

บทบาทของข้าวไทย 6 ชนิด สำหรับการแยกเชื้อราทางการแพทย์กลุ่ม *Microsporum canis*

กณทิรา สิงห์คำ¹ วชรมาศ ม่วงแก้ว³ มารุต ตั้งวัฒนาจุลพิร² นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ³

¹สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

³ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

Microsporum canis จัดเป็นเชื้อราที่ก่อโรคกลากที่พบบ่อยในสัตว์ รวมถึงสามารถก่อโรคได้ในคนเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก การตรวจการติด *M. canis* นั้นสามารถตรวจได้เบื้องต้นในห้องผู้ตรวจผู้ป่วยนอก โดยการใช้ Wood's lamp ultra-violet light ซึ่งพบว่า *M. canis* สามารถให้การเรืองแสงสีเขียวปนเหลืองได้คล้ายๆ กับ *M. audouinii* สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการนิยมใช้ Rice grain test เพื่อพิสูจน์ชนิดของเชื้อ แต่ยังไม่มีการระบุว่าข้าวสายพันธุ์ไหนที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *M. canis* ในข้าวสารและข้าวหุงสุกทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวกล้อง ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ คัดเลือกชนิดของข้าวที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงและพิสูจน์เบื้องต้นของ *M. canis* ในห้องปฏิบัติการ งานวิจัยนี้ใช้ *M. canis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. canis* TMMI001MC, *M. canis* TMMI002MC และ *M. canis* TMMI003MC พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เจริญเติบโตได้ดีเฉพาะในข้าวหุงสุกเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในข้าวหุงสุกทุกสายพันธุ์พบว่า ข้าวเหนียวขาวทำให้ *M. canis* เจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ จำนวนของการสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ (macroconidia) ของ *M. canis* ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ โดยพบว่าข้าวที่มีสีเชื้อเจริญได้ดีกว่าข้าวที่ไม่มีสีใน *M. canis* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. canis* TMMI001MC ซึ่งสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่เฉลี่ยมากที่สุดบนข้าวกล้องและ *M. canis* TMMI002MC สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่เฉลี่ยมากที่สุดบนข้าวไรซ์เบอร์รี่ และ *M. canis* TMMI003MC เจริญและสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้ด้วยข้าวไม่มีสี โดยความแตกต่างของข้าวสายพันธุ์กลุ่มที่มีสีและไม่มีสีคือธาตุอาหารรอง (trace element) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้น ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสรุปว่า ข้าวหุงสุกสายพันธุ์ที่มีสีมีแนวโน้มที่ดีในการเลือกนำมาใช้ในการพิสูจน์ชนิดของ *M. canis* ด้วยวิธี Rice grain test

คำสำคัญ: *Microsporum canis*, ข้าว, Rice grain test

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

420/6 ถนนราชมัย เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

อีเมล: natthanej.lup@mahidol.ac.th

Role of 6 Thai rice grains for *Microsporum canis* identification in medical mycology

Pantira Singkum¹, Watcharamat Muangkaew³, Marut Tangwattanachuleeporn², Natthanej Luplertlop³

¹Biomedical Sciences Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

²Medical Technology Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

³Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Abstract

Microsporum canis is a pathogenic fungus causing Tinea diseases, which can be detected in animals and humans especially in infants. General diagnosis can be performed in out-patient department by using Wood's lamp ultra-violet light. The greenish-yellowish illuminated lesion after being exposed the UV light can be detected in *M. canis* infected lesion similar to *M. audouinii* infected lesion. However, rice grain test is a common method that being used to confirm the *M. canis* infection in the laboratory. To determine whether which types of rice grain (*Oryza sativa* L.) represent the most effective candidate for testing *M. canis* infection, we determined the growth of *M. canis* on six types of Thai polished rice grain including Thai jasmine rice, Saohai rice, Riceberry rice, brown rice, white glutinous rice, and black glutinous rice. Both uncooked and cooked rice grains from six types of Thai rice were used to grow 3 strains of *M. canis* including *M. canis* TMMI001MC, *M. canis* TMMI002MC, and *M. canis* TMMI003MC. We found that all 3 strains of *M. canis* can grow only in the cooked rice. Moreover, we found that *M. canis* grew fastest when cultured with cooked white glutinous rice compared to control. The amount macroconidia formation are varied in each strain of *M. canis*. In addition, we found that *M. canis* grew better in colored rice grains when compared to non-colored rice grains. The highest averaged amount of macroconidia formation from *M. canis* TMMI001MC was observed in brown rice culture. On the other hand, *M. canis* TMMI002MC cultured with Riceberry rice exhibited the highest averaged amount of macroconidia formation. Moreover, *M. canis* TMMI0MC could grow and produced macroconidia on non-colored rice grains. The results suggested that trace elements and anti-oxidative compounds in colored rice grains may in part promote the growth of *M. canis*. Therefore, this study concluded that cooked-colored rice grains from Thai rice exhibit high potential candidate for evaluating the *M. canis* infection as a culture medium used in Rice grain test.

Keywords: *Microsporum canis*, Rice, Rice grain test

Corresponding Author:

Natthanej Luplertlop

Department of Microbiology and Immunology,

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400

E-mail: natthanej.lup@mahidol.ac.th

บทนำ

Microsporum spp. จัดเป็นเชื้อราที่มีหลายสายพันธุ์และมักก่อโรคที่ทำลายเส้นผม เส้นขน และผิวหนังทั้งของคนและสัตว์ โรคที่เกิดจากเชื้อนี้ที่พบบ่อยคือ tinea capitis และ tinea barbae โดยพบว่าสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และมีอัตราการก่อโรที่สูงนั้น คือ *M. canis* และ *M. audouinii*¹⁻³

M. canis จัดเป็นเชื้อราที่ก่อโรคกลากที่พบบ่อยในสัตว์โดยเฉพาะสุนัขและแมว ซึ่งการติดเชื้อชนิดนี้พบได้ทั่วโลก นอกจากนั้น *M. canis* สามารถก่อโรคในคนได้เช่นกันโดยเฉพาะในเด็ก ซึ่งพบว่าเมื่อ *M. canis* ก่อโรคในคนจะส่งผลให้บริเวณรอยโรคมีการอักเสบที่รุนแรง โดยบริเวณที่พบบ่อยคือหนังศีรษะ (Tinea capitis) หนวด (Tinea barbae) ลำตัว (Tinea corporis) และเล็บ (Tinea unguium) ในส่วนของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. canis* นั้นสามารถทำได้เบื้องต้นที่แผนกตรวจผู้ป่วยนอก โดยการใช้ Wood's lamp ultra-violet light^{2,4,5} แต่อย่างไรก็ตาม *M. canis* มีความสามารถในการเรืองแสงสีเขียวบนแหล่งได้ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *M. audouinii* ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดของเชื้อราว่าเป็น *M. canis* จึงควรใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมเพื่อการวินิจฉัยที่แม่นยำ ซึ่งหนึ่งในวิธีการวินิจฉัยจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อคือ สันฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการสังเกตความแตกต่างของลักษณะโคนิเดีย และปัจจัยสำคัญในการจำแนกโดยลักษณะโคนิเดีย นั้น คือ ชนิดและขนาดของโคนิเดียที่เชื้อสร้าง กล่าวคือ การวินิจฉัยจากเชื้อโคนิเดียขนาดใหญ่จะมีความแม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์มากกว่าการวินิจฉัยจากโคนิเดียขนาดเล็ก เนื่องจากจะไม่สามารถเห็นรายละเอียดความแตกต่างของโคนิเดียระหว่างสายพันธุ์ได้ ดังนั้น การวินิจฉัยใต้กล้องจุลทรรศน์โดยดูที่โคนิเดียขนาดใหญ่จะเพิ่มความแม่นยำและความน่าเชื่อถือของผลการวินิจฉัยได้ดี

การวินิจฉัย *Microsporum spp.* มีวิธีการตรวจที่ไม่ซับซ้อน แต่จำเป็นต้องเลือกใช้อาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงอย่างเหมาะสม โดยทั่วไปจะเพาะเลี้ยงบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 24-25 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้ได้จากการสังเกตทางสันฐานวิทยาของโคโลนี และการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดย *Microsporum spp.* จะมีการสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ รูปกระสวย ผ้นงหนา และผิวไม่เรียบ ขนาด 30-160 x 7-20 ไมโครเมตร ภายในมีผนังกันแบ่งเป็น 2-16 เซลล์ รูปร่างของโคนิเดียขนาดใหญ่มีความสำคัญในการจัดจำแนกสายพันธุ์ และในขณะที่โคนิเดียขนาดเล็กมีขนาด 4-7 x 2.5-3.5 ไมโครเมตร จะมีลักษณะคล้ายกันกับเชื้อราชนิดอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อในสกุลเดียวกัน จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ นอกจากนั้นการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงอย่างน้อย 6-10 วัน⁶ แต่ยังคงพบว่าการเพาะเลี้ยงยังไม่สามารถสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้มากนัก จึงทำให้รายงานผลการตรวจวินิจฉัยล่าช้า ดังนั้น จึงต้องใช้วิธีการตรวจรูปแบบอื่นๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งการทดสอบที่นิยมนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Microsporum spp.* นั้น คือ Rice grain test

Rice grain test เป็นวิธีที่นิยมในการใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในสกุล *Microsporum spp.* โดยเฉพาะ *M. canis* และ *M. audouinii*⁴ เนื่องจาก *M. audouinii* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่ใช้ทดสอบ แต่ *M. canis* นั้นสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับเชื้อราชนิดอื่นๆ และสามารถสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้ในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญเติบโตของ *M. canis* ค่อนข้างช้าและปริมาณไม่แน่นอน อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาถึงสายพันธุ์ของข้าวที่สามารถทำให้ *M. canis* สามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้ดีที่สุด

คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงสายพันธุ์ของข้าวไทยที่นำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *Microrosporum spp.* ซึ่งข้าวในประเทศไทยแต่ละพันธุ์จะมีคุณภาพและคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามปริมาณ สตาร์ช (starch) ซึ่งประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพกทิน (amylopectin) ที่มีผลต่อเนื้อสัมผัสของข้าวหุงสุก และใช้จำแนกชนิดของข้าว เนื่องจากแป้งข้าวจะมีอะไมโลเพกทินเป็นองค์ประกอบหลักและอะไมโลสเป็นองค์ประกอบรอง แต่โดยทั่วไปมักนิยมแบ่งประเภทข้าวโดยกล่าวถึงอะไมโลสเป็นหลักสำคัญ อัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกทินจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ข้าวหุงสุกมีคุณสมบัติแตกต่างกัน สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute : IRRI) จัดแบ่งข้าวออกเป็น 4 ประเภทตามปริมาณอะไมโลส คือ กลุ่มแรกอะไมโลสน้อยกว่า 1.0% จัดอยู่ในประเภทข้าวเหนียว กลุ่มที่สองปริมาณอะไมโลสต่ำกว่า ร้อยละ 10 จัดอยู่ในประเภทข้าวนุ่มค่อนข้างเหนียว กลุ่มที่สามปริมาณอะไมโลสร้อยละ 10-25 จัดอยู่ในประเภทข้าวค่อนข้างร่วนนุ่ม และกลุ่มสุดท้ายปริมาณอะไมโลสมากกว่าร้อยละ 25 จัดอยู่ในประเภทข้าวร่วนแข็ง สำหรับข้าวไทยนั้น รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ได้จัดแบ่งข้าวไทยออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ข้าวเหนียว ข้าวอะไมโลสปานกลาง และข้าวอะไมโลสสูง จะเห็นได้ว่าข้าวเหนียวมีคุณสมบัติของแป้งแตกต่างจากข้าวเจ้า เนื่องจากข้าวเหนียวมีส่วนประกอบของทั้งอะไมโลเพกทินและอะไมโลส ในขณะที่ข้าวเจ้ามีแป้งอะไมโลสเป็นใหญ่ นอกจากนั้นยังพบว่าข้าวนั้นยังสามารถแบ่งได้จากลักษณะสีของข้าวได้ คือ ข้าวมีสีและข้าวไม่มีสี ซึ่งข้าวทั้งสองกลุ่มนี้พบว่ามีปริมาณโปรตีน (Protein content) ที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนจะเป็นตัวขัดขวางการซึมของน้ำเข้าไปภายในเมล็ดข้าวทำให้เมล็ดแกร่งขึ้น ขัดสีออกได้ยาก ข้าวที่มีโปรตีนสูงจึงมีสีคล้ำกว่าข้าวที่มีโปรตีนต่ำและข้าวที่มีโปรตีนสูงจะทำให้ความเหนียวของข้าวลดลงด้วย

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาทั้งข้าวเหนียว ข้าวอะไมโลสปานกลาง ข้าวอะไมโลสสูง ข้าวมีสี และข้าวไม่มีสี เพื่อให้ครอบคลุมกลุ่มของข้าวไทยและเป็นข้าวที่หาได้ทั่วไปตามท้องตลาด ในการทดสอบโดยวิธี Rice grain test ดังนี้ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้อง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ ซึ่งผลจากการทดลองนี้จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *M. canis* ในข้าวไทยแต่ละสายพันธุ์
2. เพื่อเลือกชนิดของข้าวที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงและพิสูจน์เบื้องต้นของ *M. canis*

วิธีการศึกษา

1. เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อ *M. canis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *M. canis* TMMI001MC, *M. canis* TMMI002MC และเชื้อ *M. canis* TMMI003MC เก็บอยู่ในธนาคารเชื้อของห้องปฏิบัติการรามาวิทยาทางทหารแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การเตรียมเชื้อในการทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ลงบน SDA slant และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมานับจำนวนโคนีเดีย โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์และคำนวณโคนีเดียเริ่มต้นให้ได้เท่ากับ 100 โคนีเดีย

3. การเตรียมข้าวที่ใช้ในการทดสอบ

ข้าวที่ใช้ในการทดสอบมี 2 ประเภท คือ ข้าวสารและข้าวหุงสุก โดยแบ่งเป็นชนิดข้าวทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิพันธุ์ 105 (ทุ่งกุลาร้องไห้ จังหวัดร้อยเอ็ด) ข้าวเสาไห้พันธุ์เจ๊กเขย (อำเภอเสาไห้ จังหวัดสระบุรี) ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (จังหวัดสุรินทร์)

ข้าวกล้องหอมมะลิ (จังหวัดร้อยเอ็ด) ข้าวเหนียวขาว พันธุ์ กข 6 (จังหวัดขอนแก่น) และข้าวเหนียวดำพันธุ์ หอมภูเขียว (จังหวัดชัยภูมิ) ซึ่งในแต่ละหลอดทดลอง ใส่ข้าวลงไปปริมาณ 1 กรัม ชนิดละ 2 หลอด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

4. การทดสอบ

นำโคนินเดีย เริ่มต้นเท่ากับ 100 โคนินเดีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนข้าวทั้ง 6 ชนิดที่ผ่านการ ฆ่าเชื้อแล้วและบน SDA slant (ตัวควบคุมบวก) หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และนำมานับจำนวนของโคนินเดีย ขนาดใหญ่ (macroconidia) โดยใช้ไมโครมิเตอร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์สถิติจากการใช้ t-test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้โปรแกรม SPSS V.16.0

ผลการศึกษา

ผลจากการเพาะเลี้ยง *M. canis* บนข้าว ทั้ง 6 ชนิด

จากการเพาะเลี้ยง *M. canis* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. canis* TMMI001MC, *M. canis* TMMI002MC และ *M. canis* TMMI003MC บนข้าว 2 ประเภท ได้แก่ ข้าวสารและข้าวหุงสุก โดยแบ่งเป็น ประเภทละ 6 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้อง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเหนียวขาว และ ข้าวเหนียวดำ พบว่า *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถ เจริญได้บนข้าวประเภทข้าวหุงสุกเท่านั้น และเจริญเติบโตได้บนข้าวทั้ง 6 ชนิด เมื่อนำมานับจำนวน โคนินเดียขนาดเล็ก (microconidia) และโคนินเดีย ขนาดใหญ่ จะได้จำนวนของโคนินเดียขนาดใหญ่เฉลี่ย และจำนวนโคนินเดียเฉลี่ยทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 1

จากการนับจำนวนของโคนินเดียขนาดใหญ่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อ *M. canis* TMMI001MC สามารถให้จำนวนโคนินเดียขนาดใหญ่ เฉลี่ยเท่ากับ 1.6×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร บนข้าวกล้อง ส่วนเชื้อ *M. canis* TMMI002MC ให้จำนวนโคนินเดียขนาดใหญ่ เฉลี่ยเท่ากับ 6.85×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร บนข้าวไรซ์เบอร์รี่ และ เชื้อ *M. canis* TMMI003MC ให้จำนวนโคนินเดีย ขนาดใหญ่ เฉลี่ยเท่ากับ 25×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์ มิลลิเมตร บนข้าวเสาไห้

ตารางที่ 1 จำนวนโคนินเดียขนาดใหญ่และจำนวนโคนินเดียเฉลี่ยทั้งหมดของเชื้อ *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนข้าวหุงสุกแต่ละชนิด

ชนิดข้าว	<i>M. canis</i> TMMI001MC		<i>M. canis</i> TMMI002MC		<i>M. canis</i> TMMI003MC	
	จำนวน macroconidia เฉลี่ย (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน conidia เฉลี่ย ทั้งหมด (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน macroconidia เฉลี่ย (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน conidia เฉลี่ย ทั้งหมด (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน macroconidia เฉลี่ย (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน conidia เฉลี่ย ทั้งหมด (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)
Control (อาหาร SDA)	0.05×10^6	0.05×10^6	0	4.7×10^6	1.0×10^6	4.0×10^6
	อัตราส่วน 1:1		-		อัตราส่วน 1:4	

ชนิดข้าว		<i>M. canis</i> TMMI001MC		<i>M. canis</i> TMMI002MC		<i>M. canis</i> TMMI003MC	
		จำนวน macroconidia เฉลี่ย (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน conidia เฉลี่ย ทั้งหมด (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน macroconidia เฉลี่ย (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน conidia เฉลี่ย ทั้งหมด (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน macroconidia เฉลี่ย (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)	จำนวน conidia เฉลี่ย ทั้งหมด (เซลล์ต่อ ลูกบาศก์ มิลลิเมตร)
ข้าวแม่สี	ข้าว หอม มะลิ	1x10 ⁶	19x10 ⁶	0.6x10 ⁶	25.5x10 ⁶	5.0x10 ⁶	33x10 ⁶
		อัตราส่วน 1:19		อัตราส่วน 1:425		อัตราส่วน 1:6.6	
	ข้าว เหนียว ขาว	0	9.75x10 ⁶	0.95x10 ⁶	228.5x10 ⁶	0.15x10 ⁶	2.5x10 ⁶
		-		อัตราส่วน 1:240.53		อัตราส่วน 1:16.67	
	ข้าว เสาไห้	0.1x10 ⁶	30x10 ⁶	3.8x10 ⁶	33x10 ⁶	25x10 ⁶	77x10 ⁶
		อัตราส่วน 1:300		อัตราส่วน 1:8.68		อัตราส่วน 1:3.08	
ข้าวแม่สี	ข้าว กล้อง	1.6x10 ⁶	285x10 ⁶	0.6x10 ⁶	35.5x10 ⁶	1.3x10 ⁶	47.5x10 ⁶
		อัตราส่วน 1:178.125		อัตราส่วน 1:59		อัตราส่วน 1:36.54	
	ข้าว ไรซ์ เบอร์รี่	0.2x10 ⁶	10.5x10 ⁶	6.85x10 ⁶	35.5x10 ⁶	3.5x10 ⁶	15.5x10 ⁶
		อัตราส่วน 1:52.5		อัตราส่วน 1:5.18		อัตราส่วน 1:4.43	
	ข้าว เหนียว ดำ	0.35x10 ⁶	85.5x10 ⁶	0.4x10 ⁶	9.8x10 ⁶	3.3x10 ⁶	21.5x10 ⁶
		อัตราส่วน 1:244.29		อัตราส่วน 1:24.5		อัตราส่วน 1:6.52	

*ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ลักษณะของ *M. canis* ที่เจริญบนข้าวทั้ง 6 ชนิด

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนข้าวหุงสุกทั้ง 6 ชนิด พบว่า *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะการเจริญบนข้าวที่เหมือนกันคือ มีลักษณะฟู มีสีขาว คล้ายขนแมว ดังแสดงในรูปที่ 1



1



2



3



4



5



6

รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *M. canis* บนข้าวสารและข้าวหุงสุกแต่ละชนิด ได้แก่ 1) ข้าวหอมมะลิ 2) ข้าวเสาไห้ 3) ข้าวกล้อง 4) ข้าวไรซ์เบอร์รี่ 5) ข้าวเหนียวขาว และ 6) ข้าวเหนียวดำ

ลักษณะโคโคนีเดียขนาดใหญ่ของ *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลักษณะโคโคนีเดียขนาดใหญ่ของ *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า มีลักษณะที่จำเพาะของ *M. canis* คือเป็นรูปกระสวย หัวเรียวท้ายเรียว ผนังหนา ภายในประกอบด้วยเซลล์ ตั้งแต่ 5-15 เซลล์ โดยไม่พบลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ลักษณะโคโคนีเดียขนาดใหญ่ของ *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า *M. canis* TMMI001MC (ภาพซ้าย) *M. canis* TMMI002MC (ภาพกลาง) *M. canis* TMMI003MC (ภาพขวา)

อภิปรายผล

เชื้อ *M. canis* ถือเป็นเชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญที่พบเป็นสาเหตุของโรคกลาก โดยเชื้อ *M. canis* ใช้เวลาในการเจริญเติบโตเข้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เช่น SDA และ PDA ที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการเชื้อรา อีกทั้งอัตราการสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ยังต่ำ จึงยากต่อการระบุสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม *M. canis* ดังนั้น งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ส่งผลให้เชื้อโตไว สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้มาก และมีราคาถูก จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ของ Moriello และคณะ⁷ ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงต่อการเจริญเติบโตของ *M. canis* พบว่าเชื้อเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยที่การมีแสงและไม่มีแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และจากงานวิจัยของ วิวัฒน์และคณะ⁸ ได้ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโคนิเดียใน *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuillemin พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้บนวัสดุอาหารที่ทำจากเมล็ดธัญพืชทุกชนิด โดยมีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมเมล็ดธัญพืช แต่ความหนาแน่นของปริมาณเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแตกต่างกัน และงานวิจัยของ Abraham et al. (2003)⁹ ได้ทำการทดสอบเพิ่มเชื้อราในธัญพืชพบว่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยของเชื้อรามีค่าสูงสุดในข้าว ตามด้วยข้าวฟ่าง เนื่องจากเมล็ดข้าวฟ่างสุกนั้นมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากกว่าในเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งจากผลศึกษาวิจัยเบื้องต้นดังกล่าวให้ผลที่น่าสนใจ

ด้วยข้อมูลเบื้องต้นจากการทบทวนวรรณกรรมนี้ จึงนำไปสู่การศึกษาของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *M. canis* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส⁸ ในข้าวสารและข้าวฟ่างสุก⁹ โดยแยกเป็นข้าวสายพันธุ์กลุ่มที่มีสีและไม่มีสี ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้อง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ โดยใช้การทดสอบ Rice grain test เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *Microsporum* spp. โดย *M. canis*

ซึ่งในการทดลองครั้งนี้มีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *M. canis* TMMI001MC, *M. canis* TMMI002MC และ *M. canis* TMMI003MC พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้บนข้าวฟ่างสุกเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในข้าวฟ่างสุกสายพันธุ์ที่มีสี และไม่มีสี ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้อง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ พบว่า ข้าวเหนียวขาวทำให้เชื้อ *M. canis* เจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและข้าวสายพันธุ์อื่นๆ คือ พบโคโลนีของเชื้อขึ้นบนข้าวเหนียวขาวภายใน 11 วัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัฐพล และคณะ¹⁰ ที่ได้ศึกษาการเลี้ยงเส้นใยเชื้อ *Cordyceps militaris* (L.) Link BCC 18247 ด้วยเมล็ดธัญพืชต่างชนิด พบว่าความหนาแน่นของเส้นใยเชื้อ *C. militaris* (L.) Link BCC 18247 บนเมล็ดข้าวกล้องมันปู เมล็ดข้าวหอมมะลิแดง และเมล็ดข้าวเหนียว กข 6 มีความหนาแน่นของเส้นใยอยู่ในระดับเส้นใยหนาแน่นมาก เมื่ออายุการเลี้ยงเชื้อ 15 วัน และเมื่อศึกษาจำนวนโคนิเดีย (conidia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า *M. canis* ทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่เฉลี่ยมากที่สุดบนข้าวที่มีสี ได้แก่ ข้าวกล้อง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียวดำ โดยในแต่ละสายพันธุ์สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้มากที่สุดที่ในข้าวที่มีสีแตกต่างกันคือ *M. canis* TMMI001MC สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่เฉลี่ยมากที่สุดบนข้าวกล้องและเชื้อ *M. canis* TMMI002MC สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่เฉลี่ยมากที่สุดบนข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยที่เชื้อ *M. canis* TMMI003MC สร้างโคนิเดียขนาดใหญ่เฉลี่ยมากที่สุดบนข้าวเสาไห้แต่ไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ดังนั้น การสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ของเชื้อ *M. canis* นั้นจะขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ โดยผลจากการทดลองครั้งนี้ให้ผลในข้าวที่มีสีดีกว่าข้าวที่ไม่มีสี โดยความแตกต่างของข้าวสายพันธุ์กลุ่มที่มีสีและไม่มีสีคือ ธาตุอาหารรอง (trace element) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของธาตุอาหารรอง (trace element) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในข้าวแต่ละสายพันธุ์กับการเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ของเชื้อ *M. canis* แต่พบรายงานการศึกษาที่อธิบายความสัมพันธ์ของธาตุอาหารรอง (trace element) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับการติดเชื้อ dermatophytes โดย Beigh และคณะ¹¹ ได้ทำการตรวจหาธาตุอาหารรอง (trace element), สารอนุมูลอิสระ (oxidant)/สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), วิตามินซี (vitamin C) และ บีตา-แคโรทีน (β -carotene) ในสุนัขที่มีการติดเชื้อ dermatophytes (*M. canis* ร้อยละ 52.17, *T. mentagrophytes* ร้อยละ 30.43 และ *M. gypseum* ร้อยละ 17.39) พบว่าสุนัขที่ติดเชื้อ dermatophytes มีค่าที่ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของธาตุสังกะสี (zinc), ธาตุทองแดง (copper), บีตา-แคโรทีน (β -carotene) และระดับของวิตามินซี (vitamin C) การทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และเอนไซม์คะตาเลส (catalase) โดยมีค่าที่สูงขึ้นของธาตุเหล็ก (iron) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขกลุ่มที่มีสุขภาพสมบูรณ์ (ไม่ติดเชื้อ dermatophytes) ดังนั้น ธาตุอาหารรอง (trace element), สารอนุมูลอิสระ (oxidant)/สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต่างๆ นี้อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อและช่วยในการก่อพยาธิสภาพของโรคได้ อย่างไรก็ตาม พบว่ามี 1 สายพันธุ์ของ *M. canis* ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันคือ สามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ได้มากกว่าในข้าวเสาไห้ (ข้าวไม่มีสี) ซึ่งความผันแปรนี้อาจจะเกิดจากความแตกต่างของตัวเชื้อเอง ดังนั้น ต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมด้วยการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของ *M. canis* เพื่อยืนยันผลจากการวิจัยในครั้งต่อไป

สรุปผล

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า *M. canis* ทุกสายพันธุ์ เจริญเติบโตได้เฉพาะบนข้าวหุงสุก โดยข้าวเหนียวขาวทำให้ *M. canis* เจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและการสร้างโคนิเดียขนาดใหญ่ของ *M. canis* นั้นจะขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อซึ่งข้าวหุงสุกสายพันธุ์ที่มีสีมีแนวโน้มที่ดีในการเลือกนำมาใช้ในการพิสูจน์ชนิดของ *M. canis* ด้วยวิธี Rice grain test ในห้องปฏิบัติการเชื้อราทางการแพทย์ ส่งผลให้สามารถแยกและระบุชนิดของเชื้อรากลุ่ม *M. canis* ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว อีกทั้งยังส่งผลต่อการรักษาอย่างถูกต้องทันเวลา นอกจากนี้ข้าวยังมีราคาถูกกว่าอาหารสำเร็จรูปที่ใช้ในงานประจำวัน นำไปสู่การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำมาจากข้าวเพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในห้องปฏิบัติการเชื้อราทางการแพทย์ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Azab MM, Mahmoud NF, Allah SA., et al. Dermatophytes isolated from clinical samples of children suffering from Tinea capitis in ismailia, Egypt. Aust J Basic Appl Sci 2012;6(3):38-42.
2. Doddamani PV, Harshan KH, Kanta RC., et al. Isolation, identification and prevalence of dermatophytes in tertiary care hospital in Gulbarga district. People's J Sci Res 2012;6(2):10-3.
3. Ekwealor CC and Oyeka CA. Cutaneous mycoses among rice farmers in Anambra state, Nigeria. J Mycol 2013;2013:5.
4. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia 2008;295-306.

5. Pandey A, Pandey M. Isolation and characterization of dermatophytes with tinea infections at Gwalior (m.p.), india. Int J Pharm Sci Invent 2013;2(2):5-8.
6. Abou El-Khair EK, Taleb MH, Albasyony I, et al. Tinea Capitis in North Gaza Strip- Palestine. Asian J Dermatol 2014;6:1-15.
7. Moriello KA, Verbrugge MJ, Kesting RA. Effects of temperature variations and light exposure on the time to growth of dermatophytes using six different fungal culture media inoculated with laboratory strains and samples obtained from infected cats. J Feline Med Surg 2010;12(12):988-90.
8. Suasa-ard W, Sommartya P, Buchatian P, et al. Materials suitable for mass production conidia of white muscardine, *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuillemin. National biological control research center Kasetsart University.
9. Abraham T, Easwaramoorthy S, Santhalakshmi G. Mass production of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depressella* Swinhoe. Sugar Tech 2003;5(4):225-9.
10. Sornprasert R, Saenkamon P, Chantamrungs C, et al. Cultivation of *Cordyceps militaris* (L.) Link BCC 18247 Mycelium with Different Grains. Chandrakasem Rajabhat University Journal 2012;18(35):83-91.
11. Beigh SA, Soodan JS, Singh R, et al. Evaluation of trace elements, oxidant/ antioxidant status, vitamin C and beta-carotene in dogs with dermatophytosis. Mycoses 2014;57(6):358-65.