Department of Pediatrics

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1867-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกชนิดของเชื้อมาลาสเซเซีย โดยวิธีทางชีวโมเลกุลในผู้ป่วยเด็กที่เป็นอินแฟนไทล์ ซีบอเรอิค เดอร์มาไททิส

โดย นางสาว จัญจุรี สมาธิ

สาขาวิชา กุมารเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ศิริวรรณ วนานุกูล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินดามพร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ.

(อาจารย์แพทย์หญิงพรรณทิพา ฉัตรชาตรี)

…… อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ศิริวรรณ วนานุกูล)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

……กรรมการ

(อาจารย์แพทย์หญิงวนิดา ลิ้มพงศานุรักษ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จัญจุรี สมาธิ : การแยกชนิดของเชื้อมาลาสเซเซีย โดยวิธีทางชีวโมเลกุลในผู้ป่วย เด็กที่เป็นอินแฟนไทล์ ซีบอเรอิค เดอร์มาไททิส (Molecular differentiation of *Malassezia* species in infantile seborrheic dermatitis)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.พญ.ศิริวรรณ วนานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ศ. นพ.ยง ภู่วรวรรณ, รศ. ดร. อริยา จินดามพร, 33 หน้า
ISBN 974-17-1867-5

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาว่าในประเทศไทย พบเชื้อ *Malassezia* ใดในผื่น infantile seborrheic dermatitis

รูปแบบการวิจัย การวิจัย ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง

สถานที่ศึกษา ตึกผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในฝ่ายกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ประชากร ผู้ป่วยเด็ก อายุน้อยกว่า2 ปี ที่เป็น infantile seborrheic dermatitis(clinical diagnosis) และยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน หรือถ้าเคยได้รับการรักษาแล้ว ก็ไม่ได้มีการใช้ยา steroid ทาผื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือนขึ้นไป และมารับการรักษาที่ฝ่ายกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ช่วงเดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนเมษายน 2546

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยเด็กที่เป็น infantile seborrheic dermatitis จะได้รับการทำการขูด scale ที่บริเวณผื่นเพื่อทำการเพาะเชื้อใน Sabouraud dextrose agar เป็นเวลา 21วัน จากนั้นจะทำการสกัด DNA เพื่อทำ PCR ด้วย conserved primers ต่อ ITS ของแต่ละ samples จากนั้นนำชิ้นส่วน DNA ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาลำดับเบส (seguencine) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับ ลำดับเบส แม่แบบโดยใช้ clustal X computer program เพื่อ identify species ของเชื้อ

ผลการศึกษา มีผู้ป่วยเด็กที่เป็น infantile seborrheic dermatitis รวม 67 คน ช่วงอายุที่พบมากที่สุด คือ อายุน้อยกว่า 2 เดือน ร้อยละ 64 รองมาคือช่วงอายุ 2-4 เดือน ร้อยละ22 ความชุกของเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เพาะเชื้อได้ในผื่นเท่ากับ ร้อยละ 20 โดยเป็น *Malassezia furfur* ร้อยละ 79 และอีกร้อยละ 21 เป็น non *Malassezia* spp. ตำแหน่งของผื่น infantile seborrheic dermatitis ที่เพาะเชื้อ *Malassezia* spp พบคือ บริเวณคิ้ว ร้อยละ 55 รองมาคือบริเวณหนังศีรษะ ร้อยละ 36

บทสรุป ความชุกของเชื้อ *Malassezia* spp. ในผื่น infantile seborrheic dermatitis เท่ากับ ร้อยละ 20 โดยพบบ่อยช่วงอายุน้อยกว่า 2 เดือน รองมาคือช่วงอายุ 2-4 เดือน พบมากที่บริเวณคิ้วและหนังศีรษะตามลำดับ โดย *Malassezia furfur* เป็น speciesหลักที่พบเพียง species เดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... **ลายมือชื่อนิสิต**.....
สาขาวิชา..... **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....
ปีการศึกษา..... **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4575209930 : Major Pediatrics

Key words: infantile seborrheic dermatitis / *Malassezia* spp.

Chanchuree Samathi: Molecular Differentiation of *Malassezia* species in infantile seborrheic dermatitis. Thesis adviser: Assoc. Prof. Siriwan Wananukul, M.D. Thesis co-adviser: Prof. Yong Poovorawan M.D. and Ariya Chindamporn ,Ph.D.33 pp. ISBN 974-17-1867-5.

Objective: To study the incidence and strains of *Malassezia* in infantile seborrheic dermatitis.

Design: Cross-sectional descriptive study.

Setting: Pediatric out-patients and in-patients units, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok.

Patients: Children aged less than 2 years with clinical diagnosis of infantile seborrheic dermatitis who received no steriod treatment for at least 1 month and who were examined at Deparment of Pediatrics, King Chulalongkorn Momorial Hospital, Bangkok.

Method: Skin samples scraped from lesions of infantile seborrheic dermatitis were cultured in Sabouraud Dextrose Agar for 21 days. The DNA of *Malassezia spp*. Was detected by PCR method with conserved primers on ITS. After the product DNA was purified, sequencing and analyzing of both unknown samples and standard strains were done by using Clustal X Computer program to identify the species of *Malassezia.*

Result: Infantile seborrheic dermatitis is found in the age groups of less than 2 months (64%) and 2-4 months (22%) respectively. The incidence of Malassezia spp. in infantile seborrheic dermatitis is 20 %. *Malassezia furfur* is found in 79% of the lesions of infantile seborrheic dermatitis whereas the other 21 % was contaminated by yeast of non *Malassezia spp*. *Malassezia furfur* is found in eyebrows (55%) and scalp (36%), respectively.

Conclusion: The most common age group of infantile seborrheic dermatitis is less than 2 months. The incidence of *Malassezia spp.* in infantile seborrheic dermatitis is 20 %. The most common areas that *Malassezia spp*. is found are eyebrows, and scalp.

Department /Program..... Student 'ssignature.....
Field of study..... Advisor 's signature.....
Academic year..... Co-advisor 's signature.....
Co-advisor 's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของบุคคลต่างๆที่เกี่ยวข้องมากมาย ขอขอบพระคุณทุกท่านดังกล่าวนี้

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ศิริวรรณ วนานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินดามพร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในการวิจัยมาด้วยดีตลอด

คุณ ภูมิจิตร ยำยวม นักวิทยาศาสตร์ประจำหน่วยเชื้อรา และเจ้าหน้าที่หน่วยเชื้อราทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการเก็บข้อมูล

คุณสัญชัย พยุงภร นักศึกษาปริญญาเอกโครงการกาญจนาภิเษก สกว. หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัยและคุณอภิรดี เทียมบุญเลิศและเจ้าหน้าที่ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางหน่วยปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างมากในด้านชีวโมเลกุล

ทุนรัชดาภิเษกสมโภช, ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. และทุนสนับสนุนศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางหน่วยปฏิบัติการวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผลความดีและประโยชน์ที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบให้แก่ผู้ป่วยเด็กที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกๆคน

ท้ายที่สุดนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและที่เป็นหลัก เป็นกำลัง และเป็นพลังใจให้กับผู้นิพนธ์เสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… จ

กิตติกรรมประกาศ…… ฉ

สารบัญ……ช

สารบัญตาราง…… ซ

บทที่ 1.บทนำ…… 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……... 2

สมมุติฐานของการวิจัย……... 2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 2

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย…… 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…… 3

บทที่ 2.ปริทัศน์วรรณกรรม…… 4

บทที่ 3.รูปแบบของการวิจัย…… 6

ประชากรและตัวอย่าง…… 6

การสังเกตและการวัด…… 7

การเก็บรวบรวมข้อมูล…… 9

การวิเคราะห์ข้อมูล…… 9

บทที่ 4.ผลการวิเคราะห์ข้อมูลศึกษา……...10

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่ได้จากการศึกษา……..10

ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเชื้อ……12

บทที่ 5.สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ…… .24

สรุปผลการวิจัย…… 24

อภิปรายผลการวิจัย…… 24

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยครั้งต่อไป…… 26

รายการอ้างอิง…… 27

ภาคผนวก…… 29

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…… 33

สารบัญตารางและแผนภูมิ

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงอายุของผู้ป่วยที่เข้าทำการศึกษา..... 10
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตำแหน่งของผื่นต่อผู้ป่วย 1 ราย..... 11
ตารางที่ 3 แสดงตำแหน่งของผื่น infatile seborrhic dermatitis ต่อผู้ป่วย 1 ราย..... 11
ตารางที่ 4 แสดงตำแหน่งของผื่น infatile seborrhic dermatitis ในผู้ป่วยรายที่ผลแยกเชื้อเป็น Malassezia furfur..... 12

ภาพแสดงที่ 1 แสดง PCR products on Agarose 1.5 % gel electrophroresis..... 13
ภาพแสดงที่ 2 แสดง reference strain of *Malassezia spp.* , *Candida spp.* And out group 14
ภาพแสดงที่ 3 แสดง Alignment of ITS 1 sequences of Malassezia spp..... 16
ภาพแสดงที่ 4 แสดงผล Blast results..... 21
ภาพแสดงที่ 5 แสดง Phylogenic tree of ITS sequence data of Malassezia spp... 23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

<u>ความเป็นมาและ ความสำคัญของปัญหา</u> (Background and Rationale)

ผื่น infantile seborrheic dermatitis[1,2,3] เป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในเด็กเล็ก โดยเฉพาะอายุน้อยกว่า 1 ปี ซึ่งผู้ปกครองมักจะมีความกังวลว่าผื่นผิวหนังนี้เกิดจากสาเหตุใด รักษาหายหรือไม่ มีสมมติฐานเกี่ยวกับสาเหตุของผื่นผิวหนังอักเสบนี้เพื่อให้ได้ทราบ และเป็นแนวทางในการรักษา ปัจจัยที่เป็นที่สนใจกันอย่างมากขณะนี้คือการเจริญเติบโตของเชื้อ *Malassezia spp.* ที่เป็นเชื้อที่พบอยู่บนผิวหนังของคนปกติทั่วไปอยู่แล้ว รวมทั้งเป็นสาเหตุของโรค pityriasis versicolor อีกด้วย ในผู้ใหญ่พบว่าผื่น seborrheic dermatitis มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ *Malassezia spp.* ด้วยแต่ในเด็กสาเหตุผื่น infantile seborrheic dermatitis ยังไม่เป็นที่แน่ชัด

ชื่อของ pityriasis versicolor ได้ถูกค้นพบโดย Eichstedt เมื่อประมาณ ปี ค.ศ. 1846 แต่ Genus *Malassezia* (synonym *Pityrosporum*)ซึ่งตั้งโดย Baillon เมื่อประมาณ 50 ปีก่อน กลับไม่ค่อยมีใครทราบรายละเอียดมากนัก[4]

Genus *Malassezia* เพิ่งถูกค้นพบไม่นานนี้ว่าประกอบด้วยเชื้อต่างๆ 7 species[5,6] คือ

1. Lipid independent species :- *M. pachydermatis*
2. Lipid dependent species :- *M. furfur*
   M. sympodialis
   M. globosa
   M. obtusa
   M. restricta
   M. slooffiae

การแยกชนิดของเชื้อใน Genus *Malassezia* นั้น ในปัจจุบันทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะโคโลนี และ ศึกษาลักษณะเซลล์เชื้อ ศึกษาคุณสมบัติ lipid dependency รวมถึงการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผื่น seborrheic dermatitis หมายถึงโรคที่มีผื่นแดงและเป็นสะเก็ดกระจายอยู่ตามบริเวณผิวหนังที่มีต่อมไขมันมาก เรียกว่า seborrheic area ได้แก่ หนังศีรษะ หลังใบหู ใบหน้า กลางหน้าอก ซอกคอ รักแร้และขาหนีบ[7] สาเหตุของโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน แต่สิ่งที่พบในคนที่มีแนวโน้มจะเป็นโรคนี้ คือ ในตำแหน่งที่มีการอักเสบและเป็น scale มาก ทำให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเจริญเติบโตได้ดีจนทำให้มีผู้เข้าใจว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคได้หรือไม่

ในเด็กจำแนกได้เป็น 2 ช่วงอายุ คือ ระยะทารก และระยะวัยรุ่น ระยะทารก หรือ infantile seborrheic dermatitis มักมีอาการระหว่างอายุ 1-3 เดือน และจะเป็นอยู่ประมาณ 3 - 6 สัปดาห์ ลักษณะเป็นผื่นปื้นแดงและเป็นน้ำมันเยิ้มตามตำแหน่งต่างๆที่ได้กล่าวไปแล้วและนอกจากนี้ที่บริเวณศีรษะอาจพบสะเก็ดแข็งเป็นแผ่นหนาเรียกว่า cradle cap บางครั้งน้ำเหลืองซึมแฉะและเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ หลังจากนั้นอาการจะหายไปเองและกลับมาเป็นอีกเมื่อเข้าวัยรุ่น

การวินิจฉัยอาศัยลักษณะการกระจายของผื่น และวินิจฉัยแยกโรคจาก atopic dermatitis ที่ไม่มี lichenification และไม่มีประวัติภูมิแพ้ในครอบครัว

อาการผื่นที่เป็นไปตาม clinical diagnosis[3,4] คือ

primary lesion : noneczematous erythematous greasy salmon- colored scaly lesions , well circumscribed eruptions and relative absent of pruritus

secondary lesion : eczematous scaly patches , crusted lesions ,lesions turn generalized and exfoliative

distribution : scalp , forehead , ear , post auricular area , eyebrows , intertriginous area , flexural area of the body

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u> (Objectives)

เพื่อศึกษาความชุกของ *Malassezia spp.* ในผื่น infantile seborrheic dermatitis ในประเทศไทย

<u>สมมติฐาน</u> (Hypothesis)

Malassezia furfur และ *Malassezia globosa* เป็น species ที่พบในผื่น infantile seborrheic dermatitis

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u> **(Expected benefits and application)**

เพื่อทราบถึงความชุกของ *Malassezia* species ที่พบในผื่น infantile seborrheic dermatitis และเพื่อเป็นประโยชน์ในการพิจารณาใช้ยากลุ่มใหม่ในการรักษาเพื่อหลีกเลี่ยงอาการข้างเคียงจากการใช้ยา steroid ที่เป็นยาที่ใช้รักษาในปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม (Review of related literatures)

จากการทดลองของ Broberg A.[1,8] ได้อธิบายว่าสาเหตุของผื่น seborrheic dermatitis มาจากหลายสาเหตุเกี่ยวข้องกัน เช่น ฮอร์โมน , ฤดูกาล , สภาพแวดล้อม หรืออาจเกิดโดยไม่ทราบเหตุได้ ในช่วง 5-6 ปีนี้ มีรายงานว่าเชื้อ *Malassezia spp.* ซึ่งเป็น lipophilic yeast ว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งที่ของการอักเสบและเป็นเชื้อที่พบอยู่บนผิวหนังของคนปกติทั่วไปอีกด้วย

Tollesson A. และคณะ [9].ได้ทำการวิจัยว่าในผู้ป่วยที่พบเชื้อ *Malassezia spp.* โดยการเพาะเชื้อจากผื่นผิวหนัง และในตำแหน่งเดิมเมื่อได้รับการรักษาจนหายเป็นปกติแล้ว และเมื่อหายเป็นเวลา 1 ปีแล้ว มาเปรียบเทียบกัน พบว่ายังสามารถเพาะเชื้อพบเชื้อ *Malassezia spp.* ได้ จึงสรุปว่าเชื้อ *Malassezia spp.* อาจจะไม่มีความสัมพันธ์กับอาการของผื่น sedorrheic dermatitis เลย ต่างจากการทดลองอื่นที่เคยรายงานมา

เนื่องจากเชื้อ Genus *Malassezia* ได้ถูกค้นพบมานานแล้ว แต่ไม่เคยมีผู้ใด classified ไว้โดยละเอียด จนปี 1996 Gaeho และคณะ [10] ได้ reclassified morphology and ultrastructure physiology and molecular biology ได้ 7 species ได้แก่ *M. globosa , M. obtusa , M. restricta , M. slooffiae , M. furfur , M. pachydermatitis , M. sympodiasis*

Nakabayashi A.และคณะ [11] ได้ทำการแยกเชื้อ ตาม species จากผื่น seborrheic dermatitis พบ *M. furfur* 35% และ *M. globosa* 22% ที่ต่างจากในผิวหนังปกติอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปว่า *M. furfur* และ / หรือ *M. globosa* อาจเป็นสาเหตุของผื่น seborrheic dermatitis

ด้าน immunology[12,13,14] ได้มีผู้ทำการทดลองมากมาย เพื่อหาข้อสรุปว่าในผู้ป่วย seborrheic dermatitis มีการเปลี่ยนแปลงใดบ้าง, Bergbrant IM[12,14] จากสวีเดน

พบว่า ในผิวหนังของผู้ป่วยเด็กที่เป็นผื่น seborrheic dermatitis มีไขมันมากกว่าคนปกติ และพบว่าผู้ป่วย seborrheic dermatitis ไม่มีความผิดปกติทั้งด้าน humoral และ local immune system และเกือบครึ่งหนึ่งของผู้ป่วย พบปริมาณ circulatory NK - cell มากขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาของ Parry ME, Sharpe GR[15] พบว่าผื่น seborrheic dermatitis ไม่ได้เกิดจาก inadequate หรือ inappropriate immune response ต่อ *Malassezia* เช่นกัน

นอกจากนี้ไม่เพียงแต่เชื้อ *Malassezia spp*. จะเป็นnormal flora บริเวณผิวหนังแล้ว *Malassezia* spp. ยังมีความสามารถในการก่อโรคผิวหนังต่างๆได้ ตามที่ Abeck D, Mohrenschlager M.และคณะ[16] จากเยอรมัน พบว่าเชื้อ *Malassezia* spp สามารถทำให้เกิด Pityrosporum folliculitis , ผื่นผ้าอ้อมในเด็ก[17] และนอกจากนี้ยังพบว่าเป็นสาเหตุของ atopic dermatitis, papillomatosis[9], and seborrhic dermatitis อีกด้วย[18,19,20] Nabayashi A[21] ได้แยกเชื้อจากผื่น tinea versicolor พบหลาย species เช่น *M. globosa* 97%, *M. restricta* 79% และ *M. Sympodialis* 68%

มีรายงานการก่อโรครุนแรงจากเชื้อ *Malassezia* spp. เช่นกัน จากการรายงานของ Andersen BH และ คณะ[22]พบว่ามีทารกแรกเกิดที่ได้รับ intravenous nutrition 1 รายเกิด septicemia จากเชื้อ *Malassezia furfur*

ในด้านการรักษา Sei Y และ คณะ[23]ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ steriod และ antimycotic agents พบว่าประสิทธิภาพของ antimycotic agents เท่ากับ 81% แต่clinical improvement ช้ากว่าการใช้ steriod

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัย ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (Cross- sectional descriptive study)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

ประชากร (Population) **และตัวอย่าง** (Sample)

1. ประชากรเป้าหมายและขนาดตัวอย่าง

ผู้ป่วยเด็กที่มีอาการเข้าได้กับผื่น infantile seborrheic dermatitis(clinical diagnosis) และยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน หรือถ้าเคยได้รับการรักษาแล้ว ก็ไม่ได้มีการใช้ยา steroid ทาผื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือนขึ้นไป ก่อนมาพบแพทย์ในครั้งนี้ ในฝ่ายกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ช่วงเดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนเมษายน 2546 คาดว่าจะได้ใช้ตัวอย่างประมาณโดยสูตรต่อไปนี้

$$N = Z_{\alpha}^{2}PQ / d^{2}$$

Z_{α} = confidential interval = 95% = 1.96

P = incidence of *Malassezia* spp. in seborrheic dermatitis = 0.85

Q = 1 - P

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ = 0.1

ซึ่งคาดว่าค่า N จะประมาณ 49 คน

2. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้ามาศึกษา (inclusion criteria)[3,4]

1. อายุ 0 - 2 ปี
2. มีอาการตาม clinical diagnosis คือ

primary lesion : noneczematous erythematous greasy salmon-colored scaly lesions , well circumscribed eruptions and relative absent of pruritus

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

secondary lesion : eczematous scaly patches , crusted lesions , lesions turn generalized and exfoliative

distribution : scalp , forehead , ear , post auricular area , eyebrows , intertriginous area , flexural area of the body

3. ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อนหรือถ้าเคยได้รับการรักษาแล้วไม่ได้ใช้ยาsteroid ทาผื่นเป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือนขึ้นไป ก่อนมาพบแพทย์

3. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากศึกษา (Exclusion Criteria)

1. ผู้ป่วยที่เคยรักษาแล้ว และใช้ยา steroid ทาผื่นในช่วงเวลาน้อยกว่า 1 เดือน ก่อนมาพบแพทย์ในครั้งนี้

<u>การสังเกตและการวัด</u> (Observation and Measurement)

1. การวินิจฉัยโรค

ตาม clinical diagnosis criteria

2. การเพาะเชื้อ

ทำการขูด scale ใช้สันมีด blade ขูดที่บริเวณ lesion ที่มี ขุย (scale) มากๆโดยเฉพาะบริเวณขอบ lesion ให้ได้ขุยมากที่สุด ไม่ให้มีเลือดออก โดยผู้วิจัยและแพทย์ผิวหนังที่ได้รับการฝึกฝนอย่างดีและเชื่อถือได้ จากนั้นใส่ขุยที่ได้บน slideที่ coat ด้วย Sabouraud dextrose agar เรียบร้อยแล้ว ส่งไปห้องปฏิบัติการเพื่อทำการเพาะเชื้อที่ 25 °C ต่อไป

3. Molecular differentiation and characterization[24]

<u>การเตรียม DNA จากเซลล์เชื้อรา</u>

เมื่อได้ colony ของ *Malassezia* spp. ที่เติบโตบน Sabouraud dextrose agar (ประกอบด้วย peptone, 1% w/v, glucose 1% w/v, with agar 1.5% w/v) ที่ใส่ด้วยน้ำมันมะกอกปราศจากเชื้อบ่มที่ 25° C. แล้ว นำส่วนหนึ่งของ colony ที่ได้ไปผสมกับ lysis buffer 100 μl (200 mM Tris HCl, pH 8.0, SDS 0.5% w/v, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA).โดยใช้ vortex mixing 5 วินาที ส่วนผสมจะถูก incubated ที่ 100°c นาน 15 นาที จากนั้นผสม 100 μl of 3.0

M sodium acetate, และ incubated ที่ -20°c เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปปั่นที่ 9,000 rpm นาน 5 นาที สกัดส่วนบน(supernate) ซึ่งเป็นชั้นที่มี DNA ด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1, v:v:v) นำไปปั่นแยกอีกครั้งที่ 14,000 rpm นาน 20นาที ส่วนของ DNA ถูกทำให้ตกตะกอนด้วย 3.0 M sodium acetate 40 μl, glycogen 4 μl, absolute ethanol 800 μl และ incubated ซ้ำที่ –70 °c เป็นเวลา 30 นาที ส่วนของ DNA ที่ตกตะกอนจะถูกล้างให้บริสุทธิ์ด้วย 1 ml of 70% ethanol แล้วนำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 15 นาที DNA ที่แยกได้จะถูกทำให้แห้ง และผสมใหม่อีกครั้งด้วย sterile water 50 μl เพื่อได้ สารละลาย DNAที่บริสุทธ์

Oligonucleotide

ในการทดลองใช้ oligonucleotide primers ในส่วน conserve ของ rDNAส่วน ITS คือ forward primer 18SF1: 5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3' (nt.position 1764-178 of *Saccharomyces* cerevisiae 18S rDNA) และ reverse primer 58SR1 : 5' TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3' (nt. position 53-34 of *S.cerevisiae* 5.8S rDNA).

ทำการเพิ่มจำนวนด้วย PCR

แต่ละ samples ของ PCR ประกอบด้วย 2.5 μl ของ reaction buffer (FINNZYMES), 10.0 μM ของ dNTP (dATP, dCTP, dGTPและ dTTP ; SibEnzyme), 0.2 μl ของ taq polymerase (FINNZYMES), 0.5 μl ของ primer, และ3.0 μl ของ DNA template solution จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 25 μl บ่มที่ 94°C นาน 5 นาที จากนั้นผ่านสู่กระบวนการ Thermal cycles ดังนี้ 94° C , 1 นาที; 60° C , 15 วินาที and 72° C , 15 วินาที รวม 25 รอบ และที่ 72° C เป็นเวลา 10 นาทีเป็นรอบสุดท้าย PCR productsที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายจะถูกนำมาตรวจสอบขนาดโดย stained ด้วย ethidium bromide และนำมาทำ electrophoresis บน agarose 1.5% gel จะสามารถมองเห็น PCR products ได้โดยส่องผ่านแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาด product กับมาตรฐาน

<u>การทำ ITS1 DNA sequencing</u>

หลังจากได้ PCR products แล้ว จะตัดแยกแต่ละ product band มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วย gel extraction Kit (QIAquick), ใช้ primer 18SF1 เพื่อทำ DNA sequencing ด้วย automated sequencer (Genetic Analyzer 310, Perkin-Elmer)

ITSI sequences ของแต่ละตัวอย่าง จะนำมาวิเคราะห์ด้วย clustal X computer program พร้อมกับ ITSI sequences มาตรฐาน เพื่อทำการเปรียบเทียบกันว่าเป็นชนิดใดเทียบกับมาตรฐานและจะนำข้อมูลทั้งหมดมาศึกษาสร้างความสัมพันธ์กันโดยอาศัยความคล้ายคลึงกันเสนอในรูปแบบของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ
(Phylogenetic tree) โดยมี Omphalina rosella, DDBJ/EMBL/GenBank accession no. U66452 เป็นตัว out group

<u>การรวบรวมข้อมูล</u> (Data collection)

ขั้นตอนการดำเนินการ

1. ผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกในช่วงเดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนเมษายน 2546 โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รวบรวมและเก็บข้อมูลประวัติและผลการตรวจทั้งหมด
2. ขอความยินยอมในการเข้าร่วมทำการวิจัยและมีการเซ็นต์ยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรและการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรียบร้อยแล้ว
3. นำ specimen ที่ได้ไปทำการเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 21 วัน รอ colony ของ *Malassezia spp.* ในการเจริญเติบโต
4. นำcolony ของ *Malassezia spp.* ที่เพาะเชื้อได้ไปศึกษาทาง Molecular differentiation and characterization

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลศึกษา(Result)

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่ได้จากการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงอายุของผู้ป่วยที่ได้จากการศึกษา

ข้อมูล	จำนวน
อายุ	
2 สัปดาห์ – 2 เดือน	43 คน
>2 เดือน – 4 เดือน	15 คน
>4 เดือน – 6 เดือน	6 คน
>6 เดือน – 12 เดือน	3 คน
>12 เดือน – 18 เดือน	0 คน
>18 เดือน – 24 เดือน	0 คน

จากการรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วย จำนวน 67 คน พบว่า อายุของผู้ป่วยช่วง 0- 2 เดือนมากที่สุด คือ 43 คน (ร้อยละ 64) รองมาเป็นช่วง 2 เดือน ขึ้นไป – 4 เดือน มี 15 คน (ร้อยละ 22) ช่วง 4 เดือน ขึ้นไป – 6 เดือน 6 คน และช่วง 6 เดือน ขึ้นไป – 12 เดือน 3 คน คิดเป็นร้อยละ 9 และ 4.5 ตามลำดับ เพศ ชาย ต่อ หญิง เท่ากับ 1 : 1.16 (31 คน : 36 คน)

ข้อมูลแสดง distribution ของ ผื่น Infantile Seborrheic Dermatitis

จากการรวบรวมการกระจายของผื่น infantile seborrheic dermatitis ในผู้ป่วยแต่ละราย มีตำแหน่งที่จะพบผื่นอยู่ 1-3 ตำแหน่ง พบมากที่สุด คือ 2 ตำแหน่ง คือ 32 คน (ร้อยละ 48) รองมาพบ เพียงตำแหน่งเดียว 30 คน (ร้อยละ 45) และพบ 3 ตำแหน่ง 5 คน (ร้อยละ 7) เมื่อพิจารณารายละเอียดของ

ตำแหน่งการกระจาย พบว่าตำแหน่งที่พบมากที่สุด คือ หนังศีรษะ 17 คน (ร้อยละ 57) , หลังหู 7 คนและคิ้ว 6 คน (ร้อยละ 23 และร้อยละ 20 ตามลำดับ) แต่ในกลุ่มที่พบผื่น 2 ตำแหน่ง พบว่า บริเวณหลังหูพบมากที่สุด 24 คน (ร้อยละ 38) รองมาหนังศีรษะ 22 คน (ร้อยละ 34) รองมาตามลำดับ คือ คิ้ว 11 คน (ร้อยละ 17) , แก้ม 4 คน (ร้อยละ 6) และ หน้าผาก 5 คน (ร้อยละ 5)

<u>ตารางที่ 2</u> แสดงจำนวนตำแหน่งของผื่นต่อผู้ป่วย 1 ราย

Number of areas per person	Number(%)
Single area	30 (45)
2 areas	32 (48)
3 areas	5 (7)

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงตำแหน่งของผื่น infantile seborrheic dermatitis **ต่อผู้ป่วย 1 ราย**

	Single areas N =30 (%)	2 areas N =32 (%)	3 areas N =5 (%)
Scalp	17 (57)	22 (34)	5 (33.3)
Eyebrows	6 (20)	11 (17)	5 (33.3)
Post auricular	7 (23)	24 (38)	5 (33.3)
Cheek	-	4 (6)	-
Forehead	-	3 (5)	-

ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเชื้อ

จากการเพาะเชื้อของผู้ป่วยทั้ง 67 คน พบว่าสามารถเพาะเชื้อ Malassezia spp.ขึ้นรวม 14 คน คิดเป็นร้อยละ 20 ของผู้ที่เพาะเชื้อขึ้น

เชื้อ *Malassezia* spp.ของผู้ที่เพาะเชื้อขึ้น ถูกนำมาทำ PCR และถูกตรวจสอบโดย ethidium bromide-stained gel image ของ PCR products ของ*Malassezia* spp. แสดงดังรูปที่ 2 . ลักษณะ bands ที่เห็นในแต่ละตัวอย่าง คือประมาณ 200 bp หรือ 300 bp. เมื่อนำมาวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมแยกเชื้อพบว่า 11 คน จาก 14 คนพบเชื้อ *Malassezia furfur* คิดเป็นร้อยละ 79 และทั้งหมดนี้เป็นรายที่ขนาดของ PCR products เป็น 300 bp จะเป็น *Malassezia furfur* ส่วนรายที่ขนาดของ PCR products เป็น 200 bp ทั้ง 3 คน จาก 14 คน พบเชื้อ non *Malassezia* spp. คิดเป็นร้อยละ 21 และเมื่อแยกโดยใช้การย่อยสลายน้ำตาลของ yeasts ในภาวะที่มี oxygen ใน pattern ต่างๆกัน โดยใช้ API 20 C aux พบว่าเป็น Candida lusitaniae 2 case และ Candida parapsilosis1 case ตารางที่ 4 พบว่าตำแหน่งที่เพาะเชื้อพบ *Malassezia furfur* มากที่สุด คือ บริเวณคิ้ว 6 คนคิดเป็นร้อยละ 55 รองมาเป็นหนังศีรษะ 4 คน (ร้อยละ 36) และ หลังหู 1 คน (ร้อยละ 9)

ตารางที่ 4 แสดงตำแหน่งของผื่น infantile seborrheic dermatitis ในผู้ป่วยที่ผลแยกเชื้อเป็น *Malassezia furfur*

Distribution	จำนวน (%)
Scalp	4 (36)
Eyebrows	6 (55)
Post auricular	1 (9)

M 1 2 3 4

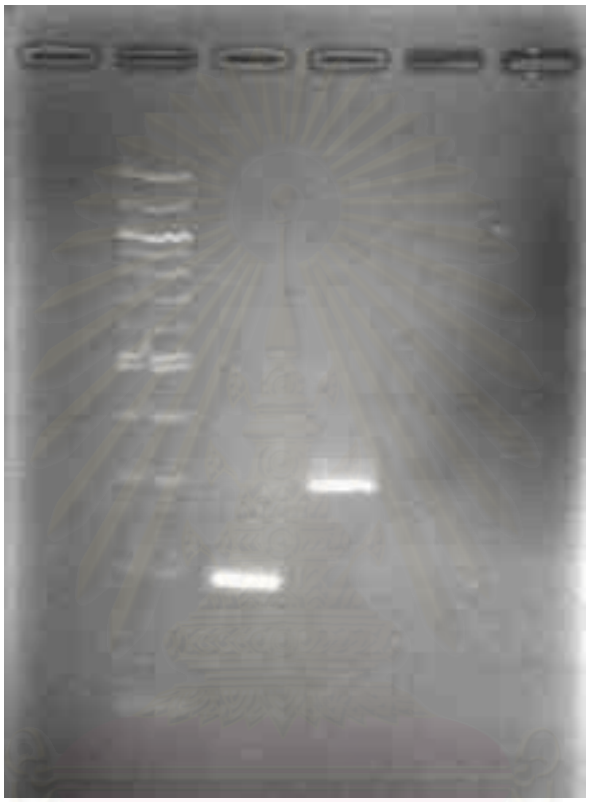


Fig 1 : PCR products prepared with primer pairs 18SF1 and 58 SF1 fromDNA of various samples of Malassezia spp.on Agarose gel electrophroresis. In the picture shown 100 bp. ladder (Standard Marker) on the left side (M), PCR products size 200 bp. (lane 1) ,and PCR products size 300 bp. (lane 2)

Fig 2 แสดง reference strain of *Malassezia spp. , Candida spp.* and out group โดยได้มาจากฐานข้อมูล NICB

- AB019331. [gi:6177855]

Malassezia furfur DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM1851

- AB105150. [gi:28881888]

Malassezia furfur genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:CBS7982

- AB105154. [gi:28881892]

Malassezia furfur genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:JM2-52.

- AB019330. [gi:6177854]

Malassezia furfur DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM2576

- AB019336. [gi:6177860]

Malassezia obtusa DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7876.

- AB019337. [gi:6177861]

Malassezia pachydermatis DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS1879.

- AB019338. Malassezia pachyd...[gi:6177862]

Malassezia pachydermatis DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS4165.

- AB019339. Malassezia pachyd...[gi:6177863]

Malassezia pachydermatis DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7044.

- AB019341. Malassezia restri...[gi:6177865]

Malassezia restricta DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7991.

- AB019342. Malassezia globos...[gi:6177866]

Malassezia globosa DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7966.

- AB019343. Malassezia globos...[gi:6177867]

Malassezia globosa DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7990.

- AB019345. Malassezia sympod...[gi:6177869]

Malassezia sympodialis DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7222.

- AB019346. Malassezia sympod...[gi:6177870]

Malassezia sympodialis DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7977.

- AB019347. Malassezia sympod...[gi:6177871]

Malassezia sympodialis DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM2452.

- AB019348. Malassezia slooff...[gi:6177872]

Malassezia slooffiae DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7956.

- AB019349. Malassezia slooff...[gi:6177873]

Malassezia slooffiae DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7972.

- AB019350. Malassezia slooff...[gi:6177874]

Malassezia slooffiae DNA, internal transcribed spacer 1, strain CBS7975.

- AF287909. Candida parapsilo...[gi:9802395]

Candida parapsilosis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

- AF172262. *Candida lusitania*...[gi:5732990]

Candida lusitaniae internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

- U66452. *Omphalina rosella*...[gi:2289060]

Omphalina rosella small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, complete sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fig. 3 Alignment of ITS1 sequences of Malassezia spp. The sequences were aligned by using CLUSTER X program.

```
CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

unk02          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
FTIMM1851      GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk10          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk04          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
FTIMM2576      GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk07          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk13          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk06          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
FJM2-52        GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk08          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk09          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk15          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk11          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk14          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
FCBS7982       GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
unk05          GACGGCGC-TACTC-GCGTACAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACAC-AAT-ATCCAC
OCBS7876       GACGGCGCGTACTCCGCGTGAAACGT--CTCTGGCGCCCAACTTTACACCAAT-ATCCAC
SLCBS7972      ---------CACGC-TAACACAACGT--GCCTCTCCCCCAA---TCCACTATTTATCCAC
SLCBS7975      ---------CACGC-TAACACAACGT--GCCTCTCCCCCAA---TCCACTATTTATCCAC
SLCBS7956      ---------CACGC-TA-CACAACGT--GCCTCTCCCCCAA---TCCACTATTTATCCAC
PCBS4165       ----------GATGCGCA-AGCGT--CTCTGGCGCCCAAC---CCACTATACATCCAC
PCBS7044       ----------GATGCGCA-AGCGT--CTCTGGCGCCCAAC---CCACTATACATCCAC
PCBS1879       ----------GATGCGCA-AGCGT--CTCTGGCGCCCAAC---CCACTATACATCCAC
SYCBS7222      ----------GACGCAAACA-CGT--CTCTGGCGCCCAT-----CACTATATCCATAC
SYTIMM2452     ----------GACGCAAACA-CGT--CTCTGGCGCCCAT-----CACTATATCCATAC
SYCBS7977      ----------GACGCAAACA-CGT--CTCTGGCGCCCAT-----CACTATATCCATAC
GCBS7966       ---------GACGT-ACAATAAGTGTGTCTCTGGCGGCTCGTA-TCCACTATACATCCAT
GCBS7990       ---------GACGT-ACAATAAGTGTGTCTCTGGCGGCTCGCA-TCCACTATACATCCAT
RCBS7991       ---------GACGC--CACAAAGTGT--CCCTGGCCGCCTACA-CCCACTATACATCCAC
unk01          ----------------------------------------------------GAC
unk12          ----------------------------------------------------GAC
```

```
unk03            ----------GAC
C.parapsilosis   ----------TGCTTTGG
C.lusitaniae     ----------AAA
O.rosella        ----------ACCTGTGCACATTTGAGACATTGTCCTCCCA

unk02            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCTCG
FTIMM1851        AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCTCG
unk10            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCTC-------AAGAGGCTCA
unk04            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCTCG
FTIMM2576        AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCTCG
unk07            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCTCG
unk13            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCTCG
unk06            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCT-G
FJM2-52          AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCGC-------AAGAGGCT-G
unk08            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTT---GGACCTCTC-------AAGAGGCT-G
unk09            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTA---GGCCTCCTC-------GCGAGGCA-G
unk15            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTA---GGCCTCCTC-------GCGAGGCA-G
unk11            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTA---GGCCTCCTC-------GCGAGGCA-G
unk14            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTA---GGCCTCCTC-------GCGAGGCA-G
FCBS7982         AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTA---GGTCTCCTC-------GCGAGGCA-G
unk05            AAACCCGTGTGCACCGTTTGG---ATGAGTA---GGACTCCTC-------GCGAGGCA-G
OCBS7876         AAACCCGTGTGCACACTGTTG---AGGGGAAAA-GTTTTCTTT-------TGGAAGCTTT
SLCBS7972        AAACCC-TGTGCACCGTGTGG---AAGCGCGTTTGGATTGCT--------AATGGCGTCC
SLCBS7975        AAACCC-TGTGCACCGTGTGG---AAGCGCGTTTGGATTGCT--------AATGGCGTCC
SLCBS7956        AAACCC-TGTGCACCGTGTGG---AAGCGCGTTTGGATTGCTT-------AATGGCGTCC
PCBS4165         AAACCCGTGTGCAC--TTGTG---TTGCTTT-----GCTCCTG-------TATG-GGG-C
PCBS7044         AAACCCGTGTGCAC--TTGTG---TTGCTTTT---TGCCCATG-------TATATGGG-C
PCBS1879         AAACCCGTGTGCAC--TTGTG---TTGCTTT------GGCCTG-------TATG--GG-C
SYCBS7222        CAACCCCTGTGCACTGTGATG---ACGAATG-------TCAT----------
SYTIMM2452       CAAACCCTGTGCACTGTGATG---ACGAATG-------TCAT----------
SYCBS7977        CAACCCCTGTGCACTGTGATG---ACGAATG-------TCAT----------
GCBS7966         AAACCCGTGTGCACTGTT------AAGG--AGTAAGAAAGAAG-------GGGAGGGAGA
GCBS7990         AAACCCGTGTGCACTGTTCT----AAGG--AGTAAGAAAGAAGAAGAAGGGGGAGGGAGA
RCBS7991         AAACCCGTGTGCACTGTCCTTGGAAAGGGCATTTGGAGAGAAAAAGGAAGAGAAGCGAGA
unk01            GAAACAATACACCTAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAA-TCTACG----
```

```
unk12            GAAACAATACACCTAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAA-TCTACG----
unk03            GAAACAATACACCTAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAA-TCTACG----
C.parapsilosis   TAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCC-AGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAATGTCA
C.lusitaniae     AATACATTACACATTGTTTTTGC-----GAACAAA--AAAATAAATTTT-TTTATT----
O.rosella        AATGACTTGGGAGCAGCTTTCCTTTCAGTCTCTTCCACGAGACAGAAAGGTTGAGCCAGG
                 *   *

unk02            ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGTT-TGTATGAACGTGGAAATC
FTIMM1851        ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGTT-TGTATGAACGTGGAAATC
unk10            ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGTT-TGTATAAACGTGGAAATC
unk04            ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAATTCGTATGGTG-TGTATGAACGTGGAAATC
FTIMM2576        ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk07            ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk13            ---GTTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGGGGAAATC
unk06            ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
FJM2-52          ---GCTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk08            ---GAGT--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk09            ---ACTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk15            ---ACTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk11            ---ACTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk14            ---ACTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
FCBS7982         ---ACTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
unk05            ---AGTC--TCCAATCCATTTCT-ACCAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
OCBS7876         ---CCCC--TCAAACTC--TTGA-AACAAACTCGTATGGT--TGTATGAACGTGGAAATC
SLCBS7972        ---GGGC--GCCT-TCCTTCTCT-AAAAAACACGCATGTT--TGTATGAACGTGATGGAT
SLCBS7975        ---GAGC--GCCT-TCCTTCTCT-AAAAA-CACGCATGTT--TGTATGAACGTGATGGAT
SLCBS7956        ---GGGC--GCCT-TCCTTCTCT-AAAAA-CACGCATGTT--TGTATGAACGTGATTGAT
PCBS4165         ---GAGA--GCGCACGCATTTA----CAAACTCGTATGGT--TGTATGTACGTTGTAAAC
PCBS7044         ---GAGA--GCGCACGCATTTAT-A-CAAACTCGTATGGT--TGTATGTACGTTGTAAAC
PCBS1879         ---GAG----CGCACGCATTCAA-A-CAAACTCGTATGGT--TGTATGTACGTTGTAAAC
SYCBS7222        ----------CGAACAAA-AAAAA-CTCGTATGGT--TGAATGTACGTG-AAATT
SYTIMM2452       ----------CGAACAAA-AAAAA-CTCGTATGGT--TGAATGTACGTG-AAATT
SYCBS7977        ----------CGAACAAA-AAAAAACTCGTATGGT--TGAATGTACGTG-AAATT
GCBS7966         ---GAG--TGCATGTGCTTTGCATATAACTCTCTCTCTTTC-----TCTTCCTTTCTCTC
GCBS7990         ---GAGAGTGCATGTGCTTTGCATATAACTCTCTCACTCTCCACTCTCTTTCTCTCTCTC
RCBS7991         ACAGTGCGATCCGTCGCGTTGGGCGTTGATCTCTGACTTGG-----TCTCTCTGAGGCCC
```

```
unk01           ----------AAA------AACAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC-TCGC
unk12           ----------AAA------AACAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCATCGC
unk03           ----------AAA------AACAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC-TCGC
C.parapsilosis  ------CC--CGATTATTTAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC-TCGC
C.lusitaniae    ------C---GAATTTCTTAATA-TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC-TCGC
O.rosella       ACAGTGCTTCATCTATTTAAAAAACCAAAACCCTTCAAAGTTCAGTAGAATGTTAATACT

unk02           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
FTIMM1851       GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk10           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk04           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
FTIMM2576       GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk07           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk13           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk06           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
FJM2-52         GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk08           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk09           GTTGGACCGTAAC-TGGGCAACAACCAAT-AATA----------
unk15           GTTGGACCGTAAC-TGGGCAACAACCAAT-AATA----------
unk11           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk14           GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
FCBS7982        GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAACCAAT-AATA----------
unk05           GTTGGACCGTAAC-TGGGCAACAACCAAT-AATA----------
OCBS7876        GTTGGACCGTAAC-TGGCCAACAAACAAACAATA----------
SLCBS7972       GTTGGTTCACAAC-CAACGAACAAAACA----------
SLCBS7975       GTTGGTTCACAAC-CAACGAACAAAACA----------
SLCBS7956       GTTGGTTCACAAC-CAACGAACAAAACA----------
PCBS4165        GTTGGACCGTCAC-TGGCCAACAAACTTT--ATA----------
PCBS7044        GTTGGACCGTCAC-TGGCCAACAAACTTT-TATA----------
PCBS1879        GTTGGACCGTCAC-TGGCCAACAAACTTT--ATA----------
SYCBS7222       GTAGGT--ATAGC-CTACGAACTATACA----------
SYTIMM2452      GTAGGT--ATAGC-CTACGAACTATACA----------
SYCBS7977       GTAGGT--ATAGC-CTACGAACTATACA----------
GCBS7966        TCTGGTTAATTACACAAACTCGTATGGATTTGTATGAACGTGAGATATA----------
GCBS7990        TCCGGTTAATTAC--AAACTCGTATGGATTTGTAT----------
RCBS7991        TTTCCTCGCT-AC--AAACTCGAATGG-TTAGTA----------
```

```
unk01             ATCGATGAAGAACGCAGCGAAA-----------------------------------
unk12             ATCGATGAAGAACGCAGCGAAA-----------------------------------
unk03             ATCGATGAAGAACGCAGCGAAA-----------------------------------
C.parapsilosis    ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG---------------------------------
C.lusitaniae      ATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATCGA
O.rosella         GCCGCAAGGCAAC--AATCTAATACAACTTTCAACAACGGATCT----------------
                        *
```


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fig 4 : แสดงผล BLAST Results

Unk02 (300 bp) : > *Malassezia furfur* DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM1851

Unk04 (300 bp) : > *Malassezia furfur* DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM1851.

Unk05 (300 bp) : > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:CBS7982

Unk06 (300 bp) : > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:JM2-52.

Unk07 (300 bp) : > *Malassezia furfur* DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM2576

Unk08 (300 bp) : > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:JM2-52

Unk09 (300 bp) : > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:CBS7982

Unk10 (300 bp) : > *Malassezia furfur* DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM1851

Unk11 (300 bp): > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain: CBS7982

Unk13 (300 bp) : > *Malassezia furfur* DNA, internal transcribed spacer 1, strain TIMM2576

Unk14 (300 bp) : > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:CBS7982

Unk15 (300 bp) : > *Malassezia furfur* genes for 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, 28S ribosomal RNA, partial and complete sequence, strain:CBS7982

Unk1 , Unk 3 & Unk 12 (200 bp): อาจเป็นเชื้อต่าง ๆ ได้ดังนี้

gi|21666828|gb|AF455401.1| *Issatchenkia orientalis* isolate ... 202 8e-50

gi|12862855|dbj|AB054034.1| *Candida krusei* genes for 18S rR... 194 2e-47

gi|23344051|gb|AF536210.1| Yeast isolate H-1008 small subun... 117 4e-24

gi|20531642|gb|AF502835.1| Leaf litter ascomycete strain it... 117 4e-24

gi|20378557|gb|AF444651.1| *Rhodosporidium toruloides* strain... 115 1e-23

gi|20378375|gb|AF444314.1| *Sirobasidium magnum* strain CBS 6... 115 1e-23

gi|1518072|gb|U65610.1|BSU65610 *Basidiomycete* from a bamboo... 115 1e-23

gi|4106104|gb|AF042424.1|AF042424 *Sirobasidium magnum* CCJ13... 115 1e-23

gi|20378399|gb|AF444338.1| *Cryptococcus flavus* strain CBS 3... 113 6e-23

gi|20452296|gb|AF444570.1| *Rhodotorula cresolica* strain CBS... 113 6e-23

gi|13810815|gb|AF279885.1|AF279885 *Caloplaca cerina* isolate... 113 6e-23

gi|28200380|gb|AY185811.1| *Aureobasidium pullulans* isolate ... 111 2e-22

gi|27903564|gb|AY188851.1| *Candida humilis* strain CBS 6897 ... 111 2e-22

gi|27802110|gb|AY196001.1| *Candida albicans* 18S ribsomal RN... 111 2e-22

gi|27413427|gb|AY168784.1| *Pichia guilliermondii* strain SE2... 111 2e-22

gi|20452367|gb|AF444641.1| *Rhodotorula nothofagi* strain CBS... 111 2e-22

gi|20452354|gb|AF444628.1| *Rhodotorula yarrowii* strain CBS ... 111 2e-22

gi|20452349|gb|AF444623.1| *Rhodotorula* sp. CBS 8445 18S rib... 111 2e-22

gi|20452300|gb|AF444574.1| *Rhodotorula fujisanensis* strain ... 111 2e-22

gi|20452298|gb|AF444572.1| *Rhodotorula fujisanensis* strain ... 111 2e-22

gi|20452269|gb|AF444543.1| *Sporobolomyces falcatus* strain C... 111 2e-22

gi|20452263|gb|AF444537.1| *Rhodotorula nothofagi* strain CBS... 111 2e-22

gi|20452259|gb|AF444533.1| *Rhodotorula diffluens* strain CBS... 111 2e-22

gi|20452233|gb|AF444507.1| *Rhodotorula auriculariae* strain ... 111 2e-22

gi|20452216|gb|AF444490.1| *Rhodotorula fujisanensis* strain ... 111 2e-22

gi|24210688|gb|AF492388.1| *Chaenotheca nitidula* specimen-vo... 111 2e-22

gi|22795023|gb|AY125962.1| *Debaryomyces hansenii* var. fabry... 111 2e-22

gi|4106717|gb|AF035675.1| *Lacazia loboi* internal transcribe... 111 2e-22

gi|15419898|gb|AF298131.1| *Chaenotheca laevigata* isolate 21... 111 2e-22

gi|15419897|gb|AF298130.1| *Chaenotheca laevigata* isolate 22... 111 2e-22

gi|15419895|gb|AF298128.1| *Chaenotheca hispidula* 18S riboso... 111 2e-22

gi|15419892|gb|AF298125.1| *Chaenotheca furfuracea* isolate 2... 111 2e-22

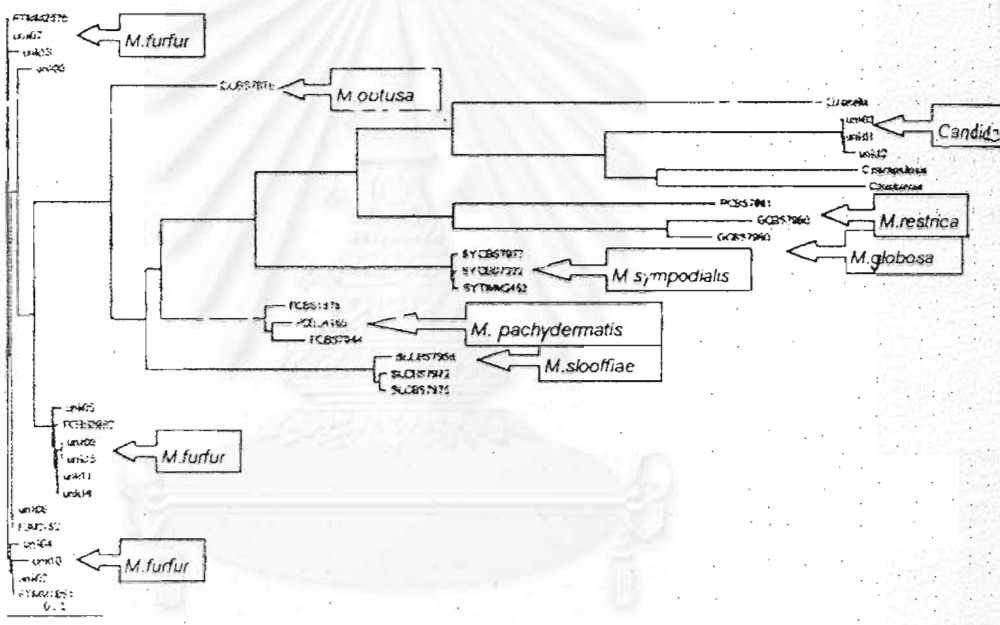
gi|21666968|gb|AF455533.1| *Aureobasidium pullulans* isolate ... 111 2e-22

gi|21666966|gb|AF455531.1| *Candida albicans* isolate wb175 s... 111 2e-22

gi|21666965|gb|AF455530.1| *Candida parapsilosis* isolate wb1... 111 2e-22

gi|21666929|gb|AF455495.1| *Pichia guilliermondii* isolate wb... 111 2e-22

Fig 5 : Cluster analysis of *Malassezia spp.* Based on ITS1 DNA sequences.The phylogenetic tree was constructed from ITS sequence data of *Malassezia spp.*



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาข้อมูลของผู้ป่วย infantile seborrheic dermatitisจำนวน 67 คน พบว่าอายุของผู้ป่วยอยู่ในช่วงน้อยกว่า 2 เดือนมากที่สุด และความชุก (incidence) ของการพบเชื้อ *Malassezia* spp.จากผื่น infantile seborrhic dermatitis เท่ากับ ร้อยละ 20 โดยจำแนกตาม molecular พบเป็น *Malassezia furfur* รวมทั้งสิ้น ร้อยละ 79 และเป็นเชื้อรา กลุ่ม non *Malassezia* spp. ร้อยละ21 บริเวณคิ้วเป็นตำแหน่งที่เพาะเชื้อพบ *Malassezia furfur* มากที่สุด

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาของผู้ป่วยที่มีผลการวินิจฉัยทางคลินิก เป็น infantile seborrhic dermatitis จำนวน 67 คน เป็นเพศชาย ต่อ หญิง เท่ากับ 1 : 1.16 (31 คน : 36 คน) และอายุของผู้ป่วยช่วงที่พบมากที่สุด คือ ช่วงน้อยกว่า 2 เดือน(ร้อยละ 64) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศพบว่าอายุเฉลี่ยในคนไทยต่ำกว่า การศึกษาของ Anders T และ คณะ[9] และ Broberg A และ คณะ[8] จาก สวีเดน พบว่าอายุเฉลี่ยที่พบเป็น 11.2 และ 9 สัปดาห์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาเรื่องการกระจายของผื่น infantile seborrheic dermatitis ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีตำแหน่งของผื่นอยู่ 1หรือ 2 ตำแหน่งคิดเป็นปริมาณ ร้อยละ 45 และร้อยละ 48 ตามลำดับ ส่วนน้อยที่พบมากกว่า 2 ตำแหน่ง (ร้อยละ 7) เท่านั้น เมื่อแยกตามส่วนของร่างกายพบว่าในกลุ่มที่มีผื่นอยู่ประมาณ 1 ตำแหน่ง ที่บริเวณศีรษะ พบมากที่สุด คิดเป็น ร้อยละ 57 ส่วนบริเวณคิ้ว และหลังหู พบได้ ในอัตราส่วนใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 20 และ 23 เทียบกับกลุ่มที่มีพบผื่นมากกว่า 2 ตำแหน่ง บริเวณศีรษะพบผื่นได้พอกันกับบริเวณ หลังหู ร้อยละ 34และ 38 ตามลำดับ จากข้อมูลนี้ทำให้ทราบถึงการกระจายของผื่น infantile seborrheic dermatitis ที่พบบ่อยเป็นข้อมูลให้ลดความผิดพลาดในการวินิจฉัยโรคได้ แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มที่แยกเชื้อเป็น *Malassezia* spp. ตำแหน่งหัวคิ้ว เป็นตำแหน่งที่แยกเชื้อ *Malassezia spp.*ได้มากที่สุด รองมาคือบริเวณศีรษะเป็นร้อยละ 55 และ 36 ตามลำดับ จากการสังเกตจากผู้วิจัยพบความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่าง ทั้ง 2 ตำแหน่ง นี้คือ ที่บริเวณศีรษะ ลักษณะผื่นเป็น crust like lesion เวลาขูดขุยมักได้เป็นแผ่นสะเก็ดหนาและแข็งมากกว่า ในขณะที่คิ้วจะได้scale ขุยขาวละเอียดค่อนข้างมาก และสามารถ ใช้ plate contact ที่ผิวหนังได้นานกว่าอีกด้วย

การเพาะเชื้อผู้ป่วย infantile seborrheic dermatitis ทั้ง 67 คน พบว่าสามารถเพาะเชื้อ *Malassezia* spp.ได้ 14 คน (ร้อยละ 20) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในต่างประเทศพบว่าการตรวจพบเชื้อ *Malassezia* spp. ในรายงานนี้ต่ำกว่ามาก การศึกษาของBroberg A และคณะ[1] จาก สวีเดนพบว่าอุบัติการของการพบเชื้อ *Malassezia* spp.สูงถึงร้อยละ 90 และการศึกษาที่แมกซิโก ของ Maldonado RR และคณะ[25] และ Nakabayashi A และคณะ[11] ศึกษาที่ญี่ปุ่นพบว่า incidence ของการพบเชื้อ *Malassezia* spp. เท่ากับร้อยละ 73 และ 48 ตามลำดับ ความแตกต่างนี้คงไม่สามารถสรุปได้ว่าอุบัติการการพบเชื้อ *Malassezia* spp.ในเด็กไทยพบได้น้อยกว่า เนื่องจากมีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการ ซึ่งอธิบายได้โดย

1. มีความแตกต่างในการเก็บเชื้อ การศึกษาอื่นใช้ transport media ที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลต่อโอกาสที่เชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีกว่า
2. ความแตกต่างของเทคนิคในการขูดเพาะเชื้อ และเวลาที่ contact plate สัมผัสกับผิวหนังอาจไม่เพียงพอ
3. ความแตกต่างของเทคนิคและความชำนาญในการเพาะเชื้อในแต่ละห้องปฏิบัติการ
4. อาจเป็นเพราะอุปนิสัยการใช้ชีวิตประจำวัน

เชื้อ *Malassezia* spp.ที่ได้จะถูกนำมาผ่านกระบวนการ Molecular identification characterization แยก species พบว่าพบเชื้อ *Malassezia furfur* 11 คนในจำนวน 14 คนคิดเป็นร้อยละ 79 และทั้งหมดนี้เป็นรายที่ขนาดของ PCR products ที่ได้จากบน agarose gel electrophroresis (Figure 1) มีขนาด 300 bp. เทียบกับในการศึกษาของ Koichi makimura และคณะ[19]พบว่า ขนาดของผลิตภัณฑ์ DNA ของเชื้อ *Malassezia* spp. ทั้งหมดอยู่ที่ 162-266 bp. ส่วนรายที่ขนาด PCR products เป็น 200 bp. ทั้ง 3 คน จาก 14 คน (ร้อยละ 21) พบเป็น non *Malassezia* spp . และเมื่อพิจารณาจาก Figure 3 จะเห็นได้ว่า ทุกตัวอย่างที่ไม่ทราบ จะมีส่วนของรหัสพันธุกรรมที่ตรงกันกับรหัสพันธุกรรมมาตรฐานของ *Malassezia* spp. เว้นตัวอย่างที่ 1, 3 ,12 ที่ไม่ตรงกันกับรหัสมาตรฐานใดๆ เลย ซึ่งแปลความหมายได้ว่าตัวอย่างเหล่านี้ไม่ใช่กลุ่มของ *Malassezia* spp.

การศึกษาของ Nakabayashi A. และคณะ[11] พบว่าผื่น seborrhic dermatitis เป็นเชื้อ *Malassezia globosa* ร้อยละ 21, *Malassezia furfur* ร้อยละ 21, *Malassezia sympodialis* ร้อยละ 6 , ปนเปื้อนร้อยละ 21 และเพาะเชื้อให้ผลลบร้อยละ 31 บอกได้ว่าการกระจายความหลากหลายของเชื้อ *Malassezia* .ในเด็กไทยต่างจากในต่างประเทศ *Malassezia furfur* เป็น

species หลักที่พบเพียงชนิดเดียว ส่วนการที่พบเชื้อนอกเหนือจากกลุ่ม *Malassezia* spp. คิดเป็นร้อยละ 21 คิดว่าเป็นจากปนเปื้อนมากกว่า

ผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา มีส่วนสำคัญที่จะทำให้เกิดความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้ แม้จำนวนผู้ป่วยจะได้มากกว่าจำนวนตัวอย่าง sample ที่ทำให้ค่า incidence of เชื้อ *Malassezia* spp.ในผื่น Infantile seborrheic dermatits มีความเชื่อถือได้แล้วนั้น แต่ด้วยจากที่เราได้ค่า incidence of เชื้อ *Malassezia* spp.น้อย ไม่ว่าจะเป็นจากปัจจัยใดๆก็ตาม เมื่อเทียบกับการศึกษาอื่นๆ จึงส่งผลให้นำมาแยกชนิดเป็น species ต่างๆ มีจำนวนน้อยตามไปด้วย

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยครั้งต่อไป

เนื่องจากจำนวนประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 67 ราย ทำให้การแปลผลต่างๆ มีน้ำหนักในความน่าเชื่อถือค่อนข้างน้อย แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในเด็กไทย ผู้วิจัยหวังว่าถ้าสามารถเก็บรวบรวมข้อมูลได้จำนวนมากขึ้น รวมถึงถ้ามีวิธีการใหม่ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเชื้อให้มีมากขึ้น ก็จะสามารถได้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น และนำมาใช้เป็นสถิติอ้างอิงในเด็กไทยเทียบกับประเทศอื่นๆได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Broberg A . Pityriasis ovale in healthy children , Infantile seborrheic dermatitis ,atopic dermatitis . Acta Derm Venereol Suppl . 1995 ; 191 : 1-47.
2. Odom RB, James WD, Berger TG. Seborrheic dermatitis . In Fathman EM.ANDREWS' diseases of the skin: clinical dermatology.Philadelphia : W.B.Saunders Company . 2000 : 214-218.
3. Sidney Hurwitz . Eczematous eruption in childhood , Seborrheic dermatitis . In Hurwitz pediatric dermatology 2nd ed . Philadelphia : W.B.Saunders Company . 1993: 62-63.
4. Martin AG, Kobayashi GS. Yeast infections: Candidiasis, Pityriasis versicolor. In : Freeburg IM .Dermatology in General Medicine 5 th ed. Newyork : McGraw – Hill . 1999 : 2358-2371.
5. Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus Malassezia with description of 4 new species. Antonie Van Leeumenhoek .1996 ; 69: 337-355.
6. Guillot J. Gueho E. The divesity of Malassezia yeasts confirm by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie Van Leeumenhoek.. 1995; 67:297 –314.
7. ปรียา ทัศนประดิษฐ์. Eczema , Seborrhic dermatitis. ใน โรคผิวหนังในเด็ก 1st ed.Bangkok : ยูนิตี้พับลิเคชัน . 2529 :76-77.
8. Broberg . A, Faergemann J .Infantile seborheic dermatitis Pityriasis ovale. Br J dematol 1989 ; 120 :359 – 362.
9. Anders T, Anders F , Stenlund K . Malassezia furfur in Infantile seborrheic dermatitis . Pediatr dermatol . 1997 ; 14 : 423-425.
10. Guillot J. Gueho E., Lesourd M, et al. Identification of Malassezia species, A practical approach. J Mycol Med 1996 ; 6 : 103-110.
11. Nakabayashi A , Sei Y, Guiuot J. . Identification of Malassezia species isolated from patients with seborrheic dermatitis ;atopic dermatits , pityriasis versicolor and normal subjects. J Mycol Med. 2000 ;38 : 337-341.
12. Bergbrant IM. seborrheic dermatitis Pityriasis ovale ; cultural immunological and clinical studies . Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) .1991 : 1-36.

13.Gupta AK , Kohli Y, Summerbell RC .Molecular differentiation Of seven Malassezia species . J clin Microbiol. 2000 : 1869-1875.

14.Faergemann J, Bergrant IM , Dohse M. Seborrheic dermatitis and Pityrosporum (Malassezia) folliculitis characterization of inflammatory cell and mediators in the skin by immunohistochemistry . Br J Dermatol . 2001 ; 144 : 549-556.

15.Parry ME, Sharpe GR. Seborrheic dermatitis is not caused by an altered immune response to Malassezia yeast. Br J Dermatol. 1998 ; 139 : 254-63

16.Abeck D. , Mohrenschlager M. What's new in diagnosis and therapy of dermatomycoses in childhood. Mycoses .2000 ; 43 suppl 2 : 41-43.

17.Ottolenghi A, Chiara DA, Gerosa ER, Finazzi E. Infantile seborrheic dermatitis and related syndromes. Diagnostic and pathologenetic problems. Pediatr Med Chir. 1987 ; 9 : 163-8

18.Gueho E , Boekhout T, Ashbee HR. The role of Malassezia species in the ecology of human skin and aspathogens . Mycol Med 1998; 36 suppl 1: 220-229.

19.Marcon MJ, Powell DA. Human infection due to Malassezia spp. Clinical Microbiol 1992 ; 5 : 101-119.

20.Kieffer M, Bergbrant IM , Faergemann J et al. Immune reaction to pityrosporum ovale in adults patients with atopic dermatitis and seborrheic dermatitis. J Am Acad Dermatol 1990; 22:739-742.

21.Nakabayashi A. Identification of causative in malassezia – associated dermatoses.Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2002 : 43 : 65-8

22.Andersen BH, Bengtsson B, Bogelund L. Septicemia caused by Malassezia furfur.Ugeske Laeger. 1993 ; 155 : 2154-5

23.Sei Y, Hamaguchi T, Ninomiya J, Nakabayashi A, Takiuchi I. Seborrheic dermatitis : treatment with anti- mycotic agents. J Dermatol. 1994 ; 21 : 334-40

24.Makimura K , Tamira Y, Kudo M, Uchida K, Saito H,and Yamakuchi H. Species identification and strain typing of Malassezia species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. Mycol Med. 2000 :49 :29-35.

25.Maldonado RR, Matinez LR,ChavarriaEL, Castanon RL, Tamayo L.Pityrosporum ovalae in infantile seborrheic dermatitis. Pediatr Dermatol.1989 ; 6 : 16-20

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาทางคลินิก : การศึกษาการแยก species ของเชื้อ Malassezia โดยวิธีทางชีวโมเลกุลในผู้ป่วยเด็กที่เป็น infantile seborrheic dermatitis

เรียนผู้ปกครองของผู้ป่วยทุกท่าน

ผื่น Infantile seborrheic dermatitis เป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในเด็กเล็ก โดยเฉพาะอายุน้อยกว่าหนึ่งปี มีลักษณะเฉพาะเป็นสะเก็ดสีเหลืองหรือน้ำตาลบนผิวหนังแดง โดยโดยไม่มีตุ่มน้ำหรือตุ่มหนองที่บริเวณศีรษะ หัวคิ้ว แก้ม และผิวหนังบริเวณหน้าหูและหลังหู ซึ่งยังไม่ทราบว่าผิวหนังนี้เกิดจากสาเหตุใดแน่ชัด มีสมมติฐานเกี่ยวกับสาเหตุของผื่นผิวหนังอักเสบนี้เพื่อให้ได้ทราบและเป็นแนวทางในการรักษาปัจจัยที่เป็นที่สนใจกันอย่างมาก ขณะนี้คือการเติบโตของเชื้อยีสต์ Malassezia spp. ที่เป็นเชื้อที่พบอยู่บนผิวหนังของคนปกติทั่วไปอยู่แล้วว่าเป็นสาเหตุหรือปัจจัยเกี่ยวข้องกับผื่น seborrheic dermatitis ด้วยหรือไม่

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าความเป็นจริงแล้ว ผื่นผิวหนังอักเสบชนิดนี้ในประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับเชื้อยีสต์ Malassezia spp. อย่างไรและเป็นชนิดสายพันธุ์ใด เพื่อจะได้ใช้ประโยชน์ในการหายารักษาจำพวกใหม่ เพื่อช่วยลดอาการข้างเคียงในระยะยาวที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาที่เคยใช้เป็นประจำอยู่เดิมได้

บุตรหลานของท่านจะได้รับการตรวจร่างกายและการขูดขุยบริเวณผื่นผิวหนัง ดังกล่าวไปเพาะหาเชื้อ การตรวจทำโดยใช้แอลกอฮอล์ทำความสะอาดบริเวณผื่น ใช้สันมีดที่ไม่คมและปราศจากเชื้อขูดเบาๆโดยไม่ทำให้เกิดแผลบริเวณผื่น และผู้ป่วยจะไม่เจ็บ ไม่มีเลือดออก อย่างไรก็ดีถ้ามีเลือดออกเพียงใช้ผ้าก๊อสสะอาดกดไว้เลือดก็จะหยุด วิธีการเหล่านี้ไม่มีอันตรายต่อบุตรหลานของท่าน และเป็นการตรวจซึ่งทำอยู่แล้วเมื่อมาพบแพทย์

ผลของการศึกษาทั้งหมดจะถูกเก็บเป็นความลับ ซึ่งจะเปิดเผยเฉพาะในภาพรวมเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการเท่านั้น ขอรับรองว่าจะไม่มีการเปิดเผยชื่อของเด็กในปกครองของท่านตามกฎหมาย

การศึกษานี้เป็นไปโดยความสมัครใจของข้าพเจ้า ข้าพเจ้ามีอิสระในการปฏิเสธไม่อนุญาตให้ทำการศึกษา โดยบุตรหลานของข้าพเจ้ายังได้รับการดูแลรักษาจากแพทย์ตามปกติ

ข้าพเจ้าได้รับทราบรายละเอียดทั้งหมด และลงลายมือชื่อไว้เป็นหลักฐานโดยทราบว่าผู้ที่รับผิดชอบในการศึกษานี้คือแพทย์หญิงจัญจุรี สมาธิ pager 1500-121945 ซึ่งยินดีตอบข้อข้องใจให้ข้าพเจ้าทุกเมื่อ

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมาในที่นี้

ลงชื่อ

……

(……..)

วันที่……..……

ลงชื่อ……..

(แพทย์หญิงจัญจุรี สมาธิ)

วันที่……..

ลงชื่อพยาน……

(……)

วันที่……..

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Case Record Form

Molecular differentiation of Malassezia spp. In Infantile seborrheic dermatitis

ชื่อ – นามสกุล..... อายุ.....ปี

HN..... ชาย ☐ หญิง ☐

โทรศัพท์..... Date.....

lesion scalp

ear RT LT

eye brow RT LT

other

culturefrom.....

.....

NOTE

Severity + (mild) ,++(modurate) ,+++ (severe)

Crust (C) , Erythema (R) , Scale (S)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจัญจุรี สมาธิ เกิดวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2519 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัย มหิดล ปีการศึกษา 2540 หลังจากนั้นได้เข้ารับราชการในกองทัพอากาศ ที่โรงพยาบาลจันทรุเบกษา จังหวัดนครปฐม เป็นเวลา 1 ปี และโรงพยาบาลกองบิน 41 จังหวัดเชียงใหม่ เป็นเวลา 2 ปี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขากุมารเวชศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2545 ปัจจุบันเป็นแพทย์ประจำบ้าน ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย