

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# เปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมีกับวิธี PCR amplification ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดี

เพราพิลาศ อินตะยศ, และ สิริดา ยังฉิม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ต้องการจำแนกเชื้อ *Malassezia* ในระดับสปีชีส์ โดยการเปรียบเทียบวิธีทางชีวเคมีกับวิธี PCR โดยนำเชื้อ *Malassezia* จำนวน 173 isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคเกลื้อน 8 ราย และจากคนที่มีสุขภาพดี 165 ราย มาทำการศึกษา ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Malassezia* จำนวนร้อยละ 73.41 (127/173) นั้นให้ผลการจำแนกในระดับสปีชีส์ ที่สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี โดยสามารถจำแนกเชื้อ *Malassezia* ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis* และ *M. slooffiae* นอกจากนี้พบว่าร้อยละของความสอดคล้องทั้ง 2 วิธีนั้นเพิ่มสูงขึ้นในเชื้อ *M. furfur* และ *M. sympodialis* เท่ากับร้อยละ 81.94 และร้อยละ 77.63 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Malassezia* จำนวนที่เหลืออีก 46 isolates นั้นพบว่าต้องใช้วิธี PCR amplification เท่านั้น ในการจำแนกสปีชีส์ และได้ทำการตรวจสอบยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (genomic sequencing) พบเป็นเชื้อ *Malassezia* 6 สปีชีส์ ได้แก่ *M. sympodialis* (ร้อยละ 36.95), *M. furfur* (ร้อยละ 28.26), *M. dermatis* (ร้อยละ 21.74), *M. slooffiae* (ร้อยละ 4.35), *M. globosa* (ร้อยละ 4.35) และ *M. japonica* (ร้อยละ 4.35) จากผลการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าวิธี PCR นั้น มีศักยภาพในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมี และอย่างไรก็ตามวิธีทางชีวเคมีเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* ในที่ที่ยังไม่มีวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ให้ใช้ **เชียงใหม่เวชสาร 2559;54(ฉบับเสริม 1):31-43.**

**คำสำคัญ:** โรคเกลื้อน เชื้อ *Malassezia* สปีชีส์ PCR การทดสอบทางชีวเคมี

## บทนำ

โรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor หรือ Tinea versicolor) เป็นโรคผิวหนังเกิดจากการติดเชื้อ *Malassezia* spp. พบที่บริเวณผิวหนังด้านนอกชั้น

stratum corneum<sup>[1]</sup> ลักษณะโรคเกลื้อนจะพบผื่นที่ผิวหนังรูปวงกลมหรือวงรี ลักษณะแบนราบ มีขอบเขตชัดเจน ผิวด้านในของผื่นจะไม่เรียบ พบลักษณะ

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ: สิริดา ยังฉิม, Ph.D. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200, ประเทศไทย อีเมล: syoungchim@gamil.com

วันรับเรื่อง 4 ธันวาคม 2557; วันยอมรับการตีพิมพ์ 22 กรกฎาคม 2558

เป็นขุยละเอียดมีสีจางหรือเข้มกว่าสีของผิวหนังปกติ และพบได้มากบริเวณด้านบนของลำตัว คอ และแขน<sup>[2]</sup> โรคนี้มีรายงานพบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะบริเวณที่มีภูมิอากาศร้อนขึ้นจะพบความชุกของโรคได้มากกว่าบริเวณที่มีภูมิอากาศหนาวเย็น<sup>[3,4]</sup> ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อ *Malassezia* spp. เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) บนผิวหนังของคนและสัตว์เลือดอุ่น<sup>[5]</sup> เมื่อมีปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญได้มากขึ้น เช่น อุณหภูมิสูง เหงื่อออกมากกว่าปกติ (hyperhidrosis)<sup>[6]</sup> โดยปัจจัยเหล่านี้จะทำให้เชื้อเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์ยีสต์รูปร่างกลมรีที่มีมักพบเมื่อเป็นเชื้อประจำถิ่น บนผิวหนังให้มีการงอกเป็นสายราซึ่งมักพบได้จากบริเวณรอยโรคบนผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อน

เชื้อในสกุล *Malassezia* (เดิมชื่อ *Pityrosporum*) เป็น lipophilic yeast ที่ต้องการไขมันในการเจริญ มีรูปร่างกลมและรี ลักษณะคล้ายขวิด มีผนังเซลล์หนาและมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อจากเซลล์แม่ที่ขั้วเดียวบนฐานที่กว้าง เรียกลักษณะที่พบว่า unipolar budding yeast<sup>[7]</sup> โดยทั่วไปเชื้อ *Malassezia* spp. เป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังของคนและสัตว์เลือดอุ่น สามารถแยกเชื้อได้จากผิวหนังชั้นนอกสุดซึ่งบริเวณที่พบเชื้อได้มากที่สุดคือ ส่วนบนของอก หลัง แขน และคอ<sup>[8]</sup> ปัจจัยภายในร่างกายที่มีส่วนสำคัญต่อการก่อโรคของเชื้อและปรากฏอาการให้เห็นเช่น ภาวะทุพโภชนาการโดยเฉพาะการขาดสารอาหารที่พบในเด็กหรือวัยรุ่นที่จะมีผลทำให้กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันไม่สมบูรณ์<sup>[9]</sup> รวมทั้งการใช้ยากดภูมิคุ้มกันของร่างกาย<sup>[10]</sup> ทั้งนี้ยังพบว่าพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคซึ่งพบในคนที่มีการหลุดลอกของผิวหนังช้ากว่าปกติ<sup>[11]</sup> โดยปัจจัยเหล่านี้จะช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *Malassezia* spp. มีการเจริญได้มากขึ้นและส่งผลให้เชื้อเปลี่ยนรูปร่างจาก

เซลล์ยีสต์ที่มีรูปร่างกลมรีงอกเป็นสายราที่สามารถก่อโรคและมักพบในรอยโรคบนผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุหรือกลไกที่แน่ชัดในการชักนำการเปลี่ยนรูปร่างของเชื้อ

เชื้อ *M. alassezia* spp. แยกชนิดได้เป็น 14 สปีชีส์

โดยอาศัยความแตกต่างทางด้านรูปร่าง การทดสอบทางชีวเคมี และคุณสมบัติในระดับโมเลกุล และพบว่า 9 สปีชีส์สามารถก่อโรคในคน ได้แก่ *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. dermatis*, *M. japonica* และ *M. yamatoensis* และมี 4 สปีชีส์ ที่ก่อโรคในสัตว์ ได้แก่ *M. equina*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. cuniculi* และ 1 สปีชีส์ คือ *M. pachydermatis* สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์<sup>[12]</sup> สำหรับเชื้อ *Malassezia* พบว่าเชื้อ *M. globosa* เป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในโรคเกลื้อน<sup>[13-15]</sup> โดยได้มีการศึกษาเพื่อแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี (biochemical test) และวิธี PCR amplification

จากการศึกษาด้านระบาดวิทยาพบว่าเชื้อสาเหตุหลักในการก่อโรคเกลื้อนในประเทศต่าง ๆ คือ *M. globosa* ในปี ค.ศ. 2000 Nakabayashi และคณะ<sup>[13]</sup> ได้ทำการแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. จากรอยโรคที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อนในประเทศญี่ปุ่น จำนวน 22 ราย นำมาจำแนก สปีชีส์ด้วยวิธีทางชีวเคมีได้แก่ การสร้างเอนไซม์ catalase การใช้ Tween 20, 40, 60, 80 และ Cremophor EL ร่วมกับการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ พบเชื้อ *M. globosa* เป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคเกลื้อน ร้อยละ 55 (12 ราย), *M. sympodialis* ร้อยละ 9 (2 ราย), *M. furfur* ร้อยละ 5 (1 ราย), *M. slooffiae* ร้อยละ 5 (1 ราย) และ *M. pachydermatis* ร้อยละ 1 (1 ราย) สอดคล้องกับในประเทศสเปนซึ่งพบว่าเชื้อ *M. globosa* เป็นเชื้อสาเหตุหลักของการก่อ

โรคเกื้อกันเช่นกัน โดยได้ทำการแยกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. จากผู้ป่วยโรคเกื้อกันจำนวน 96 ตัวอย่าง ซึ่งพบเชื้อ *M. globosa* ร้อยละ 60 (58 ราย), *M. sympodialis* ร้อยละ 3.1 (3 ราย) และพบเชื้อ *M. sympodialis* และ *M. slooffiae* ร่วมกับ *M. globosa* ร้อยละ 37 (35 ราย)<sup>[16]</sup> นอกจากนี้ในการศึกษาของ Aspiroz และคณะในปี ค.ศ. 2002<sup>[14]</sup> ได้ทำการแยกเชื้อจากผู้ป่วยโรคเกื้อกันจำนวน 79 ราย แล้วนำมาจำแนกชนิดด้วยการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อและวิธีทางชีวเคมี พบเชื้อ *M. globosa* ร้อยละ 58.2, *M. sympodialis* ร้อยละ 10.1 และพบเชื้อ *M. globosa* ร่วมกับ *M. sympodialis* ร้อยละ 30.4, *M. globosa* ร่วมกับ *M. slooffiae* ร้อยละ 1.3 ซึ่งผลการศึกษานี้ช่วยยืนยันว่าเชื้อ *M. globosa* เป็นเชื้อสาเหตุของโรคเกื้อกันที่พบบ่อยที่สุด ต่อมาเมื่อ Morishita และคณะในปี ค.ศ. 2006<sup>[15]</sup> ได้จำแนกชนิดของเชื้อ *Malassezia* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกื้อกันจำนวน 49 ราย ด้วยวิธี nested PCR ซึ่งใช้ primers 2 คู่ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน intergenic spacer หรือ internal transcribed spacer ของยีน rRNA ผลการทดลองพบเชื้อ *M. globosa* ร่วมกับเชื้อ *M. restricta* ร้อยละ 93.9, *M. sympodialis* ร้อยละ 34.6, *M. dermatis* ร้อยละ 24.4

การจำแนกเชื้อ *Malassezia* ในระดับสปีชีส์นั้น พบว่ามีการเลือกใช้วิธีทางชีวเคมี หรือวิธี PCR amplification อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่ในการศึกษาคั้งนี้ต้องการเปรียบเทียบวิธีทางชีวเคมี และ PCR amplification ในการจำแนกสปีชีส์เชื้อ *Malassezia* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคเกื้อกันและคนที่มีสุขภาพดี เพื่อดูความสอดคล้องของ 2 วิธีนี้ ในการจำแนกสปีชีส์ ของเชื้อ *Malassezia*

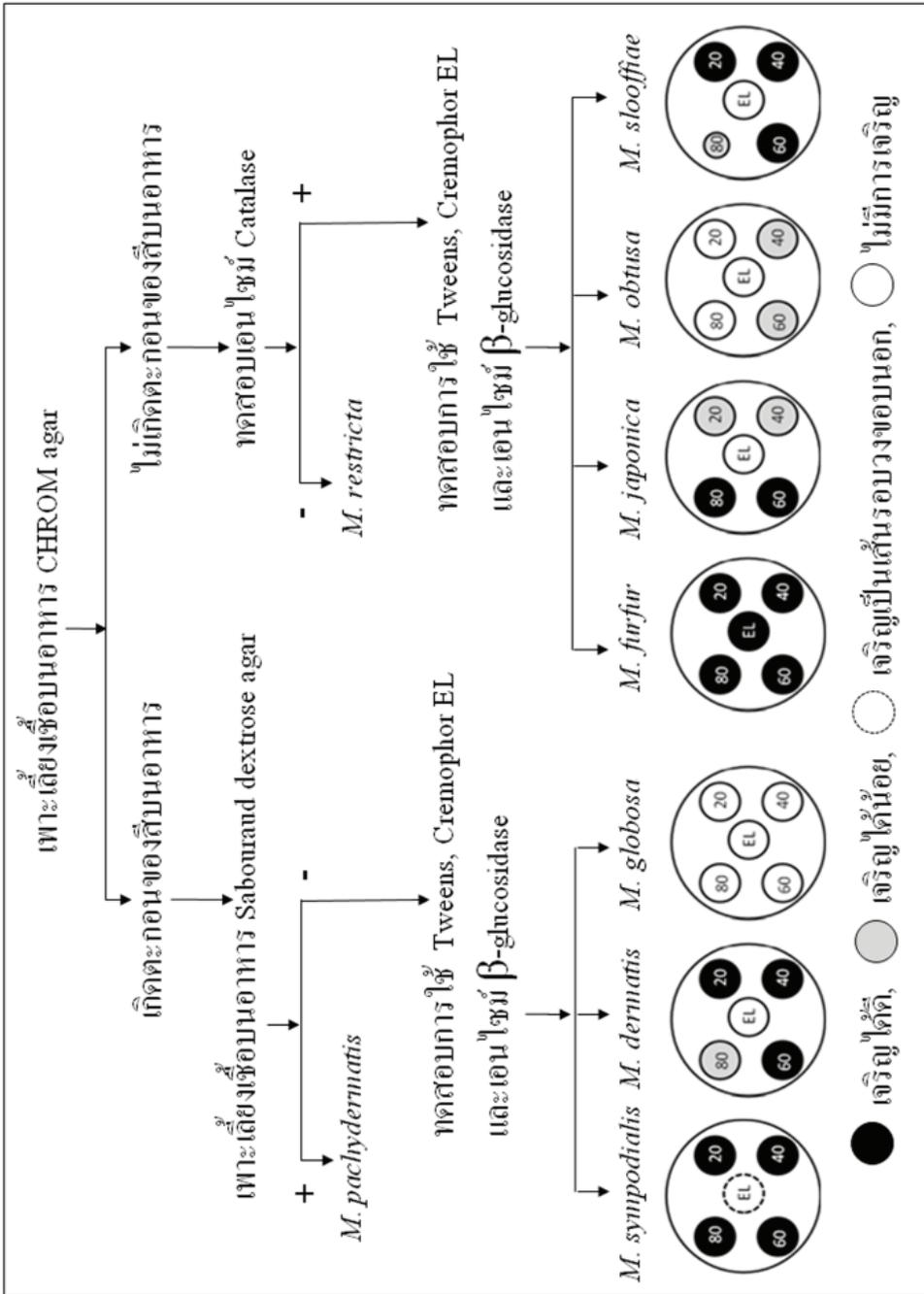
## วิธีการทดลอง

### 1. การแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ *Malassezia* spp.

เก็บตัวอย่างเชื้อจากรอยโรคที่ผิวหนังผู้ป่วยโรคเกื้อกันจากคลินิกโรคผิวหนังโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และตัวอย่างเชื้อจากผู้ที่มีสุขภาพดีในช่วงระยะเวลาปี พ.ศ. 2553-2556 ซึ่งได้เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเกื้อกันจำนวน 8 ราย และคนสุขภาพดีจำนวน 165 ราย โดยผ่านความเห็นชอบให้ดำเนินการวิจัย โดยคณะกรรมการพิจารณาด้านจริยธรรมในการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยนำขุยที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกื้อกันและตัวอย่างจากผิวหนังปกติที่เก็บด้วยวิธี scotch tape มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร modified Dixon agar (0.6% malt extract, 1% bacteriological peptone, 2% desiccated ox bile, 1% Tween 40, 0.2% glycerol, 0.2% oleic acid, 0.05% chloramphenicol, 0.05% cycloheximide, 1.5% agar pH 6.0) แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5-7 วัน

### 2. วิธีการจำแนกสปีชีส์ ของเชื้อ *Malassezia* spp.

2.1 วิธีการจำแนกสปีชีส์ เชื้อ *Malassezia* spp. โดยดูลักษณะโคโลนีทางกายภาพและการทดสอบทางชีวเคมี (phenotypic and biochemical test)<sup>[17]</sup> ในการจำแนกเชื้อ *Malassezia* ในระดับสปีชีส์ ใช้การสังเกตลักษณะทางกายภาพของโคโลนี และการทดสอบทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบเอนไซม์ catalase,  $\beta$ -glucosidase (ในการย่อยสลาย esculin) และความสามารถในการใช้ Tween 20, 40, 60 และ 80 รวมทั้ง Cremophor EL (แผนผังที่ 1)



แผนผังที่ 1. การแยกชนิดของเชื้อ Malassezia ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)<sup>[17,18]</sup>

2.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CHROM agar

ทำการตรวจคัดกรองเชื้อ *Malassezia* spp. เพื่อแยกออกจากเชื้อเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่นด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร modified Dixon agar ลงบน CHROM agar (BBLTM) ที่เติม

tween 40 ลงไป<sup>[18]</sup> แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นระยะเวลา 5-7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร เชื้อ *Malassezia* spp. จะมีโคโลนีสีชมพู ผิวหน้าย่นเป็นลักษณะเด่นที่ทำให้สามารถจำแนกเชื้อจากยีสต์ชนิดอื่น ๆ ได้ อีกทั้งสามารถแยกชนิด

ของเชื้อ *Malassezia* spp. โดยสังเกตการเกิดตะกอนของสีที่บริเวณโคโลนีของเชื้อบนอาหาร<sup>[19]</sup>

2.1.2 การเจริญบนอาหาร Sabouraud dextrose agar

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Malassezia* spp. บนอาหาร Sabouraud dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร พบว่าเชื้อ *M. pachydermatis* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้

2.1.3 การสร้างเอนไซม์ catalase

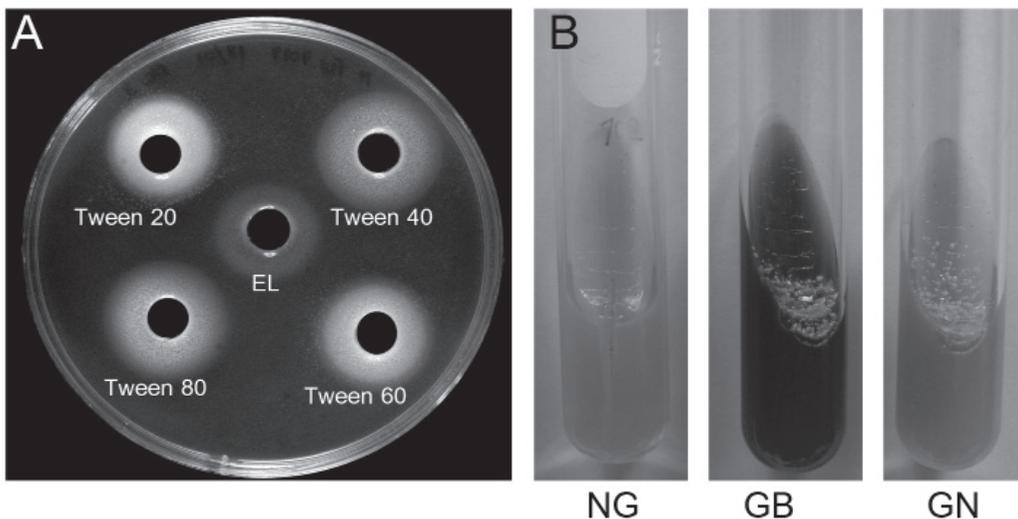
ใช้ห้วงเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ลงไป เชื้อที่สร้างเอนไซม์ catalase จะให้ผลบวกโดยมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งเชื้อ *Malassezia* spp. ทุกสปีชีส์จะให้ผลบวกยกเว้นเชื้อ *M. restricta* ที่ให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์ catalase

2.1.4 การทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase

ใช้ห้วงเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ จากนั้น stab ลงบน esculin agar tube นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ β-glucosidase ได้ จะให้ผลบวกโดยที่ esculin agar tube จะเปลี่ยนเป็นสีดำ ในขณะที่ผลลบไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร (รูปที่ 1)

2.1.5 การใช้ Tweens 20, 40, 60, 80 และ Cremophor EL

ใช้ห้วงเชื้อ *Malassezia* spp. ที่เจริญบนอาหาร modified Dixon agar เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ลงใน sterile deionized water ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland standard number 3.0 จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้นปริมาณ 10<sup>8</sup> เซลล์/มล. จากนั้นใช้เชื้อปริมาตร 2 มล. ผสมกับอาหาร Sabouraud dextrose agar ปริมาตร 18 มล. ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มม. แล้วเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. จำนวน



รูปที่ 1. ภาพการทดสอบการใช้ Tween 20, 40, 60, 80 และ Cremophore EL ที่ให้ผลบวก (A) และการทดสอบ Esculin (B) โดย NG: No growth, GB: Growth and black zone, GN: growth and no black zone

5 หลุม เพื่อหยด Tween 20, 40, 60 และ 80 ตาม เข็มนาฬิกาและหลุมตรงกลางสำหรับ Cremophore EL หลังจากนั้นหยดสารแต่ละชนิดปริมาณ 15 มล. ลงไปในแต่ละหลุม นำไปปั่นเฉพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 °ซ 7-10 วัน อ่านผลโดยสังเกตการ เจริญรอบ ๆ หลุมที่มีการเติม Tween หรือ Cremophore จะพบลักษณะขาวขุ่นรอบ ๆ หลุมถ้าเชื้อ สามารถใช้สารนั้นได้ (รูปที่ 1)

## 2.2 การใช้วิธี PCR amplification

### 2.2.1 การสกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อ *Malassezia* spp.

เลี้ยงเชื้อ *Malassezia* spp. ลง บนอาหาร modified Dixon broth ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3-5 วันแล้วนำเชื้อทั้งหมดมาสกัด ดีเอ็นเอโดยปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS ที่ 4,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ ใส่ microtube ที่มี lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulphate) ปริมาตร 700 มล. และ glass bead ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม. นำไปเข้าเครื่อง mini-beadbeater ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วินาที, 60 วินาทีและ 40 วินาที ตามลำดับ เมื่อเซลล์แตกแล้วจึงทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดสารละลายใสด้านบน จำนวน 300-400 มล.ใส่หลอด microtube ใหม่โดยระวังไม่ให้มีตะกอนปน จากนั้นเติม phenol/ chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร หนึ่งเท่าตัวของสารละลายแล้ว vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาดูด สารละลายด้านบนใส่หลอด microtube ใหม่โดย ระวังไม่ให้มีตะกอนปน จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลาย

แล้วเติม absolute ethanol จำนวนสองเท่าของ ปริมาตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นที่ -20 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่น ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 15 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้งแล้วปั่นล้าง จำนวน 2 ครั้งด้วย 70% ethanol (4 °ซ) ปริมาตร 700 มล. และ 400 มล. ตามลำดับ นำไปปั่นตก ตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีแล้วดูดสารละลายด้านบนทิ้ง จากนั้นเปิดฝา microtube ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้ง แล้วเติม nuclease free water ปริมาตร 100 มล. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยค่าดูดกลืนแสง 260 นาโน เมตร (OD<sub>260</sub>) ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีปริมาณ 100 นก./มล. ด้วย nuclease free water

### 2.2.2 การทำ PCR amplification เพื่อ ตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* spp.

นำดีเอ็นเอที่สกัดแล้วมาตรวจ ยืนยันสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* spp. ด้วยวิธี PCR amplification โดยใช้ primers จำนวน 2 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ intergenic spacer หรือ internal transcribed spacer (ITS) ของยีน rRNA โดยแสดงรายละเอียดของ primers (ตาราง ที่ 1) ซึ่งการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR amplifi- cation จะใช้ Taq DNA polymerase เพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรม โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้มีการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นจำนวน 30 รอบโดยใน แต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 62 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 40 วินาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์สามารถตรวจสอบผล จากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโพรเซซิส โดย

**ตารางที่ 1.** Primers ที่ใช้ในการทำ PCR amplification เพื่อตรวจสอบสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia*

Primer name	Nucleotide sequences (5' → 3')	Length of product (bps)	เอกสารอ้างอิง
<i>M. dermatis</i>			
M.d-F	CGCACCTTGCGCTCCATGGT	136	[15]
M.d-R	AGCCTGGTTTCCCAGGCAGCGG		
<i>M. furfur</i>			
M.f-F	CTACTCGCGTACAACGTCTCTG	230	[20]
5.8S-R	TTCGCTGCGTTCTTCATCGA		
<i>M. globosa</i>			
M.g-F	CAATAAGTGTGTCTCTGCGG	270	[20]
5.8S-R	TTCGCTGCGTTCTTCATCGA		
<i>M. japonica</i>			
M.j-F	CGTATGTGGATCTTATCCTAT	218	[15]
M.j-R	TGACTAGTGTCTAGGCACGGTA		
<i>M. obtusa</i>			
M.ob-F	ACCCGTGTGCACACTGTTGAG	180	[21]
5.8S-R	TTCGCTGCGTTCTTCATCGA		
<i>M. restricta</i>			
M.re-F	CTTGTTGGACCGTCACTGG	320	[20]
M. rt-R	TTCGCTGCGTTCTTCATCGA		
<i>M. slooffiae</i>			
M.sl-F	ACGCACGCTAACACAACGTG	230	[21]
5.8S-R	TTCGCTGCGTTCTTCATCGA		
<i>M. sympodialis</i>			
M.sl-F	CGGACGCAAACACGTCTCTG	190	[20]
5.8S-R	TTCGCTGCGTTCTTCATCGA		
<i>M. yamatoensis</i>			
M.y-F	CGATCAAACCTTCTCTGTGTCCAG	125	[15]
M.y-R	TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA		

แยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกัน ด้วยสนามไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (3% agarose gel) แล้วนำแผ่นวุ้นมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator จะทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอ โดยการวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR ให้ดูแถบดีเอ็นเอ เทียบกับ 50 bps marker ซึ่งผลผลิต PCR จะต้อง มีแถบดีเอ็นเอ ตามขนาดของเชื้อ *Malassezia* ใน แต่ละสปีชีส์ (ตารางที่ 1) ซึ่งการทำ PCR ampli-

fication จะใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *Malassezia* สาย พันธุ์มาตรฐานในแต่ละสปีชีส์เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control

**ผลการทดลอง**

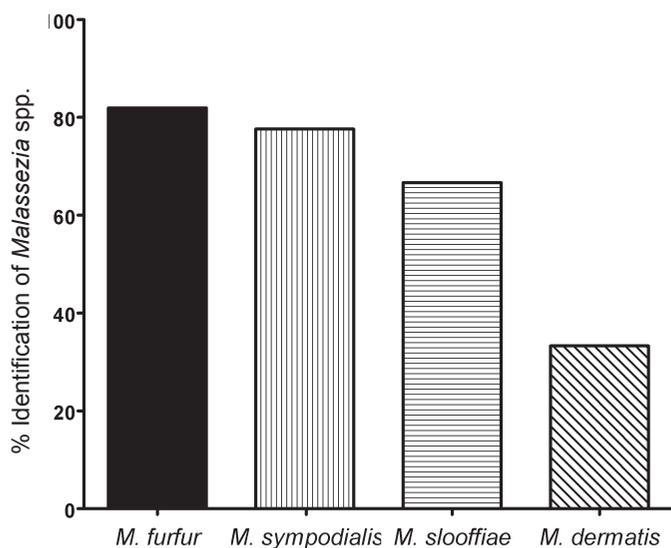
การแยกสปีชีส์เชื้อ *Malassezia* spp. จาก รอยโรคที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเกลื้อนและจากคน สุขภาพดี

เมื่อทำการแยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* spp. จากรอยโรคที่ผิวหนังผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดี จำนวน 173 isolates พบว่าวิธีการทดสอบทางชีวเคมีให้ผลที่สอดคล้องกับวิธี PCR amplification จำนวน 127 isolates (ร้อยละ 73.41) โดยสามารถจำแนกเชื้อ *Malassezia* spp. ออกเป็น 4 สปิซิสได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis* และ *M. slooffiae* (ตารางที่ 2) และเมื่อใช้วิธีทางชีวเคมีอย่างเดียวในการแยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* spp. พบว่า *M. furfur* สามารถใช้วิธีนี้ในการจำแนกได้เท่ากับร้อยละ 81.94 (59/72 isolates) ในขณะที่เชื้อ *M. sympodialis* พบร้อยละ 77.63 (59/76) ส่วนเชื้อ *M. slooffiae* และ *M. dermatis* พบร้อยละ 66.67 (4/6) และร้อยละ 33.33 (5/15) ตามลำดับ (รูปที่ 2) นอกจากนี้พบมีเชื้อ *Malassezia* จำนวน 46 isolates ที่ไม่สามารถแยกสปิซิสด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมีได้แต่พบวิธี PCR สามารถจำแนกเชื้อ *Malassezia* ในระดับสปิซิสได้ โดยสามารถแยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* spp. ได้ถึง 6 สปิซิส ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. globosa* และ *M. japonica* (รูปที่

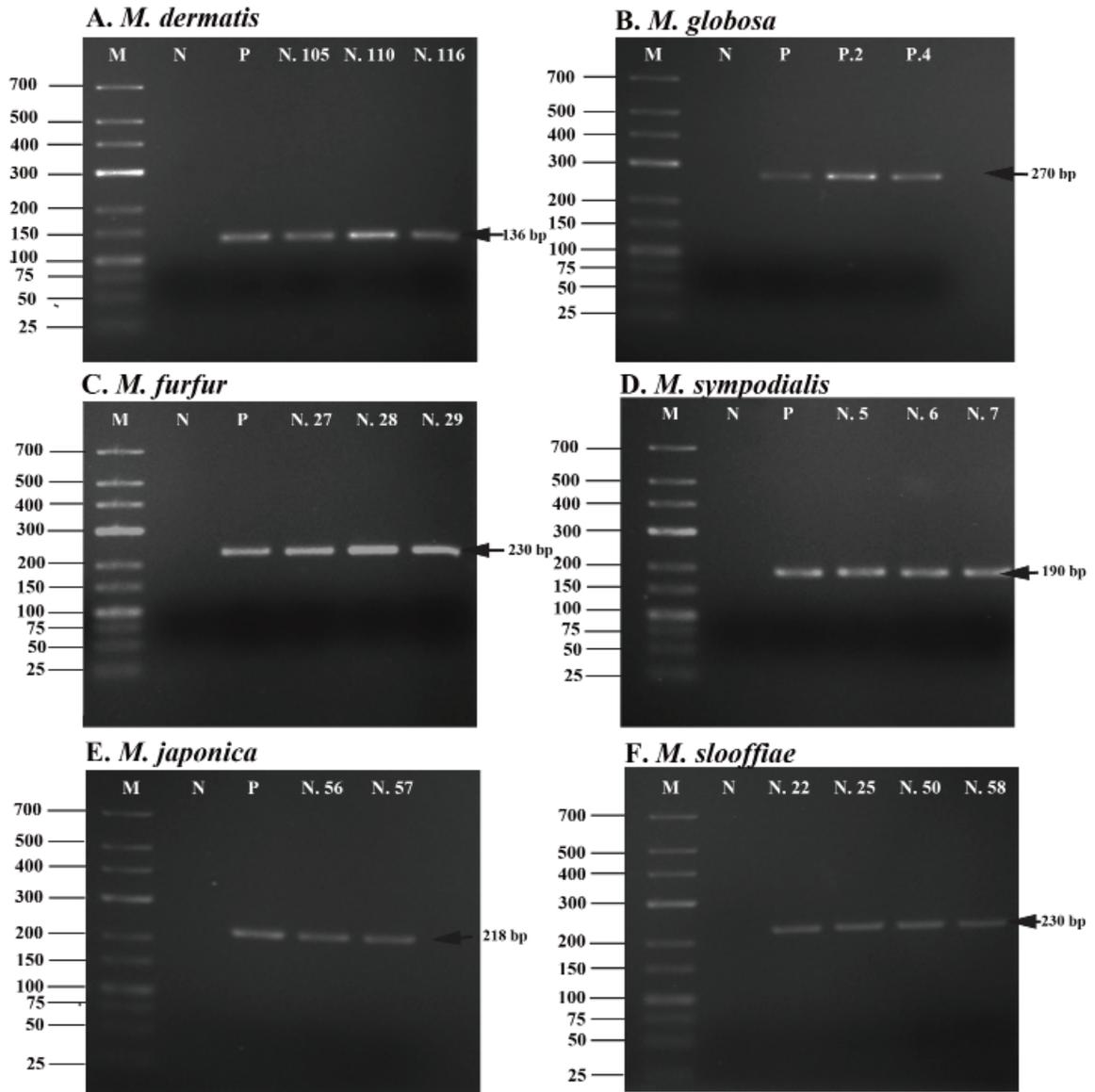
ตารางที่ 2. การแยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* spp. จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและจากคนสุขภาพดี ด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี และวิธี PCR amplification ที่ให้ผลสอดคล้องกัน

สปิซิสของเชื้อ <i>Malassezia</i>	จำนวนของ isolates (ร้อยละ)
<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)
จำนวนทั้งหมด	127(100)

3) โดยพบว่าวิธีทางชีวเคมีไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *M. japonica* และ *M. globosa* ได้ และเชื้อ *Malassezia* ทั้ง 46 isolates เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (genome sequencing) ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับวิธี PCR (ตารางที่ 3) ดังนั้นในการจำแนกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* ทั้งหมดจำนวน 173 isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกลื้อน และคนที่มีสุขภาพดี โดยวิธี PCR พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *Malassezia* ได้ทั้งหมด 6 สปิซิส โดยพบเป็นเชื้อ *M. sympodialis* (ร้อยละ 43.93), *M. furfur* (ร้อยละ 41.62), *M. dermatis* (ร้อยละ 8.65), *M. slooffiae* (ร้อยละ



รูปที่ 2. ร้อยละของเชื้อ *Malassezia* แต่ละสปิซิสที่สามารถแยกชนิดได้ด้วยวิธีทางชีวเคมี



รูปที่ 3. การแยกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* ด้วยวิธี PCR amplification (A) *M. dermatis*, (B) *M. globosa*, (C) *M. furfur*, (D) *M. sympodialis*, (E) *M. japonica* และ (F) *M. slooffiae*; lane M: DNA marker, N: negative control P: reference strains (positive control) และหมายเลขของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบโดยแสดงไว้ที่ด้านบนของแต่ละ lane

3.46), *M. japonica* (ร้อยละ 1.16) และ *M. globosa* (ร้อยละ 1.16) (ตารางที่ 4) และพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย โรคเกลื้อนจำนวน 8 รายนั้นเป็นเชื้อ *M. furfur* จำนวน 6 isolates และ *M. globosa* จำนวน 2 isolates ในขณะที่พบเชื้อ *Malassezia*

จำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ *M. sympodialis* (76 isolates), *M. furfur* (66 isolates), *M. dermatis* (15 isolates), *M. slooffiae* (6 isolates) และ *M. japonica* (2 isolates) จากคนที่มีสุขภาพดี

**ตารางที่ 3.** การแยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* ด้วยวิธี PCR amplification ในเชื้อที่ไม่สามารถแยกสปิซิสด้วยวิธีทางชีวเคมี

สปิซิสของเชื้อ <i>Malassezia</i>	จำนวนของ isolates (ร้อยละ)
<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)
จำนวนทั้งหมด	46 (100)

**ตารางที่ 4.** การแยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* จากคนสุขภาพดีและจากผู้ป่วยโรคเกลื้อน ด้วยวิธี PCR amplification

สปิซิสของเชื้อ <i>Malassezia</i>	จำนวนของ isolates (ร้อยละ)
<i>M. sympodialis</i>	76 (43.93)
<i>M. furfur</i>	72 (41.62)
<i>M. dermatis</i>	15 (8.67)
<i>M. slooffiae</i>	6 (3.46)
<i>M. globosa</i>	2 (1.16)
<i>M. japonica</i>	2 (1.16)
จำนวนทั้งหมด	173 (100)

**สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง**

เชื้อ *Malassezia* spp. จัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบบนผิวหนังของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และเมื่อมีปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญมากขึ้นจะทำให้เชื้อสามารถก่อโรคที่ผิวหนังได้ซึ่งโรคที่เกี่ยวข้องกับเชื้อนี้ ได้แก่ โรคเกลื้อน ดังนั้นจึงมีการศึกษาแยกชนิดเชื้อ *Malassezia* spp. ที่อยู่บนผิวหนังคนสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคเกลื้อน โดยในปี ค.ศ. 2000 Nakabayashi และคณะ<sup>[13]</sup> ได้แยกชนิดของเชื้อในคนสุขภาพดีจำนวน 35 ราย ด้วยวิธีทางชีวเคมี พบเชื้อ *M. globosa* (ร้อยละ 22), *M. sympodialis* (ร้อยละ 10) และ *M. furfur* (ร้อยละ 3). *M. slooffiae* (ร้อยละ 1) , *M. restricta* (ร้อยละ 1) และในผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 22 ราย พบเชื้อ *M. globosa* มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 55 ในขณะที่พบเชื้อสปิซิสอื่น ๆ ต่ำกว่าร้อยละ 10 ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Tarazooie และคณะ ในปี ค.ศ. 2004<sup>[22]</sup> ซึ่งพบว่าเชื้อ *M. globosa* เป็นสาเหตุก่อโรคมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 53.3 นอกจากนี้ในการศึกษาของ Saghazadeh และคณะ ในปี ค.ศ. 2010<sup>[23]</sup> ได้ทำการแยกสปิซิสเชื้อ *Malassezia*

spp. จากคนสุขภาพดีจำนวน 34 ราย ด้วยวิธีทางชีวเคมีเช่นกัน พบเชื้อ *M. globosa* (ร้อยละ 52.9), *M. sympodialis* (ร้อยละ 23.5), *M. furfur* (ร้อยละ 11.8), *M. restricta* (ร้อยละ 5.9), *M. obtusa* (ร้อยละ 2.9) และ *M. slooffiae* (ร้อยละ 2.9) ตามลำดับ สำหรับในการศึกษารั้งนี้ได้แยกสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* spp. จากผู้ป่วยโรคเกลื้อนและคนสุขภาพดี โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเกลื้อนจำนวน 8 ราย และคนสุขภาพดีจำนวน 165 ราย พบว่าเมื่อนำมาแยกสปิซิสด้วยวิธีทางชีวเคมีสามารถจำแนกสปิซิสได้จำนวน 127 isolates แบ่งเป็น 4 สปิซิสได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis* และ *M. slooffiae* ซึ่งให้ผลสอดคล้องเมื่อนำมายืนยันผลด้วยวิธี PCR amplification แต่มีตัวอย่างจำนวน 46 isolates ที่ไม่สามารถแยกสปิซิสได้ด้วยวิธีทางชีวเคมี แต่เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกสปิซิสด้วยวิธี PCR amplification สามารถระบุสปิซิสของเชื้อ *Malassezia* ได้ถึง 6 สปิซิส ได้แก่ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. globosa* และ *M. japonica* ซึ่งตัวอย่างจากรอยโรคที่ผิวหนังของ

ผู้ป่วยโรคเกลื้อน จะพบเชื้อ *M. furfur* และ *M. globosa* ในขณะที่ตัวอย่างจากผิวหนังคนสุขภาพดีพบเชื้อ *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. slooffiae* และ *M. japonica* ตามลำดับจากมากไปน้อย

ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่อ้างถึง ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกันในแต่ละประเทศจึงทำให้พบเชื้อที่แตกต่างกันออกไป รวมทั้งอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อและวิธีการที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อด้วย<sup>[24]</sup> ซึ่งทั้งอาหารและวิธีการที่แตกต่างกันทำให้เกิดความหลากหลายของชนิดของเชื้อ *Malassezia* ได้ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญของเชื้อ *Malassezia* บางสปีชีส์ต้องการไขมันชนิดพิเศษในอาหารแต่ถ้าไม่มีการเติมลงไปในการแยกเชื้อ อาจทำให้ไม่พบการเจริญบนอาหารดังกล่าวจึงไม่สามารถแยกเชื้อชนิดนี้ออกจากตัวอย่างได้ สำหรับการแยกสปีชีส์ของเชื้อถ้ามีการใช้วิธีการที่มีความจำเพาะและแม่นยำมาก เช่น Nested PCR<sup>[15,21]</sup>, PCR amplification<sup>[20]</sup> หรือ real-time PCR<sup>[25]</sup> ก็จะทำให้สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อได้หลากหลายยิ่งขึ้น ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้จะเห็นได้ว่าการแยกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* ด้วยวิธี PCR amplification ให้ผลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือได้ดีกว่าวิธีทางชีวเคมี เนื่องจากวิธี PCR amplification มีการใช้ primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละสปีชีส์ จึงทำให้สามารถจำแนกเชื้อแต่ละสปีชีส์ออกจากกันได้ และให้ผลการแยกสปีชีส์ที่แม่นยำกว่าการใช้วิธีทางชีวเคมี โดยในการศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อ *M. sympodialis* มีความคลาดเคลื่อนทางชีวเคมีมากที่สุด (ร้อยละ 36.95) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้วิธีทางชีวเคมี ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อได้อย่างชัดเจนทำให้ไม่สามารถแยก

เชื้อบางสปีชีส์ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์จึงทำให้ยากต่อการแปลผล

จากการศึกษาของ Jagielski และคณะ ในปี ค.ศ. 2014<sup>[26]</sup> พบว่าการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* โดยใช้วิธีทางชีวเคมี และ PCR-sequence analysis ให้ผลที่สอดคล้องกันประมาณร้อยละ 65.7 (23 ใน 35 isolates) ในขณะที่ผลการทดลองนี้พบความสอดคล้องระหว่าง 2 วิธีประมาณร้อยละ 73.41 (127 ใน 173 isolates) ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ที่ใกล้เคียงกัน แต่พบความแตกต่างของสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* ที่ทดสอบ จากการศึกษานี้พบว่าการจำแนกเชื้อ *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa* และ *M. slooffiae* ให้ผลสอดคล้องกันระหว่าง 2 วิธี ร้อยละ 78.20 (122 ใน 156) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Jagielski และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 ที่พบเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ และให้ผลที่สอดคล้องกันร้อยละ 82.9 (29 ใน 35) ดังนั้นในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* นั้น วิธี molecular identification เป็นวิธีที่เหมาะสม มีความจำเพาะสูงและให้ผลแม่นยำกว่าวิธีทางชีวเคมี แต่อย่างไรก็ตามวิธีทางชีวเคมีก็สามารถเป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *Malassezia* ในที่ที่ยังไม่มีวิธีทางอณูวิทยาให้ใช้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### เอกสารอ้างอิง

1. Adamski Z. Studies of a role played by lipophilic yeasts *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*, *Pityrosporum orbiculare*) in different dermatoses. *Postepy Dermatol (Poznan)*1995; 12:349-454.

2. **Marcon MJ, Powell DA.** Human infections due to *Malassezia* spp. Clin Microbiol Rev 1992;5:101-19.
3. **Hellgren L, Vincent J.** The incidence of tinea versicolor in central Sweden. J Med Microbiol 1983;16:501-503.
4. **Acosta ME, Cazorla D.** Clinical-epidemiological aspects of pityriasis versicolor (PV) in a fishing community of semiarid region from Falcon State, Venezuela. Rev Iberoam Micol 2004;21:191-4.
5. **Leeming JP, Notman FH, Holland KT.** The distribution and ecology of *Malassezia* furfur and cutaneous bacteria on human skin. J Appl Bacteriol 1989;67:47-52.
6. **Burke RC.** Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infection in human beings. J Invest Dermatol 1961;36:389-401.
7. **Guého E, Midgley G, Guillot J.** The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Van Leeuwenhoek 1996;69:337-55.
8. **Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr.** Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol 2004;51:785-98.
9. **Stein DH.** Superficial fungal infections. Pediatr Clin North Am 1983;30:545-61.
10. **Faergemann J.** Tinea versicolor and Pityrosporum orbiculare: mycological investigations, experimental infections and epidemiological surveys. Acta DermVenereol Suppl (Stockh) 1979;86:1-23.
11. **Hafez M, Shamy S.** Genetic susceptibility in Pityriasis versicolor. Dermatologica 1985;171:86-8.
12. **Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Latrofa MS, Otranto D.** Advances in the identification of *Malassezia*. Mol Cell Probe 2011;25:1-7.
13. **Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J.** Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Med Mycol 2000;38:337-41.
14. **Aspiroz C, Ara M, Varea M, et al.** Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia 2002;154:111-7.
15. **Morishita N, Sei Y, Sugita T.** Molecular analysis of *Malassezia* microflora from patients with pityriasis versicolor. Mycopathologia. 2006;161: 61-5.
16. **Crespo-Erchiga V, Ojeda A, Vera A, et al.** *Malassezia globosa* as the causative agent of Pityriasis versicolor. Br J Dermatol 2000;143:799-803.
17. **Guého E, Boekhout T, Begerow D.** Biodiversity, phylogeny and ultrastructure In: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegriki A, editors. *Malassezia* and the skin. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p. 17-63.
18. **Kaneko T, Makimura K, Abe M, et al.** Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. J Clin Microbiol 2007;45: 3737-742.
19. **Kaneko T, Makimura K, Sugita T, et al.** Tween 40-based precipitate production observed on modified chromogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species. Med Mycol 2006;44:227-31.
20. **Affes M, Salah SB, Makni F, et al.** Molecular identification of *Malassezia* species isolated from dermatitis affections. Mycoses 2009;52:251-6.
21. **Sugita T, Suto H, Unno T, et al.** Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. J Clin Microbiol 2001;39:3486-490.
22. **Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, et al.** Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol 2004;4:1-6.
23. **Saghazadeh M, Farshi S, Hashemi J, et al.** Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, and normal subjects. Journal de Mycologie Médicale 2010;20:279-82.

24. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. Clin Microbiol Rev 2012;25:106-41.
25. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, et al. Molecular Analysis of *Malassezia* Microflora in Seborrheic Dermatitis Patients: Comparison with Other Diseases and Healthy Subjects. J Invest Dermatol 2008;128:345-51.
26. Jagielski T, Rup E, Ziolkowska A, et al. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. BMC Dermatol 2014;14:1-15.

### Comparison of biochemical characterizations with PCR amplification in identification of *Malassezia* species isolated from pityriasis versicolor and healthy volunteers

Proawpilart Intayot, and Sirida Youngchim

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

---

The aim of this research was to determine the correlation between biochemical features and a molecular method in the identification of *Malassezia* spp. To achieve this study, 173 isolates of *Malassezia* spp. were 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 agreement between biochemical features and PCR amplification was found 73.41% (127/173) in the identification of *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. dermatis* and *M. slooffiae*. In particular for *M. furfur* and *M. sympodialis*, the higher percentages of the agreement between these two methods were found 81.94 and 77.63%, respectively. In addition, 46 isolates of *Malassezia* spp. were differentiated by PCR amplification only and then confirmed by genomic sequencing. Six species of *Malassezia* including *M. sympodialis* (36.95%), *M. furfur* (28.26%), *M. dermatis* (21.74%), *M. slooffiae* (4.35%), *M. globosa* (4.35%), and *M. japonica* (4.35%), were detected. These findings suggest that PCR amplification can be used as a potential tool in identification of *Malassezia* spp. when compared with the biochemical method. However, the biochemical studies are suitable for the presumptive identification of *Malassezia* species where molecular methodologies are not available. **Chiang Mai Medical Journal 2016;55(Suppl 1):31-43.**

---

**Keywords:** *Malassezia* spp., pityriasis versicolor, biochemical test, PCR amplification

