# การปนเปื้อนของเชื้อราในยาดมสมุนไพร

# Contamination of fungi in herb inhalers

พัชรี กัมมารเจษฎากุล

จิดาภา เซคเคย์

วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต

อริยา จินดามพร

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2555

**ชื่อเรื่อง** การปนเปื้อนของเชื้อราในยาดมสมุนไพร

**ผู้วิจัย** พัชรี กัมมารเจษฎากุล จิดาภา เซคเคย์ วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์
อิสยา จันทร์วิทยานุชิต อริยา จินดามพร

**สถาบัน** มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

**ปีที่พิมพ์** 2558

**สถานที่พิมพ์** มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

**แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์** มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

**จำนวนหน้างานวิจัย** 48 หน้า

**คำสำคัญ** ยาดมสมุนไพร เชื้อรา สมุนไพร น้ำมันหอมระเหย โรคทางเดินหายใจ

**ลิขสิทธิ์** มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

## บทคัดย่อ

ยาดมสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากธรรมชาติและได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาเกี่ยวกับยาดมสมุนไพรกับการปนเปื้อนเชื้อรายังมีน้อยมาก ดังนั้นคณะผู้วิจัยทำการตรวจหาชนิดของเชื้อราปนเปื้อนจากยาดมสมุนไพรที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด จังหวัดสมุทรปราการ ที่ยังไม่ได้เปิดใช้งาน ในระหว่างช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 จนถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 จำนวน 15 ยี่ห้อ และจัดจำแนก ด้วยวิธีทางฟีโนทัยป์และจีโนทัยป์ จากตัวอย่างยาดมสมุนไพร 15 ยี่ห้อ พบเชื้อ ราปนเปื้อนจำนวน 11 ยี่ห้อ (35 ตัวอย่าง) จำนวน 10 – 1,000 CFU/ml ซึ่งไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดไว้ แบ่งออกเป็นเชื้อฉวยโอกาส 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 31.4 ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus aculeatus*, *Aaspergillus calidoustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Bipolais papendorfii*, *Clavispora lusitaniae* และ *Candida orthopsilosis* และเชื้อราที่ยังไม่มีรายงานการก่อโรคในคน/สรุปไม่ได้ 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 68.6 ได้แก่ เชื้อ *Emericella variecolor*, *Neurospora intermedia*, *Trametes polyzona*, *Glomerella graminicola*, *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Neurospora* spp. และ *Penicillium* spp. ลักษณะของผลิตภัณฑ์ยาดมที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุดคือ ยาดมสมุนไพรตากแห้ง (ร้อยละ 100) ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย (ร้อยละ 83.3) และยาดมสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) (ร้อยละ 40) ตามลำดับ

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ และสนับสนุนให้ผู้บริโภค มีความเชื่อมั่น ในความปลอดภัยของยาดมสมุนไพร อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคต้องพิจารณาเลือกใช้ยาดมสมุนไพรที่มี ฉลาก และบรรจุภัณฑ์ที่สมบูรณ์ เพื่อ ลดความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นจากการเกิดโรคจากเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ใน ยาดมสมุนไพร ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาทางด้านสุขภาพ ของผู้บริโภค โดยเฉพาะโรคระบบทางเดิน หายใจในกลุ่มเสี่ยงที่จะติดเชื้อฉวยโอกาสได้

| | |
|---|---|
| **Research title** | Contamination of fungi in herb inhalers |
| **Researchers** | Patcharee Kammarnjassadakul, Jidapa Székely, Watcharin Rangsipanuratn, Isaya Janwithayanuchit, Ariya Chindamporn |
| **Institution** | Hauchiew Chalermprakiet University |
| **Year of Publication** | 2015 |
| **Publisher** | Hauchiew Chalermprakiet University |
| **Sources** | Hauchiew Chalermprakiet University |
| **No. of Pages** | 48 pages |
| **Keywords** | Herb inhalers, Fungi, Herb, Essential oil, Respiratory tract infection |
| **Copyright** | Hauchiew Chalermprakiet University |

## ABSTRACT

Herbal Inhaler is made from natural products and has been widely popular. However, there are a few studies about fungal contamination in herbal inhaler. In this study, the researchers detected and classified type of fungal contamination in herbal inhalers which were sold in the Samutprakan province. During the period from March 2013 to May 2013, 15 brands of herbal inhalers were collected, cultured and identified by using phenotypic and genotypic methods. From 15 brands of herbal inhalers, there were 11 brands (35 samples) which were contaminated with fungi (quantitative determination 10 – 1,000 CFU/ml; fungi < $5x10^5$ CFU/ml). Eleven samples (31.4%) were contaminated with opportunistic fungi (*Aspergillus sydowii*, *A. aculeatus*, *A. calidoustus*, *Clad. cladosporioides*, *P. citrinum*, *B. papendorfii*, *Cl. lusitaniae* and *C. orthopsilosis*) whereas 24 samples (68.6 %) were contaminated with non-pathogenic fungi (*E. variecolor*, *Neu. intermedia*, *T. polyzona*, *Glo. graminicola*, *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Neurospora* spp. and *Penicillium* spp.). The herbal inhalers were classified into 3 groups using characterization, all of dried herb inhalers were found contaminated fungi whereas dried herb mixed with essential oil and finely ground herb were found in some brands (100%, 83.3% and 40%, respectively).

The results of this study are preliminary for consumers in the benefit and encourage confidence in safety of the herb inhalers. However, consumers need to consider when using herbal salts label and complementary packaging in order to reduce the risk from disease caused by contaminated fungi in herb inhalers. This may cause problems of health, especially respiratory disease in risk of infected human group.

# กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยจนลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยทางด้านอณูชีววิทยา และท้ายสุดนี้ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงาน เจ้าหน้าที่ และครอบครัวของคณะผู้วิจัยที่ส่งเสริม ทั้งทางด้านแรงกายและแร งใจทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ค |
| กิตติกรรมประกาศ | จ |
| สารบัญ | ฉ |
| สารบัญตาราง | ช |
| สารบัญรูปภาพ | ซ |
| **บทที่ 1 บทนำ** | 1 |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| **บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 3 |
| **บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย** | 19 |
| วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี | 19 |
| ตัวอย่าง | 21 |
| วิธีการวิจัย | 21 |
| **บทที่ 4 ผลการวิจัย** | 24 |
| **บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล** | 35 |
| บรรณานุกรม | 41 |
| ภาคผนวก | |
| ประวัติย่อผู้วิจัย | 47 |

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


1. แสดงลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Aspergillus* spp. 10
2. แสดงวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคแอสเปอร์จิลโลสิสแต่ละแบบ 11
3. แสดงผลการเพาะเชื้อจากยาดมสมุนไพรที่จัดจำแนกตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ 26
4. แสดงจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่พบในยาดมสมุนไพรแต่ละลักษณะผลิตภัณฑ์และผลการจัดจำแนกโดยวิธีทางฟีโนทัยป์ 27
5. แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อราปนเปื้อนในอากาศจากยาดมสมุนไพร 3 กลุ่ม ด้วยวิธีทางฟีโนทัยป์และจีโนทัยป์ 30
6. แสดงจำนวนตัวอย่างยาดมสมุนไพรแต่ละลักษณะที่พบเชื้อก่อโรค และเชื้อที่ไม่ก่อโรค / สรุปไม่ได้ 31
7. แสดงปริมาณและชนิดของเชื้อราที่พบจากตัวอย่างยาดมสมุนไพร 32

# สารบัญรูปภาพ

**รูปที่** **หน้า**


1. แสดงฉลากที่ระบุยาดมสมุนไพรเป็นยาแผนโบราณ และเป็นยาสามัญประจำบ้าน 3
2. แสดงลักษณะของยาดมสมุนไพรทั้ง 3 ลักษณะที่นำมาใช้ในงานวิจัย 25
3. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agrose gel 28
4. แสดงหน้าจอของเครื่อง NanoDrop 28
5. แสดง PCR product บริเวณ ITS 1-ITS 2 regions ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Universal primer ของเชื้อราคือ ITS 1 และ ITS 4 บน 1.5% Agarose gel 29
6. แสดงฉลากของยาดม 39

# บทที่ 1

# บทนำ

**ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา**

เชื้อราพบได้ในสิ่งแวดล้อมพบทั่วไปตามดิน ฝุ่นละอองในอากาศ กองใบไม้ ใบหญ้าที่เน่าเปื่อย ไม่ว่าจะเป็นบริเวณอากาศหนาวที่มีหิมะตก หรือตามทะเลทราย ส่วนมากมักไม่ก่อโรค ยกเว้นเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* ที่ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ (Shah and Panjabi. 2014 : 8-29) ในคนที่มีสุขภาพแข็งแรง นอกจากนี้ยังพบเชื้อรากลุ่มฉวยโอกาส (opportunistic fungi) (Howard. 2003) เช่น *Biopolaris* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria* spp. และ *Mucor* spp. ที่พบว่ามีรายงานก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง อาการมีตั้งแต่รุนแรงน้อยจนถึงมากและอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ เนื่องจากเชื้อที่กล่าวมาข้างต้นพบได้ทั่วไปใน อากาศและ สิ่งแวดล้อม ดังนั้นสิ่งของอุปโภค และบริโภคที่ไม่สะอาด หรือไม่มีการปกปิดอย่างมิดชิด มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนและ ส่งผลให้ผู้ใช้หรือผู้บริโภคติดเชื้อเหล่านี้โดยการหายใจนำเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไปในร่างกาย

ยาดมสมุนไพรเป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากสภาวะอากาศของประเทศไทย มีอุณหภูมิที่ร้อน และอบอ้าว ส่งผลให้เกิดอาการหน้ามืด วิงเวียนศีรษะ ลักษณะของยาดมสมุนไพรในท้องตลาดปัจจุบัน สามารถแบ่งเป็น 4 ประเภท คือ สมุนไพรอบแห้ง สมุนไพรอบแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย สมุนไพรบดเป็นผงละเอียดผสมน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดน้ำจากสมุนไพร ซึ่งส่วนมากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตกันในชุมชน จึงอาจทำให้ในบางขั้นตอนการผลิต หรือบรรจุภัณฑ์ อาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ โดยเฉพาะเชื้อราในอากาศได้ ถึงแม้สมุนไพรที่นำมาใช้ เช่น กานพลู ดอกจันทน์เทศ พริกไทยดำ โกศหัวบัว และกระวาน มีรายงานการวิจัย ว่าสารสกัดจากสมุนไพร เหล่านี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือฆ่าจุลชีพ แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับตัวสมุนไพร โดยตรง ว่ามีการออกฤทธิ์แบบใด และเมื่อมารวมกันจะมีการออกฤทธิ์อย่างไร

ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการตรวจหาเชื้อ *Aspergillus* spp. และเชื้อราในกลุ่มฉวยโอกาส ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งาน และวางจำหน่ายใน ท้องตลาด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำให้ผู้ใช้ตระหนักถึงความเสี่ยง และมีแนวทางในการป้องกันโรคที่มาจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในยาดมสมุนไพร

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

เพื่อตรวจหาเชื้อ *Aspergillus* spp. และเชื้อราในกลุ่มฉวยโอกาสในยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งานและวางจำหน่ายในท้องตลาด โดย

1. วิธีฟีโนทัยป์ (phenotypic method) การดูลักษณะมหสัณฐาน (โคโลนี) และ จุลสัณฐาน (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์: การทำ slide culture method)
2. วิธีจีโนทัยป์ (genotypic method) การดูความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมบริเวณ internal transcibed spacer 1 และ 2 (ITS 1-2) โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

**ขอบเขตของการวิจัย**

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเก็บตัวอย่างยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งานตามร้านค้าต่างๆ เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อรา *Aspergillus* spp. และเชื้อราในกลุ่มฉวยโอกาส ในห้องวิจัยราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 15 ยี่ห้อๆ ละ 3 ขวด ในช่วงเดือนมีนาคม – พฤษภาคม พ.ศ. 2556 เพาะเลี้ยงเชื้อจากยาดมสมุนไพรในอาหาร Sabouraud dextrose agar ที่มี Chloramphenical และทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Aspergillus* spp. และเชื้อราในกลุ่มฉวยโอกาส ด้วยวิธีฟีโนทัยป์ (phenotypic method) และ วิธีจีโนทัยป์ (genotypic method)

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาชนิดของเชื้อราที่พบในยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งาน
2. เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำให้ผู้บริโภคตระหนักถึงความปลอดภัยในการเลือกใช้ยาดมสมุนไพร
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้ผลิตในการให้ความตระหนักถึงกระบวนการผลิต เพื่อเพิ่มความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค
4. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับภาครัฐในการเน้นถึงความรู้ ความเข้าใจให้กับชุมชนเกี่ยวกับยาดมสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น

# บทที่ 2

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันว่า การใช้ยาแผนปัจจุบันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดการสะสมของสารเคมีในร่างกายเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีอาการข้างเคียงต่างๆ จากการใช้ยาเกิดขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้บริโภคหันกลับมาสนใจสิ่งที่ทำมาจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น สมุนไพรจึงถูกนำกลับมาใช้ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะด้านการรักษา โรค จะเห็นได้จากมีตำรับยารักษาโรค อย่างมากมาย และที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันคือ ยาดมสมุนไพร มีสรรพคุณเพื่อช่วยลดอาการหน้ามืด วิงเวียน โดยผู้ใช้ส่วนใหญ่เป็นผู้ที่มีอายุเลยวัยกลางคนขึ้นไป

อย่างไรก็ตามยาดมสมัยใหม่มีการปรับปรุงเพื่อให้มีความทันสมัยเป็นที่ น่าสนใจ ของกลุ่มวัยรุ่นมากขึ้น จึงได้รับการออกแบบให้มีความทันสมัย ขนาดกะทัดรัดเหมาะมือ ผลิตภัณฑ์รูปแบบนี้สร้างสรรค์เพื่อคนยุคใหม่ วัยทำงาน เนื่องจากคนยุคใหม่มักมีกิจกรรมและการผ่อนคลายหลังการทำงานในเวลาที่ค่อนข้างจำกัด จึงมักผ่อนคลายด้วยกลิ่นบำบัด (Aromatic therapy) ยาดมจึงเป็นหนึ่งทางเลือกที่ผู้บริโภคนิยม

**1. ยาดมสมุนไพร**

เป็นยาที่จัดอยู่ในประเภทเป็นยาสมุนไพรประจำบ้าน หรือยาสามัญประจำบ้าน (รูปที่ 1) ใช้สูดดม บรรเทาอาการวิงเวียน หน้ามืด ตาลาย เป็นหวัด คัดจมูกซึ่งมีวิธีทำที่ง่ายหาสมุนไพรได้สะดวก

**รูปที่ 1** แสดงฉลากที่ระบุยาดมสมุนไพรเป็นยาแผนโบราณ และเป็นยาสามัญประจำบ้าน

ตำรายาโบราณให้วิธีการปรุงยาเตรียมรูปแบบนี้ไว้ว่า เตรียมจาก “ยาสดหรือแห้ง เมื่อผสมแล้วให้บดเป็นผงหยาบ บรรจุภาชนะเอาไว้ดม” (ชยันต์ พิเชียรสุนทร. 2556:422) โดยตำรับยาอาจกำหนดตัวยาที่เป็นส่วนประกอบไว้หลายสิ่งขึ้นอยู่กับแต่ละตำรับดังนี้

**1.1. ส่วนประกอบของยาดมสมุนไพร**

1.1.1. การบูร (เจนจบ ยิ่งสุมล. 2555 : 288)

สรรพคุณ : เปลือกและรากตากแห้งแล้วนำมาบด ชงกินแก้ปวดเส้นประสาท แก้เคล็ด บวม ปวดท้อง ท้องร่วง ขับน้ำเหลือง แก้เลือดลม ขับเหงื่อ ทำลายเสมหะ แก้โรคตา ขับ ผายลม

1.1.2. เกล็ดสะระแหน่ (เจนจบ ยิ่งสุมล. 2555 : 288) หรือ เมนทอล มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นหอมเย็น มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากใบมิ้นต์ หรือที่เรียกว่าใบสะระแหน่ฝรั่ง

สรรพคุณ: ช่วยในการขับลม มักใช้แต่งกลิ่นและรสยา เช่น ยาเคลือบกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่อย่างอ่อนๆ ลดการบวมของหลอดเลือดที่จมูก และลดอาการปวด สารนี้เมื่อสัมผัสกับผิวหนังทำให้รู้สึกเย็น

1.1.3. พิมเสน (อมรรัตน์ อนันต์วราพงษ์ และคณะ. 2555)

สรรพคุณ: มีกลิ่นหอมเย็น ใช้สูตรดมแก้ลมวิงเวียน ทาภายนอกแก้เคล็ดขัดยอก

1.1.4. กานพลู (พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. 2551: 303)

สรรพคุณ: ดอก มีรสเผ็ด กินสดหรือชงน้ำร้อน กินเป็นยาแก้พิษโลหิต แก้ปวดท้อง แก้ลม บรรเทาอาการเหน็บชา แก้พิษน้ำเหลือง ขับน้ำคาวปลา บำรุงระบบขับถ่าย แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ปวดฟัน แก้หืดหอบ ละลายเสมหะ ดับกลิ่นปาก

1.1.5. กระวาน (พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. 2551 : 303)

สรรพคุณ: เมล็ด มีน้ำมันหอมระเหย สกัดมาใช้เป็นยาบำรุงธาตุ ลดเสมหะ ขับลม ใช้ปรุงแต่งกลิ่นอาหาร

1.1.6. ดอกจันทน์เทศ (นิจศิริ เรืองรังษี และธวัชชัย มังคละคุปต์. 2547)

สรรพคุณ: ผล ให้ Myristica Oil ซึ่งเป็น Volatile Oil ประกอบด้วย Myristiein และ Safrole ซึ่งเป็นตัวแต่งกลิ่น และขับลม

1.1.7. หัวบัว (ทัศนีย์ ฮาซาไนน์ และคณะ. 2551 : 208)

สรรพคุณ : แก้ลมอันเกิดจากอาการริดสีดวงภายในลำไส้ แก้ขับไล่ลมทั้งปวงในกระเพาะ ทำให้ผายลมหรืออาการเรอออกมาทางปาก เจริญอาหาร ระงับอาการคลื่นเหียนในลำไส้

1.1.8. พริกไทยดำ (พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. 2551 : 303)

สรรพคุณ : ช่วยขับลม ขับเสมหะ ขับเหงื่อ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้อาการอาหารไม่ย่อย

1.1.9. น้ำมันหอมระเหย (ชยันต์ พิเชียรสุนทร และ วิเชียร จีรวงส์. 2545 : 94)

เป็นส่วนที่ได้จากส่วนต่างๆ ของพืชด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การบีบ การกลั่น (ด้วยไอน้ำ) การดูดซับกลิ่น เป็นต้น น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรืออาจจะเรียกว่า essential oil, ethereal oil) พบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น ตามปกติน้ำมันหอมระเหยไม่มีสี ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง และ เมื่อตั้งทิ้งไว้นาน อาจจะถูกออกซิไดซ์ ทำให้สีเข้มขึ้น ดังนั้นจึงควรเก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท เก็บไว้ในที่แห้ง และเย็นคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย ได้แก่

- สี: น้ำมันหอมระเหยที่บริสุทธิ์ และสกัดใหม่ๆ ส่วนใหญ่จะไม่มีสี แต่ถ้าถูกแสง และอากาศนานๆ จะทำให้มีสีต่างๆ เกิดขึ้น
- กลิ่น: น้ำมันหอมระเหยมีกลิ่นต่างๆ แต่ละชนิดมีกลิ่นเฉพาะตัว
- รส: มีรสแตกต่างกัน บางชนิดมีรสหวาน บางชนิดมีรสที่ทำให้รู้สึกร้อน และแสบลิ้น
- การละลาย: ละลายได้ใน organic solvents แต่ไม่ละลาย หรือละลายได้น้อยในน้ำ
- ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity): น้ำมันหอมระเหยที่ถูกกำหนดในเกณฑ์เภสัชตำรับ จะมีค่าระหว่าง 0.842-1.172 และส่วนใหญ่จะเป็นน้ำมันที่เบากว่าน้ำ

ในคู่มือผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรเพื่อเศรษฐกิจชุมชนได้กำหนดให้ว่า พืชสมุนไพรเมื่อได้มาแล้วต้องทำการคัดเลือกสิ่งปนปลอมออกได้ด้วยตาเปล่า ล้างด้วยน้ำ หรือถ้าไม่สามารถล้างน้ำได้ก็จะเช็ดด้วยผ้าสะอาด สมุนไพรที่มีขนาดใหญ่หรือหนา หรือมีเนื้อแข็งก็จะตัดให้เล็กลงหรือบางลงเพื่อให้สะดวกต่อการทำให้แห้ง และการเก็บรักษา สำหรับการทำให้แห้งนั้นอาจใช้การตากแดด อบในตู้อบ หรือผึ่งในที่ร่ม (สำหรับสมุนไพรที่มีสารระเหยง่าย) แล้วนำมาเก็บไว้ในภาชนะบรรจุที่สะอาดและป้องกันการปนเปื้อน (นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ. 2545 : 288) ดังนั้นในแต่ละขั้นตอนอาจพบมีการปนเปื้อนของสารเคมีหรือเชื้อจุลชีพได้ หากผู้ผลิตไม่ได้ตระหนักถึงตรงนี้ โดยเฉพาะเชื้อราฉวยโอกาส ซึ่งมีรายงานการก่อโรคในคนที่ได้รับเชื้อเหล่านี้เข้าไป เช่น *Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria* spp., และ *Mucor* spp. (Safirstein. 1976 : 788-790,

Sasaki et al. 1970 : 43-47, Bavbek et al. 2006 : 421-426, Rozanska-Kudelska et al. 2009 : 245-248)

**2. เชื้อราก่อโรคฉวยโอกาส**

**2.1. *Aspergillus* spp.** (O'Neill and Penman. 1971 : 392-396, พรรณกร อิ่มวิทยา. 2543 )

เชื้อสกุล *Aspergillus* จัดเป็นเชื้อราฉวยโอกาส (opportunistic fungi) ที่พบได้บ่อยที่สุด โคโลนีมีสีต่างๆกัน เจริญที่อุณหภูมิห้อง และ/หรือ 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส คุณสมบัติของเชื้อสกุล *Aspergillus* คือ เป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกั้น (septate hyphae) ชนิดสายราไม่มีสี สร้างก้านชู (conidiophore) งอกตรงจากสายรา ตำแหน่งที่ก้านชูงอกจากสายรา เรียกว่า foot cell ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าสายรา และ มีขอบเขตที่ชัดเจน ปลาย ของก้านชูจะพองออกเป็นกระเปาะ (vesicle) บนกระเปาะมีติ่ง (phialide) ชั้นเดียว (uniseriate) หรือสองชั้น (biseriate) ติ่งอาจเกาะรอบกระเปาะ หรือเพียงบางส่วนของกระเปาะ และปลายติ่งเป็นที่เกิดของโคนิเดีย (phialoconidia) ซึ่งมีเซลล์เดียว มักกลม โคนิเดียอ่อนจะอยู่ปลายติ่ง เวลาที่โคนิเดียอ่อนเกิดจะดันโคนิเดียแก่ออกไป จึงปรากฏโคนิเดียเป็นสาย (basipetal chain)

2.1.1. อุบัติการณ์ และระบาดวิทยา

เป็นเชื้อราที่พบอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ อากาศ เมล็ดธัญพืช เจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้องและ/หรือ 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสู งกว่านี้ แม้เชื้อจะมีมากและโอกาสที่คนเราจะหายใจเอาสปอร์เข้าไปได้สูง แต่โอกาสของการติดเชื้อต่ำ เนื่องจากคนปกติมีระบบภูมิคุมกันของร่างกายคอยต่อต้านการติดเชื้อ การเกิดโรค Aspergillosis จะพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเป็นภาวะแทรกซ้อนร่วมกับโรคอื่นที่ ผู้ป่วยเป็นอยู่ ก่อนแล้ว โดย Aspergillosis ที่มีรายงานครั้งแรก ในปอดของนกตะขาบ (*Carvus glandarius*) โดย O'Neill and Penman (1971 : 392-396) สำหรับในคน มีรายงานพบเป็นครั้งแรกเรียก เชื้อตัวนี้ว่า *A. pneumomycosis* ปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคนี้เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ อาจเนื่องมาจากภูมิต้านทานของคนลดต่ำลง เนื่องมาจากภาวะแวดล้อมจากการใช้ยาจำพวกสเตียรอยด์และยาปฏิชีวนะ รวมทั้งยารักษาโรคมะเร็ง (antineoplastic drugs) ในคน และการปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นต้น เชื้อที่มีรายงานความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุด คือ *A. fumigatus* รองลงมาได้แก่ *A. niger* และ *A. flavus* (Rupp et al. 2008 : 270-271)

2.1.2. การก่อโรค (พรรณกร อิ่มวิทยา. 2543) แบ่งได้ตามบริเวณที่ก่อโรคดังนี้

- ก่อโรคที่ปอด (Pulmonary Aspergillosis) (Khan et al. 2003 : 156-168) เกิดจากการสูดดมเชื้อ อาจเกิดปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (hypersensitivity) ชนิดที่ 1 ผู้ป่วยมีอาการหอบหืด

(bronchial asthma) นอกจากนี้บางรายมีปฏิกิริยาตอบสนองของเนื้อเยื่อที่ปอดซึ่งแบ่งได้เป็น 4 แบบ คือ

- Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis เกิดจากปฏิกิริยาภูมิไวเกินของร่างกายต่อเชื้อที่อยู่ตามหลอดลม เชื้อไม่บุกรุกเข้าเนื้อเยื่อของปอด แต่จะจับอยู่ที่หลอดลม เยื่อบุหลอดลมอาจแดงและนุ่ม ปฏิกิริยาภูมิไวเกินที่เกิดขึ้นมีทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 ผู้ป่วยมีอาการหอบ ไอ เสมหะปนเลือด การใช้ยาฆ่าเชื้อพ่นเข้าไปในคอของผู้ป่วยมักไม่ได้ผลจำเป็นต้องให้ยาพวกสเตอรอยด์
- Extrinsic Allergic Alveolitis (Hypersensitivity Pneumonitis) พบได้ในคนที่สูดดมโคนิเดีย และสายราของเชื้อไปมากๆ เช่น คนงานในโรงกลั่นสุรา (malt worker's lung) ซึ่งเชื้อที่ปนเปื้อนมักได้แก่ *A.clavatus* ปนเปื้อนอยู่ในข้าวบาร์เลย์ อาการเกิดขึ้นประมาณ 6 ชั่วโมง ภายหลังการสูดดม มีอาการไอ หอบ มีไข้ หนาวสั่น เมื่อตรวจปอดพบเสียง bronchi ภาพถ่ายรังสีปอดพบ diffuse interstitial infiltrate ถ้าผู้ป่วยยังคงสูดดมเชื้อต่อไปจะเกิด granulomatous disease ปฏิกิริยาภูมิไวเกินที่เกิดขึ้นมีทั้งชนิดที่ 3 และ 4
- Invasive Bronchopulmonary Aspergillosis เกิดจากการสูดดมเชื้อ ทำให้เชื้อเข้าไปอยู่ในหลอดลมและบุกรุกเข้าหลอดเลือด และเนื้อเยื่อในปอด มักเกิดตามหลังโรคปอดอักเสบจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส การผ่าตัดปอด อาจเป็นโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยมะเร็ง และโรคเอดส์ นานๆครั้งจะมีรายงานการก่อโรคในผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยมาก่อน และตรวจไม่พบความบกพร่องทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย
- Aspergilloma มักเกิดขึ้นในรายที่ปอดมีโพรงอยู่แล้ว เช่น วัณโรคปอด หลังปอดบวม เชื้อเข้าไปอยู่ในโพรง ร่างกายมักไม่มีปฏิกิริยาตอบสนอง เรียกกลุ่มเชื้อราที่เข้าไปอยู่ในโพรงว่า "fungus ball" มักพบในผู้สูงอายุ ผู้ป่วยมีอาการไอ มีเสมหะปนเลือดเป็นพักๆ และตรวจพบเชื้อ *A. fumigatus* ได้จากเสมหะ

- ก่อโรคที่ระบบประสาท (Nervous System Aspergillosis) เป็นผลจากการติดเชื้อที่ปอด แล้วเชื้อกระจายเข้ากระแสเลือด หรือบุกรุกจากตา จมูก จากการผ่าตัดสมอง โรคอาจอยู่ที่

สมองใหญ่หรือสมองน้อย ผู้ป่วยอาจมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ ชัก ความดันในลูกตาเพิ่มขึ้น ถ้าเป็นที่สมองน้อยจะเสียการทรงตัว นอกจากนี้โรคอาจอยู่ที่ไขสันหลัง เกิดอาการอ่อนแรงของแขนหรือขา แล้วแต่ตำแหน่งที่โรคไปกดเบียด

- ก่อโรคที่ผิวหนัง (Cutaneous Aspergillosis) เกิดจากการกระจายของเชื้อในภาวะที่ผิวหนังเสียรูป เช่น ถูกไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ลัก ษณะทางคลินิกอาจเป็นตุ่ม ก้อน บริเวณผิวหนัง ผิวหนังหนา สีคล้ำ บางครั้งอาจเป็นผื่นแดง คันและปวด ต่อมากลายเป็นแผลเรื้อรัง

- ก่อโรคที่บริเวณ จมูก หู มักพบเชื้อ *Aspergillus* ในโพรงอากาศบริเวณจมูก และทำให้เกิดการอักเสบ หูชั้นนอก มักตรวจพบเชื้อ *Aspergillus* ในคนที่ชอบแคะหูอาจก่อโรค otomycosis ผู้ป่วยมีอาการปวด คันในหู

- ก่อโรคที่ตา ในรายที่กระจกตามีบาดแผล เชื้อ *Aspergillus* ที่อยู่ตามธรรมชาติและตรวจพบได้บริเวณตาของคนปกติ อาจก่อโรคกระจกตาอักเสบ (mycotic keratitis) บางรายอาจก่อโรคในเบ้าตา ซึ่งมักกระจายมาจากไซนัส

- ก่อโรคแบบแพร่กระจาย (Disseminated Aspergillosis) (Belousov and Maneshina. 2006 : 26-46) ก่อโรคที่อวัยวะใดๆก็ได้ เช่น หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับและไต เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยถึงแก่กรรม มักพบในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ ถ้าตรวจทางพยาธิวิทยา พบสายราไม่มีสี สายราแตกแขนง ทำมุม 45 องศา (dichotomous branching)

2.1.3 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ (พรรณกร อิ่มวิทยา. 2543, O'Neill and Penman. 1971 : 392-396 )

2.1.3.1 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

สิ่งส่งตรวจได้แก่ หนอง ชิ้นเนื้อ ที่ต้องไม่แช่ฟอร์มาลิน ชิ้นกระจกตา (corneal scraping) หรือเสมหะ นำมาหยดด้วยน้ำยา 10% KOH แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า สายราที่พบจะมีลักษณะเป็นสายชนิดมีผนังกั้นและมีการแตกแขนงเป็นสองง่าม (dichotomous branching septate hyphae)

2.1.3.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) ที่ไม่ผสมยา cycloheximide โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 สัปดาห์จะพบลักษณะโคโลนีปรากฏสีและลักษณะของโคโลนี ที่ใช้ในการจัดจำแนกแสดงใน ตารางที่ 1 เมื่อทำ slide culture เพื่อดูลักษณะเด่นทางกล้องจุลทรรศน์ แอสเปอร์จิลลัสทุกสปีชีส์มีลักษณะคล้ายกันดังนี้เป็นสายราชนิดมีผนังกั้น สร้างก้านชูสปอร์ สั้นหรือยาวมีผิวเรียบหรือหยาบแล้วแต่ชนิดของเชื้อ ส่วนปลายของก้านชูสปอร์พองออกเป็นรูปกลมหรือกระบอง เรียกว่า vesicle บน vesicle มีก้าน (phialides หรือ

sterigma) เรียงเป็นแถว ถ้ามีแถวเดียวเรียก unseriate ถ้าเป็นสองแถวซ้อนกันเรียก biseriate ที่ปลายเป็นที่เกิดของ phialoconidia รูปกลมหรือรี ผนังเรียบหรือหยาบ เรียงต่อเป็นสาย เชื้อ *Aspergillus* แต่ละ species มีลักษณะของ conidial head แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

2.1.3.3. การตรวจทางซีรั่มวิทยา (Schaefer et al. 1976 : 325-329)

วิธี immunodiffusion test (ID) เพื่อตรวจหา precipitin band ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. fumigatus* จะให้ผลบวกร้อยละ 70-100 ในผู้ป่วย allergic aspergillosis และผู้ป่วย aspergilloma สำหรับในราย invasive aspergillosis อาจให้ผลลบเทียมหรือผลบวกเทียมได้ การทดสอบ ID นี้ เตรียมแอนติเจนของแอสเปอร์จิลลัสจากน้ำเลี้ยงเชื้อหรือจากเซลล์เชื้อราเป็นแอนติเจนที่ให้เข้มข้นหรืออาจเตรียมเป็นแอนติเจนบริสุทธิ์ โดยทั่วไปแอนติเจนที่ใช้มักเตรียมมาจาก *A. fumigatus* นำแอนติเจนที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยากับซีรั่มของผู้ป่วย อ่านผลโดยดูแถบปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี (precipitin bands) ที่เกิดขึ้นระหว่างหลุมที่ใส่แอนติเจนและแอนติซีรั่ม ซึ่งอาจพบได้ตั้งแต่ 1 ถึง 12 แถบ อ่านผลเป็นบวกดังนี้ ผลบวกจาง (trace) พบจำนวน 1-2 band ผลบวกอ่อน (weak) พบจำนวน 3-4 band และผลบวกแก่ (strong positive) พบจำนวน 5-12 band

วิธี indirect fluorescent antibody test ระหว่างแอนติบอดีในซีรั่มของผู้ป่วยและเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยให้เซลล์เชื้อราซึ่ง จำเพาะ กับแอนติบอดีใน ซีรั่มทำปฏิกิริยากับ fluorescein isothiocyanate labelled heterologous antibodies (ได้จากการฉีด human IgG หรือ IgM เข้าสัตว์และแยกซีรั่ม ) สรุปการวินิจฉัยโรคแอสเปอร์จิลลัสแต่ละแบบมักได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

2.1.3. 4. การตรวจหา galactomannan

Galactomannan (GM) จัดเป็น heat-stable heteropolysaccharide ที่พบในผนังเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus* และ *Penicillium* ทุกสปีชีส์ มีหลายประเทศในทวีปยุโรปรวมทั้งในประเทศไทยที่ใช้การตรวจหา GM ในซีรัม เพื่อช่วยวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อ เนื่องจาก *Aspergillus* spp. โดยเฉพาะโรคติดเชื้อแบบลุกลาม ข้อเสียคือ การตรวจด้วยวิธีนี้ไม่สามารถบอกสปีชีส์ของเชื้อได้ (Whitney et al. 2013 : 180-185)

**ตารางที่ 1** แสดงลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Aspergillus* spp. (พรรณกร อิ่มวิทยา. 2543)

| เชื้อ | ลักษณะโคโลนี | ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ |
|---|---|---|
| *A. fumigatus* | ด้านหน้ามีสีเขียวอมเทาหรือน้ำเงิน เมื่อโคโลนีแก่จะเข้มขึ้นอาจเป็นสีน้ำตาล ด้านหลังโคโลนีมีสีขาวเหลือง | - ปลายก้านชู (conidiophore) พองออกเป็นกระเปาะ (vesicle) กระเปาะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-30 ไมโครเมตร รูปทรงกระบอก (columnar)<br>- บนกระเปาะมีติ่ง (phialide) ชั้นเดียว (uniseriate, single series) อัดกันแน่นขนานกับก้านชู ติ่งเกาะรอบกระเปาะตอนบนประมาณ 1/3 - 2/3 ของกระเปาะ<br>- โคนิเดียเกิดจากติ่ง มีรูปกลมหรือรี ผิวเรียบหรือเป็นหนามละเอียด (finely echinulate) ต่อกันเป็นสาย |
| *A. flavus* | โคโลนีด้านหน้ามีสีเขียวอมเหลืองหรือน้ำตาล | - ปลายก้านชูพองออกเป็นกระเปาะรูปโดม (dome-shaped) ขนาด 10-40 ไมโครเมตร<br>- บนกระเปาะมีติ่งชั้นเดียว เมื่อโคโลนีแก่ มีติ่งได้สองชั้น ติ่งเกาะรอบๆกระเปาะ คล้ายรัศมี<br>- โคนิเดียเกิดจากติ่ง รูปมักกลม ผิวไม่เรียบ ต่อกันเป็นสาย |
| *A. niger* | โคโลนีด้ านหน้าเริ่มขึ้นมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดำ ด้านหลังไม่มีสีหรือมีสีเหลือง ผิวหน้าเป็นเม็ดเล็กๆ (granular) | - บนกระเปาะมีติ่ง เริ่มแรกมีชั้นเดียว ต่อมามีสองชั้น ติ่งเกาะรอบกระเปาะ<br>- โคนิเดียเกิดจากติ่ง รูปกลม สีน้ำตาลหรือดำ ผนังหนาและขรุขระ<br>- ปลายก้านชูพองเป็นกระเปาะ กระเปาะรูปกลมขนาด 20-50 ไมโครเมตร บางครั้งอาจถึง 100 ไมโครเมตร |

**ตารางที่ 2** แสดงวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคแอสเปอร์จิลโลสิสแต่ละแบบ

| ชนิดของโรค | ผลการเพาะเชื้อ | ผลทางซีรั่มวิทยา |
|---|---|---|
| Allergic bronchial aspergillosis | พบเชื้อในเสมหะ<br>พบเซลล์ eosinophil สูงในเลือดและในเสมหะ | Weak positive |
| Aspergilloma | มักตรวจไม่พบเชื้อราในเสมหะ | Strong positive |
| Invasive aspergillosis | พบเชื้อราในเสมหะ หรือชิ้นเนื้อ biopsy | Strong positive แต่มักให้ผลไม่แน่นอน |

**2.2 *Bipolaris* spp.**

พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ซากพืช ซากสัตว์ และในดิน เป็นเชื้อราในกลุ่ม dematiaceous สายราสีเข้มมีผนังกั้น ก้านชูสปอร์โค้งและมีลักษณะซิกแซก โคนิเดียผนังเรียบหนา รูปยาว ปลายมน ขนาด 6-12×16-35 ไมโครเมตร ภายในมีหลายเซลล์เรียงต่อกัน งอกที่ปลายก้านชูสปอร์ และมีเซลล์อื่นๆงอกในตำแหน่งต่ำถัดลงไป เชื้อเจริญใน 5-10 วัน โคโลนีระยะแรกสีน้ำตาลปนเทา เมื่อแก่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีดำ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่ ใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ที่ก่อโรคในคนมี 3 สายพันธุ์ คือ *B. australiensis , B. hawaiiensis* และ *B. spicifera* (Rao, et al. 1989 : 280-281) ซึ่งมีข้อแตกต่างกันตรงจำนวนโคนิเดียคือ *B. australiensis* โคนิเดียมี 3 เซลล์เป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้อยประมาณร้อยละ 10 โคนิเดียมี 4-5 เซลล์ *B. hawaiiensis* โคนิเดียมี 5-6 เซลล์ ส่วนน้อยมี 3 เซลล์ ส่วน *B. spicifera* โคนิเดียมี4 เซลล์ ส่วนน้อยที่มี 3 เซลล์

2.2.1 การก่อโรคในคน

*Bipolaris* spp. เป็นสาเหตุของ phaeohyphomycosis เป็นรอยโรคที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อราชนิดต่างๆ ในกลุ่ม dematiaceous fungi ที่อยู่ในดินและพืช Michael et al. (1986 : 250-259) รายงานว่ามีการเพิ่มขึ้นของโรค phaeohyphomycosis ที่เกิดจากเชื้อ ในกลุ่ม *Bipolaris* ได้แก่ *B. australiensis* (Rao et al. 1989 : 280-281), *B. hawaiiensis* (Costa et al. 1991 : 74-79) และ *B. spicifera* (McGinnis et al. 1992 : 383-386) ซึ่งพบรายงานการติดเชื้อในมนุษย์และสัตว์

2.2.2 อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกมีได้หลากหลาย ทั้งที่เป็นแบบแพร่กระจายไปยังอวัยวะภายในอื่น หรือเกิดลักษณะทางคลินิกของผิวหนังอย่างไม่เฉพาะเจาะ เช่น papule, nodule หรือ plague ก็ได้ ส่วน primary form นั้นก็สามารถแยกย่อยได้อีกเป็น 3 subtypes ได้แก่ 1) superficial form ซึ่งจะให้ลักษณะ ทางคลินิกแบบ Tinea nigra หรือ Black Piedra 2) cutaneous form นั้นจะให้ลักษณะคลินิกคล้าย Tinea infection และกลุ่มสุดท้าย 3) subcutaneous from จะให้ลักษณะทางคลินิกเป็นแบบ nodule หรือ plague ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมักพบในตำแหน่งที่มีโอกาสเกิด trauma ได้ง่าย

2.2.3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

พบ cystic space ที่มี collagenous capsule ล้อมรอบ และ lining ด้วย granulomatous inflammation ที่ประกอบไปด้วย histiocyte, giant cell, lymphocyte และ polymorphonuclear cell ประปราย ร่วมกับการมี necrosis ในบริเวณตรงกลางของ lesion ส่วนตัวเชื้อนั้นมักจะอยู่ใน giant cell และมีลักษณะเป็น brown, moniliform fungal element มีลักษณะเป็นสายรามีผนังกั้นที่มีความคอดกิ่วตรงบริเวณผนังกั้นมีความกว้างของสาย hyphae ประมาณ 2-6 ไมโครเมตร บางครั้งอาจพบ yeast like cell ร่วมด้วยได้ โดยอาจจะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกันเป็นสายก็ได้ phaeohyphae นั้นจะไม่สร้าง granule ส่วนสีน้ำตาลที่เราเห็นนั้นเกิดจากสีของ melanin pigment ใน cell wall ของตัว fungus เองลักษณะ tissue reaction ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อในกลุ่มนี้มักมี epidermis ด้านบนไม่แตกต่างจากภาวะปกติ

2.2.4 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

2.2.4.1 สิ่งส่งตรวจ ได้แก่ หนอง เสมหะ หรือชิ้นเนื้อ

2.2.4.2 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจหาเชื้อราในเบื้องต้นที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่ละตัวอย่างของสิ่งส่งตรวจมีวิธีการตรวจหาแตกต่างกันคือ การตรวจหาสายราที่พันกันจนเป็นขดขนาดเล็กตั้งแต่ 20 ไมโครเมตร ถึง 10 นาโนเมตร ที่เรียกว่า grains หรือ granules และ/หรือ การทำ KOH preparation ด้วย 10% KOH สำหรับหนองหรือเสมหะเพื่อดูสายรา ถ้าเป็นชิ้นเนื้อ ให้แตะหรือถูชิ้นเนื้อบนแผ่นสไลด์ นำไปย้อมด้วยสี Wright's stain, H&E stain, Fontana-Masson หรือ melanin stains อื่นๆ

2.2.4.3.การเพาะเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่มียา chloramphenicol (ระงับการเจริญของแบคทีเรีย) หรือ brain-heart infusion agar (BHI) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส โคโลนีระยะแรกสีน้ำตาลปนเทา เมื่อแก่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีดำลักษณะคล้ายกำมะหยี่ ใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ

2.2.4.4.การทำ slide culture วิธีนี้เชื้อราจะแนบไปกับสไลด์ เห็นลักษณะของเชื้อราได้ชัดเจน จะพบลักษณะสายราสีเข้มมีผนังกั้น ก้านชูสปอร์โค้งและมี ลักษณะซิกแซก โคนิเดียผนังเรียบหนา รูปยาว ปลายมน ขนาด 6-12×16-35 ไมโครเมตร ภายในมีหลายเซลล์เรียงต่อกัน งอกที่ปลายก้านชูสปอร์ และมีเซลล์อื่นๆงอกในตำแหน่งต่ำถัดลงไป

**2.3 *Curvularia* spp.**

เชื้อ *Curvularia* spp. พบได้ในดิน พืช ธัญญาพืชในเขตร้อนหรือเขตอบอุ่น โดยปกติจัดเป็น secondary organism หรือ weak pathogen ของธัญพืชแต่ในบางสภาวะก็ทำให้เกิดโรคที่รุนแรงได้ เชื้อ *Curvularia* เป็นราในกลุ่ม dematiaceous สายราสีเข้มมีผนังกั้น ก้านชูสปอร์สีเข้มเป็นก้านเดี่ยวหรือแตกแขนง มีโคนิเดียขนาดใหญ่ 8-14×21-35 ไมโครเมตร มักอยู่รวมเป็นกระจุกที่ปลายก้าน ภายในมีเซลล์จำนวนประมาณ 5 เซลล์เรียงต่อกัน โดยมีเซลล์กลางพองใหญ่และมีสีเข้มกว่าเซลล์ที่อยู่ส่วนปลายทั้งสองข้าง เชื้อเจริญให้เห็นโคโลนีได้อย่างชัดเจนภายในเวลา 5-7 วัน โคโลนีสีเข้มตั้งแต่เขียวมะกอกถึงน้ำตาลหรือดำ ลักษณะผิวหน้าโคโลนีฟูเล็กน้อย ใต้โคโลนีสีน้ำตาลถึงดำ สายพันธุ์ที่พบได้ทั่วโลก และพบได้บ่อยคือ *C. lunata* มีผนังกั้นตามขวาง 3 อัน ส่วน *C. geniculate* มีผนังกั้นตามขวาง 5 อัน

2.3.1 การก่อโรคในคน

เชื้อ *Curvularia* spp. เป็นราฉวยโอกาส ก่อโรคที่กระจกตา โพรงจมูก นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของ phaeohyphomycosis เช่นเดียวกับ *Bipolaris* spp. ที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยมีรอยโรคเกิดขึ้นได้หลายแห่งเช่น เล็บ เนื้อเยื่อชั้น subcutaneous และยังก่อโรคกับอวัยวะภายในได้อีกด้วย โดยเฉพาะสมอง (Fernandez et al. 1999 : 727-731)

2.3.2. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

2.3.2.1.สิ่งส่งตรวจได้แก่ หนอง เสมหะ หรือชิ้นเนื้อ

2.3.2.2.การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจหา grains หรือ granules และ/หรือ การทำ KOH preparation ด้วย 10% KOH สำหรับหนองหรือเสมหะเพื่อดูสายรา ถ้าเป็นชิ้นเนื้อ ให้แตะหรือถูชิ้นเนื้อบนแผ่นสไลด์ นำไปย้อมด้วยสี Wright's stain, H&E stain, Fontana-Masson หรือ melanin stains อื่นๆ

2.3.2.3.การเพาะเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่ผสมยา chloramphenicol (ระงับการเจริญของแบคทีเรีย) หรือ brain-heart infusion agar (BHI) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส โคโลนีที่ได้มีสีเข้มน้ำตาลหรือดำ ลักษณะผิวหน้าโคโลนีฟูเล็กน้อย ใต้โคโลนีสีน้ำตาลถึงดำ

2.3.2.4. การทำ slide culture พบลักษณะสายราสีเข้มมีผนังกั้น ก้านชูสปอร์สีเข้มเป็นก้านเดี่ยวหรือแตกแขนง มีโคนีเดียขนาดใหญ่ 8-14×21-35 ไมโครเมตร โค้งเล็กน้อยมักอยู่รวมเป็นกระจุกที่ปลายก้าน ภายในมีเซลล์จำนวนประมาณ 5 เซลล์เรียงต่อกัน โดยมีเซลล์กลางพองใหญ่และมีสีเข้มกว่าเซลล์ที่อยู่ส่วนปลายทั้งสองข้าง

**2.4 *Alternaria* spp.**

เชื้อ *Alternaria* spp. พบทั่วไปในธรรมชาติ อากาศ ดินพืช และอาหาร เป็นเชื้อราในกลุ่ม dematiaceous fungi สายราสีเข้มมีผนังกั้น ก้านชูโคนิเดียส่วนใหญ่เป็นก้านเดี่ยวบางครั้งมีลักษณะซิกแซกสั้นยาวไม่เท่ากัน โคนิเดียมีขนาดใหญ่ 8-16 x 23-50 ไมโครเมตร สีน้ำตาลถึงดำลักษณะยาวรีส่วนโคนที่ติดกับก้านชูสปอร์กลมป้านใหญ่คล้ายกระบองอาจอยู่เดี่ ยวหรือเรียงต่อกันเป็นสายยาวแต่ละโคนิเดีย ประกอบด้วยหลายเซลล์แบ่งตามแนวขวางและแนวตั้ง เชื้อเจริญภายใน 5-10 วัน โคโลนีปุย สีน้ำตาลเข้มหรือเขียวมะกอก ใต้โคโลนีสีดำ สายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการก่อโรคและพบได้บ่อย ได้แก่ *Alternaria alternate* (Prince et al. 1956 : 15-17)

2.4.1 การก่อโรคในคน

เป็นสาเหตุของโรค phaeohyphomycosis เช่นเดียวกับ *Bipolaris* spp. และ *Curvularia* spp. ที่กล่าวไว้ข้างต้น โรคที่พบบ่อยคือ ไซนัสอักเสบและหอบหืด (Chevalier and Azuelos. 1994 : 68-69) ไซนัสอักเสบชนิดภูมิแพ้ (allergic fungal rhinosinusitis) ในกลุ่มผู้ป่วยไซนัสอักเสบที่มีภาวะภูมิแพ้ต่อเชื้อรา ร่วมกับอาการคัดจมูกจากริดสีดวงจมูก เกิดจากเชื้อราหลายชนิด แต่ชนิดที่พบได้บ่อยๆได้แก่ *Bipolaris*, *Curvularia* และ *Alternaria* การรักษาผู้ป่วยในกลุ่มนี้ คือ การให้สเตียรอยด์ (ทั้งชนิดรับประทาน และชนิดพ่นจมูก ), การผ่าตัดเอาริดสีดวงจมูกออก และระบายสารคัดหลั่งออกจากโพรงไซนัส รวมทั้งการฉีดวัคซีนรักษาภาวะภูมิแพ้ต่อเชื้อรา

2.4.2. ลักษณะทางคลินิกและอุบัติการณ์

พบในผู้ป่วยวัยหนุ่มสาว อายุเฉลี่ยประมาณ 23-26 ปี มีประวัติภูมิแพ้ร่วมด้วยร้อยละ 60 และ ร้อยละ 50 มีประวัติโรคหืดร่วมด้วย อาการต่างๆ ของผู้ป่วย เช่น คัดจมูก น้ำมูกไหล มูกไหลลงคอ หรือ ไม่ค่อยได้กลิ่นนั้น มักจะเป็นมานานเป็นเดือน หรือเป็นปี ผู้ป่วยมักไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่า เริ่มมีอาการเหล่านี้ตั้งแต่เมื่อไร เนื่องจากอาการต่างๆ มักค่อยๆ เป็น ผู้ป่วยบางคนอาจให้ประวัติว่ามี “ก้อนสีน้ำตาลหรือเหลืองเข้ม” ออกมาจากจมูกเมื่อสั่งน้ำมูก การตรวจภายในโพรงจมูก มักเห็นเยื่อบุจมูกบวมจนกลายเป็นริดสีดวงจมูก ซึ่งมักจะเป็นสองข้าง แต่ในผู้ป่วยบางรายก้อนริดสีดวงจมูกแต่ละข้างอาจโตไม่เท่ากันได้ ในกรณีที่ริดสีดวงจมูกมีขนาดใหญ่ อาจกดเบียดกระดูกจมูกจนใบหน้ามีสันจมูกกว้าง หรือระยะห่างระหว่างดวงตากว้างขึ้น เมื่อตรวจเลือด จะมีเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophils เพิ่มขึ้น และ ระดับ IgE สูงขึ้น (Chevalier and Azuelos. 1994 : 68-69)

2.4.3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

2.4.3.1.สิ่งส่งตรวจได้แก่ หนอง เสมหะ หรือชิ้นเนื้อ

2.4.3.2.การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจหา grains หรือ granules และ/หรือการทำ KOH preparation ด้วย 10% KOH สำหรับหนองหรือเสมหะเพื่อดูสายรา ถ้าเป็นชิ้นเนื้อให้แตะหรือถูชิ้นเนื้อบนแผ่นสไลด์ นำไปย้อมด้วยสี Wright's stain, H&E stain, Fontana-Masson หรือ melanin stains อื่นๆ

2.4.3.3.การเพาะเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA) มียา chloramphenicol (ระงับการเจริญของแบคทีเรีย) หรือ brain-heart infusion agar (BHI) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30องศาเซลเซียส โคโลนีที่ได้จะมีลักษณะโคโลนีปุย สีน้ำตาลเข้มหรือเขียวมะกอกใต้โคโลนีสีดำ

2.4.3.4. การทำ slide culture พบลักษณะสายราสีเข้มมีผนังกั้น ก้านชู โคนิเดียส่วนใหญ่เป็นก้านเดี่ยวบางครั้งมีลักษณะซิกแซกสั้นยาวไม่เท่ากัน โคนิเดียมีขนาดใหญ่ 8-16 x 23-50 ไมโครเมตรสีน้ำตาลถึงดำลักษณะยาวรีส่วนโคนที่ติดกับก้านชูสปอร์กลมป้านใหญ่คล้ายกระบองอาจอยู่เดี่ยวหรือเรียงต่อกันเป็นสายยาว แต่ละโคนิเดียประกอบด้วยหลายเซลล์แบ่งตามแนวขวางและแนวตั้ง

2.4.4. การรักษา

2.4.4.1 การผ่าตัด ผู้ป่วยแทบทุกราย มักจะต้องใช้การผ่าตัดรักษา เนื่องจาก การผ่าตัดสามารถระบายมูก ที่เหนียวมากออกจากไซนัสได้ โดยปัจจุบันการผ่าตัดโดยใช้กล้องส่องผ่านรูจมูก เป็นการผ่าตัดที่ได้ผลดี และมีผลข้างเคียงน้อย อย่างไรก็ตาม การผ่าตัดเพียงอย่ างเดียวไม่สามารถทำให้ ผู้ป่วยหายได้ แต่การผ่าตัดเป็นขั้นตอนการรักษาที่จำเป็นในขั้นแรก เ พื่อให้การรักษาทางยาได้ผลเต็มที่

2.4.4.2 การใช้ยา หลังจากผ่าตัดผู้ป่วยแล้ว ควรให้ยาทันทีเพื่อลดโอกาสที่จะกลับเป็นซ้ำ การเลือกยาที่เหมาะสมจะช่วยลดการอักเสบ ลดการเกิดซ้ำของริดสีดวงจมูกหลังผ่าตัด ลดการเกิดมูกเหนียว ขึ้นมาใหม่ และ ทำให้ทางระบายมูกจากไซนัสไม่ตีบตัน การล้างโพรงจมูกและไซนัสด้วยน้ำเกลือ จะช่วยล้างเอาเชื้อราออกจากโพรงจมูกและไซนัส ทำให้แผลในโพรงจมูกและไซนัสหายเร็วขึ้น ลดการเกิดสะเก็ดหลังผ่าตัด และทำให้มูกเหนียวถูกระบายออกได้ดีขึ้น การใช้สเตียรอยด์พ่นจมูกอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จะช่วยลดการอักเสบ และลดโอกาสกลับเป็นซ้ำ ในผู้ป่วยบางรายที่มีริดสีดวงจมูกขนาดใหญ่ หรือมีความรุนแรงของการอักเสบมาก อาจได้ประโยชน์จากก ารใช้สเตียรอยด์แบบรับประทาน หรือแบบฉีดเป็นช่วงสั้นๆ การใช้ยารักษาเชื้อรา

ในผู้ป่วยนั้น ควรใช้ชนิดพ่นหรือชนิดล้างจมูกแทนที่จะใช้ชนิดฉีด เนื่องจากยารักษาเชื้อราชนิดฉีดมีโอกาสเกิดผลข้างเคียงมากกว่า

2.4.4.3 การฉีดวัคซีน (immunotherapy) เป็นการรักษาอีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพ พบว่าได้ผลดี , ลดโอกาสกลับเป็นซ้ำ และ สามารถลดปริมาณการใช้สเตียรอยด์ชนิดรับประทานได้ (Farina et al. 2007 : 1655-1659)

**2.5 เชื้อในกลุ่ม Mucorales.**

เชื้อในกลุ่ม mucorales พบได้ในดิน อากาศ และปนเปื้อนกับพืช ผักผลไม้ มีสายราสีใส ผนังบางไม่มีหรืออาจพบช่องกั้นมีขนาดกว้าง 6-15 ไมโครเมตร อาจพบหรือไม่พบไรซอยด์ (rhizoid) ขึ้นอยู่กับจีนัสของเชื้อ มีก้านชูสปอร์ที่เรียก sporangiophore ไม่ยาวมากแตกแขนงได้ปลายก้านชูสปอร์เป็นถุงที่เรียกว่า sporangium ขนาดใหญ่รูปกลมหรือรีใหญ่ 50-300 ไมโครเมตร ภายในมีสปอร์เป็นเซลล์รูปกลมหรือรี ผนังเรียบ 4-8 ไมโครเมตร ที่เรียกว่า sporangiospore จำนวนมากเมื่อถุงหุ้มสปอร์หลุดออกเปลือกหุ้มสปอร์อาจหลุดออกหมดหรือเหลือบางส่วนยังคงติดอยู่กับก้านชูสปอร์เชื้อเจริญเร็วภายใน 2-4 วัน ที่ 25 องศาเซลล์เซียส ลักษณะโคโลนีในระยะแรกโคโลนีเป็นสีขาวแล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาผิวหน้าเป็นจุดสีน้ำตาลดำของ sporangia ใต้โคโลนีไม่มีสี ส่วนใหญ่เชื้อกลุ่มนี้ไม่เจริญที่ 37 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการก่อโรคในคนและพบได้บ่อยได้แก่ *Mucor* และ *Rhizopus* (Rasse et al. 1990 : 395-403) เป็นต้น

2.5.1 การก่อโรคในคน (Prabhu and Patel. 2004 : 31-47)

เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรค zygomycosis หรือ mucormycosis เกิดรอยโรคที่ปอด โพรงจมูก ตา สมอง ผิวหนัง เยื่อเมือกและระบบต่างๆ ของอวัยวะในร่างกาย มักพบในผู้ป่วยที่มีโรคเรื้อรังหรือมีภาวะผิดปกติบางอย่าง พบบ่อยในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานหรือมีภาวะความเป็นกรด ผู้ป่วยจะมาด้วยอาการของ sinusitis, rhinitis facial pain ต่อมาซึมลง และหมดสติ เชื้อราจะเริ่มต้นทำลายบริเวณเยื่อบุจมูก ,โพรงอากาศ และลุกลามเข้าไปในลูก ตา โดยเกิดลักษณะของ necrosis เกิดขึ้น

ไซนัสอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม (invasive fungal rhinosinusitis) เกิดจากเชื้อราที่ลุกลามเข้ากระแสโลหิต ทำให้มีอาการที่รวดเร็วรุนแรงภายใน 4 สัปดาห์เป็นชนิดที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ และมักเกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานบกพร่อง ซึ่งเม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ได้ไม่ดี หรือ มีจำนวนน้อยกว่าปกติ เช่นผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมการตรวจในโพรงจมูก จะเห็นลักษณะของเนื้อตาย และมีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง

2.5.2 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

2.5.2.1 สิ่งส่งตรวจได้แก่ หนอง เสมหะ หรือชิ้นเนื้อ

2.5.2.2 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ต้องเป็นชิ้นเนื้อที่ไม่ได้แช่ฟอร์มาลิน และห้ามแช่เย็น เมื่อทำมาทำการย้อม 10% KOH จะพบสายราใสไม่มีสี และ ส่วนมาก ไม่สร้างผนังกั้น หากย้อมด้วยสี Hematoxylin and eosin (H&E) stain จะพบสายราขนาดใหญ่ มี/ไม่มีผนังกั้น สายรามักแตกแขนงตั้งฉาก วิธีนี้เป็นวิธีที่ตรวจพบได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพราะเชื้อกลุ่มนี้มักจะตายได้ง่ายเมื่อออกนอกร่างกายหรือแช่ในตู้เย็น

2.5.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่มียา chloramphenicol (ระงับการเจริญของแบคทีเรีย ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส โคโลนีในระยะแรกโคโลนีเป็นสีขาวแล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาผิวหน้าเป็นจุดสีน้ำตาลดำของsporangia ใต้โคโลนีไม่มีสี เมื่อทำ slide culture พบลักษณะสายราสีใสผนังบางไม่มีช่องกั้นมีขนาดกว้าง 6-15 ไมโครเมตร มีก้านชูสปอร์ที่เรียก sporangiophore ไม่ยาวมากแตกแขนงได้ปลายก้านชูสปอร์เป็นถุงที่เรียกว่า sporangium ขนาดใหญ่รูปกลมหรือรีใหญ่ 50-300 ไมโครเมตร ภายในมีสปอร์เป็นเซลล์รูปกลมหรือรี ผนังเรียบ 4-8 ไมโครเมตร ที่เรียกว่า sporangiospore จำนวนมากเมื่อถุงหุ้มสปอร์หลุดออกเปลือกหุ้มสปอร์อาจหลุดออกหมดหรือเหลือบางส่วนยังคงติดอยู่กับก้านชูสปอร์ การจำแนกเชื้ออาศัยภาวะการสร้างเซลล์สี บพันธุ์แบบอาศัยเพศ แต่มักไม่พ บจึงต้องมีการเลี้ยงเชื้อนอาหารที่กระตุ้นการสร้างสปอร์

2.5.3 การรักษา

การรักษาทางยา คือ รักษาปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ผู้ป่วยมีภูมิต้านทานบกพร่อง เช่น เบาหวาน , ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ, ภาวะกรดในกระแสเลือด เป็นต้นจากนั้นป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานบกพร่องเหล่านี้รับเชื้อราเพิ่ม ยาฆ่าเชื้อราที่เป็นยาหลัก คือ amphotericin B แบบฉีด การปรับขนาดยาต้องติดตามการดำเนินโรค และควรทำให้ภูมิต้านทานของผู้ป่วยกลับคืนสู่ภาวะปกติให้เร็วที่สุด เนื่องจากยิ่งทำให้ผู้ป่วยมีภูมิต้านทานกลับมาปกติได้เร็วเท่าใด ก็จะทำให้พฤติกรรมการลุกลามของเชื้อราน้อยลงเท่านั้น

การผ่าตัดผู้ป่วยไซนัสอักเสบชนิดนี้จำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดเอาเนื้อเยื่อที่เน่าตาย และเชื้อราออกให้หมด และหลังผ่าตัด ต้องใช้ยาฆ่าเชื้อรา และรักษ าภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของผู้ป่วย เช่น การที่มีเกร็ดเลือดต่ำ ร่วมกับเม็ดเลือดขาวต่ำในผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด หรือ โรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการควบคุม อาจทำให้สภาพร่างกายของผู้ป่วยไม่แข็งแรงเพียงพอที่จะรับการผ่าตัดได้

เชื้อราฉวย โอกาสที่กล่าวข้างต้น เข้าสู่ร่างกายของคนได้ เนื่องจากคน หายใจเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไป และสามารถก่อโรคได้ทั้งในคนปกติและผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นยาดมสมุนไพรที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความใกล้ชิดกับผู้บริโภคจึงต้องตระหนักถึงความสะอาด เพื่อให้การปนเปื้อนของเชื้อ

ราฉวยโอกาสกลุ่มนี้มีน้อยมากหรือไม่พบเลยจากสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการทำยาดม ถึงแม้ว่ามีรายงานการวิจัย ที่แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (เอนก ภู่ทอง. 2555 : 293-301, นิติรัฐ ไหว้พรหม. 2013 : 15, เบญจมาศ เขตรดง. 2553 : 31) แต่ด้วยคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่จะระเหยอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในอุณหภูมิทั่วไป ก็ทำให้คุณสมบัติเหล่านี้หายไปได้ ดังนั้นหากบรรจุภัณฑ์ที่ไม่มีการปิดสนิทเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำมันหอมระเหย ก็อาจจะทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในยาดมมีการเจริญเติบโตและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคได้

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรได้รับการส่งเสริมสนับสนุนให้ผลิตจากหน่วยราชการหลายหน่วย ในชุมชนท้องที่ต่าง ๆ กัน เพื่อสร้างรายได้ให้กับชุมชน และส่งเสริมการใช้วัตถุดิบในชุมชนให้เป็นประโยชน์ตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง สูตรในการผลิตยาดมสมุนไพรมีมากมายขึ้นอยู่กับตำรับยา หรือสูตรของผู้ผลิตที่พัฒนาขึ้นมาให้ตรงใจของผู้บริโภค ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายมีหลายรูปแบบ เช่น สารสกัดน้ำมันหอมระเหย ยาหม่อง สมุนไพรแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย และสมุนไพรแห้งบดละเอียดผสมน้ำมันหอมระเหยและห่อด้วยผ้าขาวบาง ในด้านคุณสมบัติต่างของสมุนไพรแต่ละชนิดก็มีการศึกษาทดสอบคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ รวมทั้งการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลชีพ แต่ส่วนมากเป็นการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรไม่ใช่เป็นตัวสมุนไพรโดยตรง ซึ่งในยาดมสมุนไพรแบบสมุนไพรที่อบแห้งแล้วมาผสมกับน้ำมันหอมระเหยนั้น ในขั้นตอนการผลิต หรือรูปแบบของบรรจุภัณฑ์ที่ไม่ปิดสนิทอาจมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยเฉพาะเชื้อราในอากาศ แต่ปรากฏว่าชุมชนยังขาดความรู้ความเข้าใจทั้งในด้านกฎระเบียบตามกฎหมาย และขาดวิชาการในการผลิตยาที่ดีพอ จึงพบปัญหาในการผลิตยาจากสมุนไพรในระดับชุมชนในหลายด้าน

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการตรวจหาเชื้อรา ในกลุ่มฉวยโอกาส ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในยาดมสมุนไพรยี่ห้อต่างๆที่วางขายในท้องตลาดก่อนเปิดใช้งาน เพื่อเป็นแนวทางให้ผู้ใช้ตระหนักถึงการเลือกใช้ยาดมสมุนไพรที่เหมาะสม และเป็นแนวทางให้กับผู้ผลิตในการระมัดระวังในกระบวนการผลิตให้มากขึ้น

# บทที่ 3

## ระเบียบวิธีวิจัย

### 1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

#### 1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (media)

- Sabouraud dextrose agar (SDA) ยี่ห้อ Difco, USA
- Sabouraud dextrose agar + Chloramphenical (SDC) ยี่ห้อ BIO-RAD, USA
- Sabouraud dextrose broth (SDB) ยี่ห้อ Difco, USA

#### 1.2 น้ำยา (Reagent) และสารเคมี

- Alcohol
- น้ำกลั่น
- น้ำยาฆ่าเชื้อ
- Agarose gel
- Phenol
- Isoamyl alcohol
- Chloroform
- Isopropanol ยี่ห้อ Burick & Jackson
- Lactophenol cotton blue
- 1X Tris-Boric-EDTA (TBE) buffer
- Ethidium bromide
- 1 Kb ladder ดีเอ็นเอ marker (iNtRON Biotechnology, Korea)
- PCR master mix (*i-Taq* DNA polymerase, iNtRON Biotechnology, Korea)
- GeneJET PCR purification kit (Thermo scientific Inc, USA)

#### 1.3 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมืออื่นๆ

- Sterile plate ขนาด 90 มิลลิเมตร
- Sterile seropipette ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร

- Autopipette ขนาด 1-10 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ 100 -1,000 ไมโครลิตร
- Tip ขนาด 10 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร
- Eppendorf ขนาด 0.2 มิลลิลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร
- Test tube ขนาด 12×75 มิลลิเมตร
- Test tube ขนาด 50 มิลลิลิตร มีฝาเกลียว
- Spreader
- Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร
- Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
- Stirring rod
- Forcep
- กระบอกตวง (Cylinder)
- กรรไกร
- เครื่อง vortex
- เครื่องชั่ง
- แท่งแก้วรูปตัววี
- แผ่น slide
- Cover slip
- Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel documentation ยี่ห้อ Vilber Lourmat
- เครื่อง Autoclave
- เครื่อง Hot air oven
- เครื่อง PCR
- เครื่อง Dry block heating thermostat
- เครื่อง Centrifuge
- ขวดแก้ว
- เครื่อง nanodrop ยี่ห้อ Thermo scientific
- Biohazard cabinet

**2 ตัวอย่าง**

**2.1 การเก็บตัวอย่างยาดมสมุนไพร** จำนวน 15 ยี่ห้อๆละ 3 ขวด (ทั้งหมด 45 ขวด) แล้วนำมาแบ่งออกตามลักษณะของยาดมดังนี้ คือ สมุนไพรตากแห้ง สมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย และสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ)

**3. วิธีวิจัย**

**3.1 การเพาะเชื้อราในอากาศจากยาดมสมุนไพร**

การเพาะเชื้อราในอากาศจากยาดมสมุนไพร ดัดแปลงมาจากวิธีการเก็บเชื้อ *Cryptococcus* จากมูลนกในธรรมชาติ (Imwidthaya, Dithaprasop and Egtasaeng. 1989) ยาดมสมุนไพร จำนวน 1 กรัม (ถ้าสมุนไพรมีน้ำมัน ให้ซับออกด้วยกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อ ) แล้วบดให้ละเอียด หลังจากนั้นใส่ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile DW) จำนวน 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 15 นาที (dilution 1:10) แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอดปราศจากเชื้อขนาด 12×75 ซม. นำส่วนใสและส่วนตะกอนที่ได้มาทำการ เจือจาง เป็น 1:10 (dilution 1:100) และ 1:100 (dilution 1:1000) (ดังนั้น 1 ขวดยาดมสมุนไพร ได้ตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง) นำ 1:10, 1:100 และ 1:1000 ของทั้งส่วนใส และส่วนตะกอน อย่างละ 150 ไมโครลิตร Spread ลงบน Sabouraud dextrose agar (SDA) +Chloramphenical plate (ทำ duplicate) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน เชื้อที่ขึ้นนำมา subculture ลงบน SDA slant

**3.2 การจำแนกเชื้อราด้วยวิธีทางฟีโนไทป์ (ลักษณะมหสัณฐานและจุลสัณฐาน ; phenotypic method)**

เชื้อที่แยกเลี้ยงบน SDA slant มาทำ slide culture เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา ดังนี้ ตัดวุ้น SDA ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1 ตร.ซม. ยกชิ้นวุ้น 1 ชิ้น วางลงตรงกลางแผ่น slide ที่วางอยู่บนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อ ที่ปราศจากเชื้อ ใช้ needle เขี่ยเชื้อราที่ subculture ไว้ใน SDA slant มาแตะที่บริเวณกึ่งกลางด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้งสี่ด้าน โดยใช้ 1 เชื้อต่อชิ้นวุ้น 1 ชิ้น ใช้ forcep คีบแผ่น sterile cover slip ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ ปิดลงบนชิ้นวุ้น โดยให้ชิ้นวุ้นอยู่กลางแผ่น cover slip เติม Sterile DW เล็กน้อยลงในจานเพาะเชื้อเพื่อให้เกิดความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นถอดสไลด์ ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue (LCB ) แล้วนำไปดูลักษณะของเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**3.3 การจำแนกเชื้อราด้วยวิธีทางจีโนไทป์ (Genotypic method)**

**3.3.1. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา (DNA extraction method) (Meyer et al. 2003)**

นำเชื้อที่ subculture ไว้ใน SDA slant มาเลี้ยงใน Sabouraud dextrose Broth (SDB) เป็นเวลาประมาณ 2 วัน ปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เมื่อเทส่วนใสทิ้ง นำไปตั้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นเติม lysis buffer 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น mix ด้วยเครื่อง vortex 1 นาที ทำสลับไปจนครบ 1 ชั่วโมง ปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 round per minute (rpm.) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสออกมาใส่ sterile eppendorf อันใหม่ นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol – chloroform isoamyl extraction ดังนี้ เติม Saturated phenol ในอัตราส่วน 1:1 mix inverse ประมาณ 2-3 ครั้ง ปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ในอัตราส่วน 1:1 แล้ว mix inverse ปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม cold isopropanol 2.5 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 70% alcohol แล้วจึง Air dry เพื่อให้ ดีเอ็นเอแห้ง หลังจากนั้นละลายดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำดีเอ็นเอไปวัดหาค่าความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง nano drop ยี่ห้อ Thermo scientific ที่ความยาวคลื่น 260:280 นาโนเมตร (nm) ค่าที่ได้ต้องอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**3.3.2. การเพิ่มจำนวนบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) 1-2 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)**

นำ ดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ มาเพิ่มจำนวนโดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วย universal primers คือ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3') primers (White, Bruns, Lee and Taylor. 1990) โดยทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร (genomic ดีเอ็นเอ 10-100 ng , 1x *Taq* ดีเอ็นเอ polymerase buffer (100mM Tris-HCl pH 8.3 , 500mM KCl , 20mM $MgCl_2$), 0.2mM dNTPs , 0.2 pmol of each primer และ 1U of *iTaq*$^{tm}$ polymerase) โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้ Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็น 1.30 นาที และทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน จำนวน 35 รอบ สุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เพื่อให้เกิดการต่อสาย ดีเอ็นเอ ได้อย่างสมบูรณ์ การทดสอบนี้ใช้ ดีเอ็นเอจากเชื้อ *Pythium insidiosum* เป็นเชื้อควบคุมผลบวก (positive control) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเ ป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) นำ PCR product ที่ได้มาแยกขนาดของสายดีเอ็นเอ บน 1.5% Agarose gel ภายใต้กระแสไฟฟ้าความต่างศักดิ์คงที่ 100 โวลต์ นาน 40 นาที เปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอ กับ ladder marker 1 Kb ที่ทราบขนาด ย้อม Agarose gel ด้วย 0.05% Ethidium bromide 15 นาที และ ล้างด้วยน้ำประปาอีก 30 นาที นำมาดูขนาดของ PCR product ด้วยเครื่อง Gel document ยี่ห้อ Vilber Lourmat

**3.3.3. การทำให้ PCR Product บริสุทธิ์ (PCR Purification) และการตรวจหาลำดับ ดีเอ็นเอ (DNA sequencing)**

สำหรับการตรวจหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ต้องมีการทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด GeneJET PCR Purificaitoin kit ทำตามคู่มือในกล่องน้ำยาดังนี้ เติม Binding buffer ลงใน PCR product ในอัตราส่วน 1:1 แล้ว ผสมให้เข้ากัน (ตรวจสอบสี ต้องเป็นสีเหลือง ) ดูดสารทั้งหมดมาใส่ purification column แล้วปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งไป แล้วเติม wash buffer 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งไป แล้ว ปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง buffer ออกให้หมด นำ column ไปใส่ใน eppendorf อันใหม่ และเติม Elution buffer 20 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำ Purified PCR เก็บที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส เพื่อส่งไปทำการตรวจหาตรวจหาลำดับ ดีเอ็นเอ ( DNA Sequencing) โดยทำ bi-directional sequencing ด้วยเครื่อง ABI PRISM sequencher (Macrogen, Korea) ในลำดับต่อไป

**3.3.4. Data analysis .**

นำผลการตรวจหาลำดับเบสจากสายดีเอ็นเอ (DNA sequences) ทั้งสองเส้นมาทำการตรวจสอบความ compatible และแก้ไขลำดับเบสด้วยโปรแกรม Sequencher version 4.7 หลังจากนั้นลำดับเบสจาก สายดีเอ็นเอ ที่ทำการแก้ไขแล้ว นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูล ที่อยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn การพิจารณาความความเหมือนพิจารณาจากผล ที่มีค่า Max identity สูงที่สุด และมีค่า e-value ใกล้เคียง 1

# บทที่ 4

## ผลการวิจัย

ยาดมสมุนไพรที่ยังไม่เปิดใช้งานจำนวน 15 ยี่ห้อๆละ 3 ขวด (รวมทั้งสิ้น 45 ขวด) เมื่อพิจารณาตามลักษณะผลิตภัณฑ์แบ่งได้ 3 แบบ คือ

1. ยาดมสมุนไพรตากแห้ง 4 ยี่ห้อ คิดเป็น 12 ขวด (รูปที่ 2A)
2. ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย 6 ยี่ห้อ คิดเป็น 18 ขวด (รูปที่ 2B)
3. ยาดมสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) 5 ยี่ห้อ คิดเป็น 15 ขวด (รูปที่ 2C)

ผลการเพาะเชื้อ พบเชื้อราจากยาดมสมุนไพร 11 ยี่ห้อจากจำนวน 15 ยี่ห้อ คิดเป็นร้อยละ 73.3 และเมื่อแบ่งตามลักษณะผลิตภัณฑ์ที่นำมาวิจัย พบว่า

กลุ่มที่ 1 สมุนไพรตากแห้งไม่มีน้ำมันหอมระเหย 4 ยี่ห้อ พบเชื้อราปนเปื้อน 4 ยี่ห้อ (ร้อยละ 100)

กลุ่มที่ 2 สมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย 6 ยี่ห้อ พบเชื้อราปนเปื้อน 5 ยี่ห้อ (ร้อยละ 83.3)

กลุ่มที่ 3 สมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) 5 ยี่ห้อ พบเชื้อราปนเปื้อน 2 ยี่ห้อ (ร้อยละ 40)

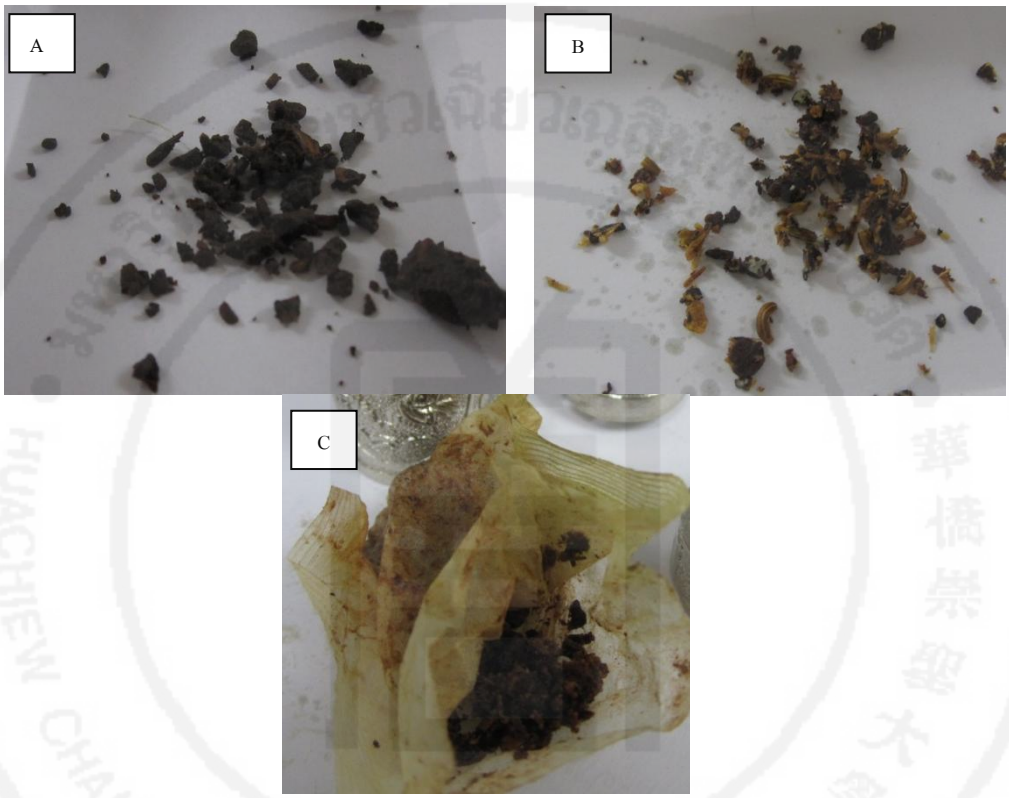
ยาดมสมุนไพร จำนวน 45 ขวด (3 ขวด/ยี่ห้อ) ผลการเพาะเชื้อ พบว่า ไม่เจอเชื้อราจำนวน 24 ขวด คิดเป็นร้อยละ 53.3 ในขณะที่อีก 21 ขวดพบปริมาณเชื้อราที่มีการปนเปื้อนอยู่ในช่วงระหว่าง 10 – 1,000 CFU/ ml โดยพบเชื้อรา 1 ชนิด/ขวด จำนวน 11 ขวด คิดเป็นร้อยละ 24 พบเชื้อรา 2 ชนิด/ขวด จำนวน 6 ขวด คิดเป็นร้อยละ 13.3 และพบเชื้อรา 3 ชนิด/ขวด จำนวน 4 ขวด คิดเป็น ร้อยละ 8.7 (ตารางที่ 7) ผลการเพาะเชื้อที่แยก จากจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 270 ตัวอย่าง (ยาดมสมุนไพร 1 ขวด ได้ตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง ตามที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 3) พบเชื้อรา 35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.96) แบ่งออกเป็นยีสต์จำนวน 2/35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.7) และราสายจำนวน 33/35 ตัวอย่าง (ร้อยละ 94.3) เมื่อพิจารณาจากลักษณะผลิตภัณฑ์ พบ

กลุ่มที่ 1 จำนวน 72 ตัวอย่าง ผลการเพาะเชื้อพบว่า พบเชื้อราสาย 16/72 (ร้อยละ 22) ไม่พบเชื้อ 56/72 (ร้อยละ 78) (ตารางที่ 3)

กลุ่มที่ 2 จำนวน 108 ตัวอย่าง ผลการเพาะเชื้อ พบว่า พบเชื้อราสาย 13/108 (ร้อยละ12) และเชื้อยีสต์ 1/108 (ร้อยละ 0.9) ไม่พบเชื้อ 94/108 (ร้อยละ 87.1) (ตารางที่ 3)

กลุ่มที่ 3 จำนวน 90 ตัวอย่าง ผลการเพาะเชื้อ พบว่า พบเชื้อราสาย 5/90 (ร้อยละ 5.5) และเชื้อยีสต์ 1/90 (ร้อยละ1.2) ไม่พบเชื้อ 84/90 (ร้อยละ 93.3 ) (ตารางที่ 3)

จากนั้นนำมาจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีทางฟีโนทัยป์ และจีโนทัยป์ ตามลำดับ




**รูปที่ 2** แสดงลักษณะของยาดมสมุนไพรทั้ง 3 ลักษณะที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ; A: ยาดมสมุนไพรตากแห้ง, B: ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย และ C: ยาดมสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ)

**1. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีทางฟีโนทัยป์ (ลักษณะมหสัณฐานและจุลสัณฐาน)**

ผลการเพาะเชื้อจากทั้งหมด 270 ตัวอย่าง พบเป็น เชื้อราจำนวน 35 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ราสาย จำนวน 33 ตัวอย่าง ผลการดูลักษณะโคโลนีและ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จัดจำแนกได้เป็น *Aspergillus* spp. พบได้มากที่สุดจำนวน 13 สายพันธุ์ (ร้อยละ 37.1), รองลงมา คือ *Cladosporium* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ (ร้อยละ 14.2), *Penicillium* spp. จำนวน 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 8.6), *Neurospora* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 5.7), *Nigrospora* และ *Biopolaris* อย่างละ 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 2.9) และไม่สามารถจัดจำแนก ได้ (Unidentified molds) จำนวน 8 สายพันธุ์ (ร้อยละ 22.9) (ตารางที่ 4) ตามลำดับ

**ตารางที่ 3** แสดงผลการเพาะเชื้อจากยาดมสมุนไพรที่จัดจำแนกตามลักษณะของผลิตภัณฑ์

| ลักษณะยาดมสมุนไพร (n) | ตัวอย่างที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น (%) | ตัวอย่างพบเชื้อ (%) | |
|---|---|---|---|
| | | ยีสต์ | ราสาย |
| 1. ยาดมสมุนไพรตากแห้ง (72) | 56 (78) | 0 | 16 (22) |
| 2. ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย (108) | 95 (88) | 1 (0.9) | 12 (11.1) |
| 3. ยาดมสมุนไพรบดละเอียด (90) | 84 (93.3) | 1 (1.2) | 5 (5.5) |

สำหรับเชื้อยีสต์ จำนวน 2 ตัวอย่าง ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดด้วยการดูลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ เนื่องจากต้องทำการทดสอบความต้องการใช้แหล่งอาหารของเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งมีขั้นตอนในการทำที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน จึงไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อยีสต์ออกมาได้ จึงรายงานเป็น Unidentified yeasts (ตารางที่ 4) หากแบ่งตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ยาดมกับชนิดของเชื้อที่พบ จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่ายาดมสมุนไพรตากแห้งพบเชื้อมากที่สุด คือจำนวน 16 สายพันธุ์ (ร้อยละ 45.7) รองลงมาคือ ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย (ร้อยละ 37.1) และยาดมสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) (ร้อยละ 17.2) ตามลำดับ โดยเชื้อที่พบมากที่สุดในสมุนไพรทั้ง 3 ลักษณะคือ *Aspergillus* spp. รองลงมาคือในกลุ่ม Unidentified molds

**2. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีทางจีโนทัยป์ (ลักษณะทางพันธุกรรม)**

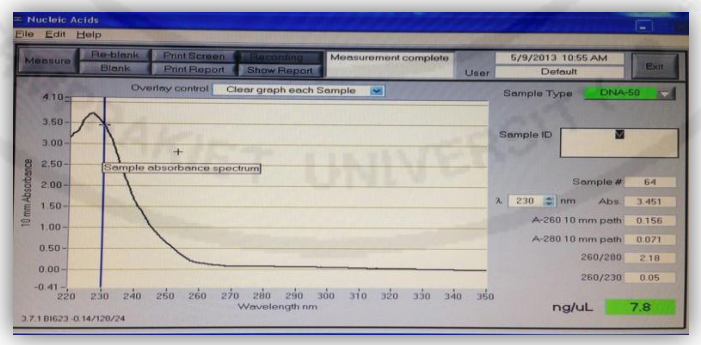
เชื้อราทั้งยีสต์และราสายจำนวนทั้งหมด 35 สายพันธุ์ ที่ทำการ subculture ไว้ นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol chloroform isoamyl extraction หลังจากตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol แล้ว ดีเอ็นเอที่ได้ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและ DNase แบ่งส่วนหนึ่งมาทำการตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการทำ gel electrophoresis (รูปที่ 3) ดีเอ็นเอส่วนที่เหลือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**ตารางที่ 4** แสดงจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่พบในยาดมสมุนไพรแต่ละลักษณะผลิตภัณฑ์และผลการจัดจำแนกโดยวิธีทางฟีโนทัยป์

| **ลักษณะยาดม** / **เชื้อ** | **ยาดมสมุนไพรตากแห้ง (%)** | **ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย (%)** | **ยาดมสมุนไพรบดละเอียด (%)** | **Total (%)** |
|---|---|---|---|---|
| *Aspergillus* spp. | 5 | 6 | 2 | 13 (37.1) |
| *Cladosporium* spp. | 5 | 0 | 0 | 5 (14.2) |
| *Penicillium* spp. | 1 | 2 | 0 | 3 (8.6) |
| *Neurospora* spp. | 2 | 0 | 0 | 2 (5.7) |
| *Nigrospora* spp. | 0 | 0 | 1 | 1 (2.9) |
| *Biopolaris* spp. | 0 | 0 | 1 | 1 (2.9) |
| Unidentified yeast | 0 | 1 | 1 | 2 (5.7) |
| Unidentified molds | 3 | 4 | 1 | 8 (22.9) |
| **Total** | **16** (45.7) | **13** (37.1) | **6** (17.2) | **35** (100) |

**รูปที่ 3** การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agrose gel. lane M คือ 1kb DNA marker, lane ที่ 1-12 คือตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อราที่ทำการสกัดดีเอ็นเอ มีขนาดประมาณ 23 kb.

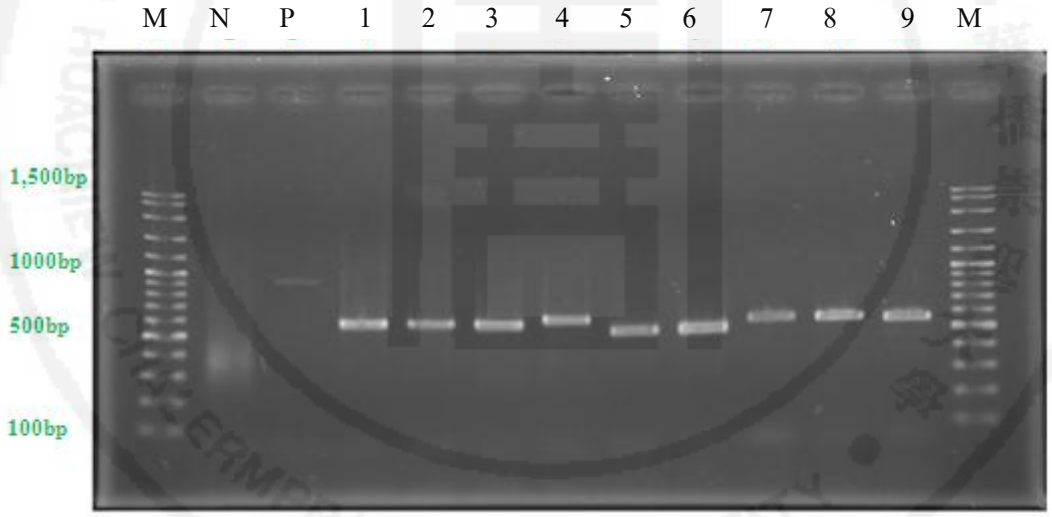
นอกจากนี้ยังทำการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop (รูปที่4) ดีเอ็นเอที่มีค่า ratio ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260nm.:280 nm. อยู่ในระหว่าง 1.8 – 2.2 จะนำมาทำการทดสอบในลำดับถัดไป ส่วนดีเอ็นเอที่มีค่าต่ำกว่า 1.8 จะนำไปทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธี Phenol chloroform isoamyl อีกครั้ง




**รูปที่ 4** แสดงหน้าจอของเครื่อง NanoDrop แสดง ratio ของ DNA : Protein (260 : 280) โดยที่ DNA ที่มีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.8 – 2.2 ซึ่งแสดงคุณภาพของ DNA ส่วนทางด้านปริมาณของ DNA เครื่องจะแสดงเป็นความเข้มข้นในหน่วย ng/µl

ดีเอ็นเอถูกนำมาทำการเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS 1-ITS 2 regions ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Universal primer ของเชื้อราคือ ITS 1 และ ITS 4 ผลที่ได้นำมาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel โดย PCR product มีขนาดอยู่ประมาณ 500-700 bp. สำหรับ

positive control ในการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อ *Pythium insidiosum* ได้ขนาด 950 bp. และ negative control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทน ดีเอ็นเอต้นแบบไม่พบ band เกิดขึ้น (รูปที่ 4) จากนั้น PCR product ที่ได้ถูกนำไปทำการ purified และทำการหาลำดับเบสด้วย bidirectional sequencing เมื่อได้ลำดับพันธุกรรมแล้วทางผู้วิจัยมาทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของข้อมูลด้วยโปรแกรม Sequencher หลังจากนั้นทำไปทำการและเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ในเชื้อที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้โดยวิธีทางฟีโนทัยป์ วิธีนี้ก็สามารถจัดจำแนกออกมาได้ คือ *Trametes polyzona, Hypocreales* spp., *Clavispora lusitaniae*, *Glomerella graminicola* และ *Chaetomium* spp. สำหรับยีสต์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ ก็สามารถทราบถึงจีนัสและสปีชีย์ส์ได้เช่นเดียวกัน คือ *Candida orthopsilosis* สำหรับเชื้อตัวอื่นทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้อง กัน (ตารางที่ 5)




**รูปที่ 5** แสดง PCR product บริเวณ ITS 1-ITS 2 regions ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Universal primer ของเชื้อราคือ ITS 1 และ ITS 4 บน 1.5% Agarose gel (lane M: 1kb ladder marker, N: netgative conrol, P: positive controlขนาดประมาณ 950 bp, lane 1-9 : PCR Product ของเชื้อ ขนาดประมาณ 500 bp –700 bp)

สำหรับเชื้อที่แยกได้ถึงระดับสปีชีย์ส์ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ไม่ก่อโรค และกลุ่มเชื้อที่มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคน โดยการหาข้อมูลเกี่ยวกับรายงานการพบผู้ป่วยจากวารสารงานวิจัยต่างๆ ผลที่พบคือ กลุ่มที่ 1 สมุนไพรตากแห้งไม่มีน้ำมันหอมระเหย พบเชื้อก่อโรค 5 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 14.3 กลุ่มที่ 2 สมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย และกลุ่มที่ 3 สมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) พบเชื้อก่อโรค 3 สายพันธุ์ เท่ากัน คิดเป็น ร้อยละ 8.6 (ตารางที่ 6) ในขณะที่เชื้อไม่ก่อโรค/ไม่สามารถสรุปได้ (เนื่องจากไม่ทราบสปีชีย์ส์ที่ชัดเจน)

มีทั้งหมด 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 71.4 หากพิจารณาถึงชนิดของเชื้อรา ก่อโรคที่พบในยาดมสมุนไพร 11 ยี่ห้อ มีจำนวน 6 ยี่ห้อที่พบเชื้อราในกลุ่มเดียวกัน คิดเป็นร้อยละ 54.54 ในขณะที่อีก 5 ยี่ห้อ พบเชื้อราชนิดเดียวหรือต่างชนิดกัน คิดเป็นร้อยละ 45.45 ดังแสดงในตารางที่ 7

**ตารางที่ 5** แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อราปนเปื้อนในอากาศจากยาดมสมุนไพร 3 กลุ่ม ด้วยวิธีทางฟีโนทัยป์และจีโนทัยป์

| **ลักษณะของยาดมสมุนไพร** | **ผลการจัดจำแนก** | |
|---|---|---|
| | **วิธีทางฟีโนทัยป์ (n)** | **วิธีทางจีโนทัยป์ (n)** |
| ยาดมสมุนไพรตากแห้ง | *Cladosporium* spp.(5) | *Cladosporium* spp. (3) |
| | | *Cladosporium cladosporioides* (2) |
| | *Aspergillus* spp. (5) | *Aspergillus* spp. (4) |
| | | *Aspergillus sydowii* (1) |
| | *Penicillium* spp. (1) | *Penicillium citrinum* (1) |
| | *Neurospora* spp. (2) | *Neurospora* spp. (1) |
| | | *Neurospora intermedia* (1) |
| | Unidentified molds (3) | *Trametes polyzona* (1) |
| | | *Hypocreales* spp. (1) |
| | | *Clavispora lusitaniae* (1) |
| ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย | *Penicillium* spp. (2) | *Penicillium* spp. (2) |
| | Unidentified yeast (1) | *Candida orthopsilosis* (1) |
| | *Aspergillus* spp. (6) | *Aspergillus* spp. (2) |
| | | *Aspergillus aculeatus* (1) |
| | | *Aspergillus calidoustus* (1) |
| | | *Emericella variecolor* (1) |
| | Unidentified molds (4) | *Glomerella graminicola* (1) |
| | | *Trametes polyzona* (2) |
| | | *Chaetomium* sp. (1) |

**ตารางที่ 5** แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อราปนเปื้อนในอากาศจากยาดมสมุนไพร 3 ลักษณะ ด้วยวิธีทางฟีโนทัยป์และจีโนทัยป์ (ต่อ)

| ลักษณะของยาดมสมุนไพร | ผลการจัดจำแนก | |
|---|---|---|
| | **วิธีทางฟีโนทัยป์ (n)** | **วิธีทางจีโนทัยป์ (n)** |
| ยาดมสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) | *Aspergillus* spp. (2) | *Aspergillus* spp. (1) |
| | | *Aspergillus aculeatus* (1) |
| | *Nigrospora* spp. (1) | *Nigrospora oryzae* (1) |
| | *Bipolaris* spp. (1) | *Bipolaris papendorfii* (1) |
| | Unidentified mold (1) | *Trametes polyzona* (1) |
| | Unidentified yeast (1) | *Candida orthopsilosis* (1) |

**ตารางที่ 6** แสดงจำนวนตัวอย่างยาดมสมุนไพรแต่ละลักษณะที่พบเชื้อก่อโรค และเชื้อที่ไม่ก่อโรค / สรุปไม่ได้ (เนื่องจากไม่ทราบสปีชียส์ที่ชัดเจน)

| **ลักษณะของยาดมสมุนไพร (n)** | **จำนวนตัวอย่างที่พบ** | | |
|---|---|---|---|
| | **เชื้อก่อโรค (ร้อยละ)** | **เชื้อไม่ก่อโรค (ร้อยละ)** | **สรุปไม่ได้ (ร้อยละ)** |
| ยาดมสมุนไพรตากแห้ง (16) | 5 (14.3) | 4 (11.4) | 7 (20) |
| ยาดมสมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย (13) | 3 (8.6) | 4 (11.4) | 6 (17.1) |
| ยาดมสมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) (6) | 3 (8.6) | 1 (2.9) | 2 (5.7) |
| **รวม** | **11 (31.4)** | **24 (68.6)** | |

**ตารางที่ 7** แสดงปริมาณและชนิดของเชื้อรา ที่พบจากตัวอย่างยาดมสมุนไพร

| ยาดมสมุนไพรยี่ห้อ | ขวดที่ | จำนวนตัวอย่างที่พบ | ชนิดของเชื้อรา | ปริมาณ (CFU/ml) |
|---|---|---|---|---|
| กลุ่มที่ 1 สมุนไพรตากแห้งไม่มีน้ำมันหอมระเหย 4 ยี่ห้อ | | | | |
| A | A1 | 1/6 | *Cladosporium* spp. | 100 |
| | A2 | 2/6 | *Aspergillus* spp. | 100 |
| | | | *Trametes polyzona* | 100 |
| | A3 | 1/6 | *Cladosporium* spp. | 1,000 |
| B | B1 | 1/6 | *Aspergillus* spp. | 1,000 |
| | B2,B3 | - | Not found | - |
| C | C1 | 1/6 | *Cladosporium cladosporioides* | 1,000 |
| | C2 | 2/6 | *Penicillium citrinum* | 10 |
| | | | *Neurospora* spp. | 1,000 |
| | C3 | 2/6 | *Neurospora intermedia* | 1,000 |
| | | | *Aspergillus sydowii* | 1,000 |
| D | D1 | 3/6 | *Hypocreales* spp. | 1,000 |
| | | | *Cladosporium cladosporioides* | 100 |
| | | | *Aspergillus* spp. | 1,000 |
| | D2 | - | Not found | - |
| | D3 | 3/6 | *Clavispora lusitaniae* | 10 |
| | | | *Aspergillus* spp. | 100 |
| | | | *Cladosporium* spp. | 1,000 |

**ตารางที่ 7** แสดงปริมาณและชนิดของเชื้อรา ที่พบจากตัวอย่างยาดมสมุนไพร (ต่อ)

| ยาดมสมุนไพรยี่ห้อ | ขวดที่ | จำนวนตัวอย่างที่พบ | ชนิดของเชื้อรา | ปริมาณ (CFU/ml) |
|---|---|---|---|---|
| กลุ่มที่ 2 สมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย 6 ยี่ห้อ | | | | |
| E | E1, E2 | - | Not found | - |
| | E3 | 1/6 | *Penicillium* spp. | 100 |
| F | F1, F3 | - | Not found | - |
| | F2 | 1/6 | *Glomerella graminicola* | 10 |
| G | G1 | 2/6 | *Emericella variecolor* | 10 |
| | | | *Aspergillus* spp. | 100 |
| | G2 | 3/6 | *Aspergillus aculeatus* | 1,000 |
| | | | *Trametes polyzona* | 1,000 |
| | | | *Aspergillus* spp. | 1,000 |
| | G3 | 1/6 | *Candida orthopsilosis* | 1,000 |
| H | H1 | 2/6 | *Aspergillus* spp. | 10 |
| | | | *Aspergillus calidoustus* | 100 |
| | H2 | 1/6 | *Chaetomium* sp. | 10 |
| | H3 | - | Not found | - |
| I | I1-I3 | - | Not found | - |
| J | J1 | - | Not found | - |
| | J2 | 1/6 | *Trametes polyzona* | 10 |
| | J3 | 1/6 | *Penicillium* spp. | 100 |

**ตารางที่ 7** แสดงปริมาณและชนิดของเชื้อรา ที่พบจากตัวอย่างยาดมสมุนไพร (ต่อ)

| ยาดมสมุนไพรยี่ห้อ | ขวดที่ | จำนวนตัวอย่างที่พบ | ชนิดของเชื้อรา | ปริมาณ (CFU/ml) |
|---|---|---|---|---|
| กลุ่มที่ 3 สมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) 5 ยี่ห้อ | | | | |
| K | K1-K3 | - | Not found | - |
| L | L1 | 1/6 | *Trametes polyzona* | 10 |
| | L2-L3 | - | Not found | - |
| M | M1-M3 | - | Not found | - |
| N | N1 | 3/6 | *Aspergillus* spp. | 10 |
| | | | *Nigrospora oryzae* | 1,000 |
| | | | *Candida orthopsilosis* | 100 |
| | N2 | 2/6 | *Aspergillus aculeatus* | 100 |
| | | | *Bipolaris papendorfii* | 1,000 |
| | N3 | - | Not found | - |
| O | O1-O3 | - | Not found | - |

# บทที่ 5
# สรุปและอภิปรายผล

ยาดมสมุนไพร เป็นยาที่ปรุงจากเครื่องยาหลายๆอย่างรวมกัน โดยตัวยาแต่ละอย่างในตำรับยานั้น มีหน้าที่แตกต่างกันไป มีทั้งที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ และปรุงแต่งกลิ่น เพื่อให้มีสรรพคุณในการแก้วิงเวียน ศรีษะ หน้ามืด ตาลาย และในบางตำรับยาช่วยบรรเทาอาการเคล็ดขัดยอกได้ด้วย ความนิยมในการใช้ยาดมสมุนไพรมีมากขึ้นตามความนิยมในการหันมาใช้สิ่งที่ทำมาจากธรรมชาติ ประกอบกับภาครัฐได้กำหนดไว้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 5 ในการนำเอาสมุนไพรมาใช้ในการสาธารณสุข ประ กอบกับการส่งเสริมให้มีการผลิตในชุมชนท้องถิ่นต่าง ๆ แต่ การขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ มาตรฐานทางด้านการควบคุมคุณภาพสมุนไพร และ ข้อจำกัดทางด้านการให้ความรู้ความเข้าใจในด้านต่างๆ ของชุมชน จึงอาจทำให้เกิดปัญหาในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะความสะอาดและถูกสุขลักษณะของสถานที่ ของการเก็บรักษาวัตถุดิบ ของการบรรจุและหีบห่อ และการมีฉลากแจ้งสรรพคุณต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ เหล่านี้คือปัจจัยที่ ควรนำมาทำให้เป็นมาตรฐานเพื่อใ ห้ผู้บริโภคมีความเข้าใจ และมั่นใจในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

คณะผู้วิจัยทำการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อราปนเปื้อนในยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งานที่จำหน่ายตามท้องตลาด จากการเก็บตัวอย่างยาดมสมุนไพร 15 ยี่ห้อนำมาตรวจหาเชื้อรา พบเชื้อราจากยาดมสมุนไพรจำนวน 11 ยี่ห้อ และเมื่อแบ่งตามลักษณะของ ผลิตภัณฑ์ยาดมสมุนไพรที่นำมาวิจัยได้ 3 กลุ่ม พบว่า

กลุ่มที่ 1 สมุนไพรตากแห้งไม่มีน้ำมันหอมระเหย 4 ยี่ห้อ พบเชื้อราปนเปื้อน 4 ยี่ห้อ (ร้อยละ 100)

กลุ่มที่ 2 สมุนไพรตากแห้งผสมน้ำมันหอมระเหย 6 ยี่ห้อ พบเชื้อราปนเปื้อน 5 ยี่ห้อ (ร้อยละ 83.3)

กลุ่มที่ 3 สมุนไพรบดละเอียด (ส้มมือ) 5 ยี่ห้อ พบเชื้อราปนเปื้อน 2 ยี่ห้อ (ร้อยละ 40)

ผลการเพาะเชื้อพบว่าปริมาณเชื้อราที่พบอยู่ในค่าระหว่าง $10^1 - 10^4$ CFU/ml การปนเปื้อนเชื้อราในยาสมุนไพรเกิดจากการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะหรือการผึ่งตัวยาให้แห้งเป็นระยะเวลานาน ซึ่งข้อบังคับสำหรับการปนเปื้อนของเชื้อราโดยคณะกรรมการจัดทำตำรับยาแห่งประเทศไทย ได้กำหนดว่าสามารถพบเชื้อราได้ไม่เกิด $5x10^4$ CFU/ml นันทนา สิทธิชัย (2547 : 31 อ้างอิงถึงคณะกรรมการจัดทำ

ตำรับยาแห่งประเทศไทย. : 2546) โดยยาดมสมุนไพร กลุ่มที่ 1 เจอเชื้อรามากที่สุด ในขณะที่ยาดมสมุนไพรอีก 2 กลุ่มพบเชื้อน้อยกว่า เนื่องจากทั้งสองกลุ่มมีส่วนผสมเป็นน้ำมันหอมระเหยเหมือนกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้ (เอนก ภู่ทอง. 2555:293-301, เบญจมาศ เขตรดง. 2553:31) ในขณะที่ยาดมในกลุ่มที่ 3 ผู้วิจัยไม่สามารถซับน้ำมันหอมระเหยได้เนื่องจากเป็นผงละเอียดติดกับผ้าขาวบางที่ห่อมา ทางผู้วิจัย จึงคาดว่าจะไม่ พบการปนเปื้อนของ เชื้อ กลับพบเชื้อราปนเปื้อน จากยาดม 2 ยี่ห้อ จึงต้องกลับมาพิจารณาที่บรรจุภัณฑ์พบ แบบปิดไม่สนิทและไม่มีการซีลป้องกันอากาศ จากภายนอก จากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิปกติ จึง น่าจะเป็นสาเหตุที่ ทำให้ตรวจเจอเชื้อราปนเปื้อนได้

การเก็บรักษายาสมุนไพรให้คงสภาพเดิมทั้งทางด้านกายภาพและฤทธิ์ของยาเป็นสิ่งที่ผู้ผลิตและจำหน่ายควรพึงระมัดระวัง สำหรับข้อกำหนดการเก็บรักษานั้นยังไม่มีเป็นข้อบังคับ มีเพียงข้อแนะนำเท่านั้น โดยให้อยู่ในภาชนะที่ปิดสนิท แล ะกันความชื้น คณะผู้วิจัยพบบรรจุภัณฑ์ ของยาดมสมุนไพร 3 แบบ คือ แบบที่ไม่มีการซีลที่หีบห่อ ฝาครอบปิดไม่สนิท แบบที่ไม่มีการซีลที่หีบห่อ มีฝาเกลียวแบบปิดสนิท และแบบที่มีการซีลที่ตัวผลิตภัณฑ์ ไม่มีหีบห่อ และมีฝาเกลียวแบบปิดสนิท ผลการตรวจพบว่าทั้ง 3 แบบสามารถพบเชื้อได้ ไม่แตกต่างกัน และไม่ แสดงให้เห็น ถึงความสัมพันธ์กันระหว่างบรรจุภัณฑ์กับการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ ทำให้ ไม่อาจ สรุปได้ ว่าการปนเปื้อนของเชื้อ ราในยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งานมีการปนเปื้อนเชื้อราตั้งแต่กระบวนการผลิตหรือว่าหลังกระบวนการผลิต

การที่ยาดมสมุนไพรบางยี่ห้อมีการขึ้นทะเบียนและพิมพ์ว่าเป็นยาสามัญประจำบ้าน ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขต้องมีการขึ้นทะเบียน (นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ. 2545) และปฏิบัติตามข้อกำหนดต่างๆ เช่น วิธีการผลิต บริเวณการผลิต การติดฉลาก การเขียนวิธีการใช้ และการบอกวันหมดอายุ เป็นต้น แต่จากการทำงานวิจัยในครั้งนี้พบว่า ในบางยี่ห้อไม่มีการขึ้นทะเบียนตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ทำให้ไม่มีการการติดฉ ลากบอกผู้บริโภคในสิ่งที่กล่าวมาข้างต้น (รูปที่ 5) หากแต่ผลแสดงให้เห็นว่าอัตราการพบเชื้อจากยาดมที่ขึ้นทะเบียนกับไม่ขึ้นทะเบียนไม่มีความแตกต่างกัน

เชื้อราปนเปื้อนที่เพาะได้จากยาดมสมุนไพรเมื่อนำมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิธีทางฟีโนทัยป์ กับวิธีทางจีโนทัยป์ พบว่าให้ผลการจัดจำแนกสอดคล้องกัน โดยวิธีทางฟีโนทัยป์นิยมใช้ในการทำงานทางด้านห้องปฏิบัติการ เพราะค่าใช้จ่ายไม่แพงและไม่ต้องการอุปกรณ์ หรือเครื่องมือที่พิเศษและมีราคาแพง แต่มีข้อจำกัดคือใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงให้มีการสร้างเซลล์ สืบพันธุ์หรือ

ลักษณะเด่นของตัวเชื้อที่จะใช้ในการจัดจำแนก และที่สำคัญคือต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการจัดจำแนกเชื้อทางลักษณะมหสัณฐานและจุลสัณฐาน ในขณะที่วิธีทางจีโนทัยป์ ใช้การศึกษาวิจัยเชื้อรามากกว่าเนื่องจากสามารถทำได้รวดเร็ว มีความน่าเชื่อถือ และจัดจำแนกได้ลงถึงสปีชีย์ในบางเชื้อ แต่ก็มีข้อจำกัดทางด้านค่าใช้จ่ายที่สูง และต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านวิธีทางอณูชีววิทยา ดังนั้นการเลือกใช้วิธีในการจัดจำแนกขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทำงานเป็นหลัก

เชื้อราปนเปื้อนในอากาศ บางสายพันธุ์สามารถก่อใ ห้เกิดโรคติดเชื้อราได้โดยส่วนมาก ป็นเชื้อในกลุ่มเชื้อราฉวยโอกาส (opportunistic fungi) ซึ่งการติดเชื้อมักจะเกิดจากหายใจเอาโคนิเดียของเชื้อเข้าไปในปอด ในคนปกติมักจะสามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ แต่ในกลุ่มคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือสุขภาพอ่อนแอ ก็จะเกิดการติดเชื้ อที่บริเวณที่เชื้อเข้าไป (ระบบทางเดินหายใจ ) และอาจลุกลามไปยังอวัยวะอื่นจนส่งผลให้เสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ได้ซึ่ งพบมากในคนปกติที่ได้รับโคนิเดียของเชื้อราเข้าไปเป็นระยะเวลานาน ในงานวิจัยครั้งนี้พบเชื้อราปนเปื้อนในยาดมสมุนไพรก่อนเปิดใช้งานจำนวน 35 สายพันธุ์ จาก 270 ตัวอย่าง

สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในงานวิจัยนี้คือ เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่มีรายงานการก่อโรคที่รุนแรงและพบในผู้ป่วยมากที่สุดคือ *Aspergillus fumigatus* แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อ *A. fumigatus* แต่กลับพบ *A. sydowii*, *A. aculeatus*, *A. calidoustus* และ *Aspergillus* spp. ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Fern'andez และคณะ(Fernandez et al. 2013) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Aspergillus* จากอากาศในโรงพยาบาลเด็ก พบเชื้อ *Aspergillus* spp. อื่นมากกว่าเชื้อ *A. fumigatus* เชื้อเหล่านี้ถือว่าเป็น cryptic species ที่พบไม่ค่อยพบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค แต่ในปัจจุบันด้วยปัจจัยในหลายๆ ด้าน เช่น การใช้ยา โรคที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน การทานยากดภูมิคุ้มกัน และความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี ทำให้พบผู้ป่วยติดเชื้อกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้นรองลงมาคือเชื้อ *Cladosporium* โดยพบเป็นเชื้อที่มีรายงานการก่อโรคได้ดังนี้

1. *Aspergillus sydowii* สามารถก่อให้เกิดโรค allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) และพบก่อโรคในผู้ป่วยมากกว่าเชื้อ *A. fumigatus* (Hiroto et al. 2013 : 190-193)
2. *Aspergillus aculeatus* เป็นเชื้อในกลุ่ม Black aspergillus ก่อให้เกิดการอักเสบของบริเวณถุงน้ำตา (Dacryocystitis) (Giancarlo et al. 2012 : 89-97)
3. *Aspergillus calidoustus* มีรายงานพบอุบัติการก่อโรค pulmonary aspergillosis เพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่ผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายปอดและได้รับยา amphotericin B เป็นเวลานาน (Egli et al. 2012 : 403-410) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *A. calidoustus* ได้จากระบบน้ำประปาในประเทศ

นอร์เวย์ ทำให้เสี่ยงต่อการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ได้เช่นเดียวกัน (Hageskal et al. 2011 : 588-593)

4. *Cladosporium cladosporioides* เป็นเชื้อราในกลุ่มสายรามีสีน้ำตาลหรือดำ (dematiaceous fungi) ก่อให้เกิดโรค Rhinosinusitis (Twaruzek et al. 2014 : 1143-1148, Giri et al. 2013 : 379-384) และโรค Allergic brochopulmonary mycosis (ABPM) (Chowdhary et al. 2014 : 30-48)
5. *Penicillium citrinum* เป็นราสายไม่มีสี (hyaline fungi ) สามารถก่อให้เกิดโรค chronic sinusitis (Twaruzek et al. 2014 : 1143-1148) นอกจากนี้ยังสร้างสารพิษชื่อว่า Citrinin ซึ่งเป็นพิษต่อไต (nephrotoxicity) (Singh et al. 2014 : 89-95, Ostry et al. 2013 : 1574-1586)
6. *Bipolaris papendorfii* เป็นเชื้อราในกลุ่มสายรามีสีน้ำตาลหรือดำ (dematiaceous fungi) ก่อให้เกิดโรคกระจกตาอักเสบจากเชื้อรา (mycotic keratitis) (Kumar et al. 2005 : 851-857)
7. *Clavispora lusitaniae* (ชื่อเรียกในระยะสืบพันธ์แบบอาศัยเพศของ *Candida lusitaniae*) เป็นเชื้อยีสต์ ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสโลหิต และมีรายงานการดื้อยาในเชื้อกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น (Taj-Aldeen et al. 2014:552-556, Desnos-Ollivier et al. 2011 : 2304-2306)
8. *Candida orthopsilosis* เป็นเชื้อยีสต์ในกลุ่ม *Candida parapsilosis* species complex (ได้แก่ *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*) (Pryszcz et al. 2014 : 1069-1078) สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตได้ (Ors, Colombari and Blasi. 2010 : 1024-1033, Borghi et al. 2011 : 1437-1441, Abi-Chacra et al. 2013 : 831-848, Marti-Carrizosa, Sanchez-Reus, March and Coll. 2014 : 454-461, Chin et al. 2013 : 654-662)

ในขณะที่เชื้อ *Emericella variecolor* (ชื่อเรียกในระยะสืบพันธ์แบบอาศัยเ พศของ *Aspergillus variecolor*) มีรายงานว่าสามารถสร้างสารพิษที่ชื่อว่า Asteltoxin สามารถยับยั้งกระบวนการ mitochondria respiration (ขั้นตอนการส่งผ่าน electron) (Kawai, Fukushima and Nozawa. 1985 : 73-77) แต่ยังไม่มีรายงานการก่อโรคในคน เชื้อ *Neurospora intermedia* ไม่ใช่เชื้อก่อโรคทั้งในคน สัตว์และพืช (Hussain, Akrema, Rahisuddin and Khan. 2014 : 953-964) เชื้อ *Nigrospora oryzae* มีรายงาน

การสร้างสารพิษซึ่งทำให้สัตว์ป่วยได้ (Wilson, Davis and Diener. 1986 : 133-138) เชื้อ *Trametes polyzona* เป็นเห็ดที่พบได้ในเขตอบอุ่น ไม่ใช่เชื้อก่อโรคทั้งในคน สัตว์และพืช (Douanla-Meli. 2007 : 409-420) เชื้อ *Glomerella graminicola* เป็นสาเหตุของโรคในพืช เช่น ข้าวโพด (Vaillancourt and Hanau. 1994 : 3890-3893, Hanau. 1999 : 593-596) แม้ว่าวิธีทางด้านจีโนทัยป์ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและรวดเร็ว สามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับสปีชีย์ แต่ด้วยข้อจำกัดทางด้านข้อมูลสารพันธุกรรมทำให้ในการวิจัยครั้งนี้ เชื้อบางตัว ไม่สามารถระบุในระดับสปีชีย์ได้ และจึงทำให้ไม่สามารถบอก ได้ว่าเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคในคนได้หรือไม่

**รูปที่ 6** แสดงฉลากของยาดม ก :แสดงเลขขึ้นทะเบียนกับตามกฎกระทรวงสาธารณสุขทำให้มีเอกสารกำกับครบ ข และ ค : ไม่ได้แสดงเลขขึ้นทะเบียนและเอกสารกำกับบนฉลากไม่ครบตามกฎกระทรวงสาธารณสุข

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็น ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับยาดมสมุนไพรกับการปนเปื้อนเชื้อรา โดยพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณที่ไม่เกินเกณฑ์กำหนด และไม่พบเชื้อ

ก่อโรคตามที่ระบุไว้ในประกาศกระทรวง สำหรับยาดมที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบผู้บริโภคระวังการสัมผัสกับผิวบริเวณจมูกโดยตรง เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยอาจทำให้เกิดการระคายเคือง หรือเกิดการอักเสบของโพรงจมูกและอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำ ให้เกิดโรคจากการติดเชื้อขึ้นได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้พอสรุปได้ว่ายาดมสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค แต่ควรเลือกผลิตภัณฑ์ที่แสดงฉลากระบุวันและเวลาที่ผลิต และ /หรือวันหมดอายุ ตลอดจนควรติดฉลากอธิบายวิธีการใช้งานและข้อควรระวังในการใช้งานให้ผู้บริโภคได้ทราบ ในการใช้งานควรเปลี่ยนยาดมหลังจากรู้สึกได้ว่ากลิ่นของน้ำมันหอมระเหยเจือจางลง เพราะหลังจากเปิดใช้ความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อราในอากาศก็จะเพิ่มมากขึ้น น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นลดลงจากการใช้งานอาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพได้น้อยลงด้วย ในผู้ที่มีอาการ โพรงจมูกอักเสบ ติดเชื้อในโพรงจมูกหรือไซนัสอักเสบควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาดมเพราะจะทำให้เกิดอาการเพิ่มมากขึ้น หรือ มีการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นได้ ท้ายสุดคือในส่วนประกอบอย่างเช่น เมนทอล และการบูร อาจก่อให้เกิดอาการเสพติดยาดม เพราะสารสองตัวนี้เป็นสารมีผลต่อระบบประสาทจึงอาจทำให้เกิดการเสพติด

# บรรณานุกรม


เจนจบ ยิ่งสุมล. (2555) **สารานุกรมสมุนไพรไทย.** กรุงเทพมหานคร : สถาพรบุ๊คส์.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร และ วิเชียร จีรวงส์. (2545) “น้ำกระสายยา” ใน **คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม1** ระริน อุทกะพันธุ์, บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร, ศุภชัย ติยวรนันท์ และ วิเชียร จีรวงส์ (2556) **คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 6.** กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์.

พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. (2551 ) **สมุนไพร สรรพคุณและประโยชน์เพื่อการนำมาใช้** . พิสุทธิพร ฉ่ำใจ และ ปรัชญา จันทรทิพย์, บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : เคล็ดไทย.

ทัศนีย์ ฮาซาไนน์ และคณะ. (2551) **คู่มือการใช้สมุนไพรไทย-จีน.** กรุงเทพมหานคร : สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์.

เบญจมาศ เขตรดง และ ปรัชญากร ชูตระกูล. (2553) **Antimicrobial activity of Essential Oils from Holy basil (*Ocimum sanctum* L.), Sweet basil *(Ocimum basilicum* Linn.), Citronella (*Cymbopogon nardus* Rendle) and Hoary basil (*Ocimum citriodorum*) to inhibit microorganisms.** ภาคนิพนธ์สัตวศาสตร์ ปริญญาตรี : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . [ออนไลน์ ] แหล่งที่มา : http://161.246.67.22/aganimal_v2/THeSiS-DoC/ef1fedde45b4ca6fc7cb49894acf5a71.pdf.

นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ. (2545) **คู่มือผลิตภัณฑ์ ยาจากสมุนไพร เพื่อเศรษฐกิจชุมชน** . ปัทมาวดี กสิกรรม. วินิต อัศวกิจวิรี และสุวิไล วงศ์ธีระสุต ,บรรณาธิการ. กรุงเทพมหานคร : โครงการพัฒนาตำรา กองทุนสนับสนุนกิจกรรม มูลนิธิแพทย์แผนไทยพัฒนา สถาบันการแพทย์แผนไทย สามเจริญพาณิชย์ (กรุงเทพ).

นิติรัฐ ไหว้พรหม, วศิน ศรกายสิทธิ์ และวัชรี คุณกิตติ. (2013) "ผลของระบบนำส่งน้ำมันหอมระเหยต่อฤทธิ์การต้านจุลชีพบางชนิด" **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน.** 9 หน้า 15.

นิจศิริ เรืองรังษี และ ธวัชชัย มังคละคุปต์. (2547) **สมุนไพรไทย เล่ม 1**. กรุงเทพมหานคร : ฐานการพิมพ์.

**นันทนา สิทธิชัย .** (2547) “มาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ” วารสารสมุนไพร. 11 (1) หน้า 31: อ้างถึงใน **คณะกรรมการจัดทำตำรายาของประเทศไทย (2546)** เอกสาร Limits for Microbial Contamiation.

อมรรัตน์ อนันต์วราพงษ์ และคณะ. (2555) “ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร (ยาดม ยาหม่อง พิมเสนน้ำ)” [ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://clinictech.rmutp.ac.th/wp/wp-content/uploads/2013/03/การทำผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร(ยาดม-ยาหม่องน้ำ-พิมเสนน้ำ).pdf.

พรรณกร อิ่มวิทยา . (2543 ) **โรคติดเชื้อ รา.** พรรณกร อิ่มวิทยา , บรรณาธิการ . กรุงเทพ มหานคร : โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการคณะรัฐมนตรี.

เอนก ภู่ทอง และคณะ. (2555) "The Effect of Lemongrass Volatile Oil on Pathogenic *Candida albicans*" **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 20 (4) หน้า 293-301.

Abi-Chacra et al. (2013) "Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex" **FEMS Yeast Research**. 13 (8) page 831-848.

Bavbek et al. (2006) "Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with respiratory allergy and outdoor counts of mold spores in Ankara atmosphere, Turkey" **Journal of Asthma.** 43 (6) page 421-426.

Belousov, D. and Maneshina, O. A. (2006) "[Therapy of invasive aspergillosis: review]" **Antibiot Khimioter**. 51 (3-4) page 26-46.

Borghi et al. (2011) "Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections" **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.** 30 (11) page 1437-1441.

Chevalier J. M. and Azuelos, C. (1994) "[*Alternaria*": a review of the literature]" **Allergy Immunology (Paris)**. 26 (2) page 68.

Chin et al. (2013) "*Candida albicans* isolates from a Malaysian hospital exhibit more potent phospholipase and haemolysin activities than non-albicans *Candida* isolates" **Tropical Biomedicine**. 30 (4) page 654-662.

Chowdhary et al. (2014) "Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: a global overview" **Critical Reviews Microbiology**. 40 (1) page 30-48.

Costa et al. (1991) "Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris hawaiiensis*. A case report" **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 33 (1) page 74-79.

Desnos-Ollivier et al. (2010) "Development of echinocandin resistance in *Clavispora lusitaniae* during caspofungin treatment" **Journal of Clinical Microbiology**. 49 (6) page 2304-2306.

Douanla-Meli et al. (2007) "Studies of tropical African pore fungi (Basidiomycota, Aphyllophorales) : three new species from Cameroon" **Nova Hedwigia**. 84 page 409-420.

Egli et al. (2012) "Emergence of *Aspergillus calidoustus* infection in the era of posttransplantation azole prophylaxis" **Transplantation**. 94 (4) page 403-410.

Farina et al. (2007) "Pheohyphomycotic soft tissue disease caused by *Alternaria alternata* in a kidney transplant patient: a case report and literature review" **Transplantation Proceedings**. 39 (5) page 1655-1659**.**

Fernandez et al. **(**201**4)** "[*Aspergillus* species in hospital environments with pediatric patients in critical condition.]" **Revista Iberoamericana de Micología.** 31 (3) page 176-181.

Fernandez et al. (1999) "Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Curvularia lunata* and a review of *Curvularia* infections in pediatrics" **Pediatric Infectious Disease Journal**. 18 (8) page 727-731.

Giancarlo et al. (2012) "*Aspergillus aculeatinus* n. sp. in chronic human dacryocystitis; the first report" **Journal of Infectious Disease and Antimicrobial Agents**. 29 page 89-97.

Giri et al. (2013) "Unusual causes of fungal rhinosinusitis: a study from a tertiary care centre in South India" **Indian Journal of Medical Microbiology**. 31 (4) page 379-384.

Hageskal et al. (2011) "Emerging pathogen *Aspergillus calidoustus* colonizes water distribution systems" **Medical Mycology**. 49 (6) page 588-593.

Hiroto et al. (2013) "Dissociation between sensitizing and colonizing fungi in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis." **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. 111 (3) page 190-193.

Howard, D. H. (2003) **Pathogenic fungi in humans and animals.** Sigler L, editor. The United State of America: Marcel Dekker Inc.

Hussain et al. (2014) "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles: effects of shape-directing cetyltrimethylammonium bromide, pH, sunlight and additives" **Bioprocess and Biosystems Engineering.** 37 (5) page 953-964.

Imwidthaya, P, Dithaprasop, P. and Egtasaeng, C. (1989) "Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Bangkok (Thailand)" **Mycopathologia**. 108 page 65–67.

Jha, et al. (1996) "Subcutaneous phaeohyphomycosis in a renal transplant recipient: a case report and review of the literature" **American Journal of Kidney Diseases**. 28 (1) page 137-139.

Kawai, K., Fukushima, H. and Nozawa, Y. (1985) "Inhibition of mitochondrial respiration by asteltoxin, a respiratory toxin from *Emericella variecolor*" **Toxicology Letters**. 28 (2-3) page 73-77.

Khan, A. N., Jones, C. and Macdonald, S. (2003) "Bronchopulmonary aspergillosis: a review" **Current Problems** in **Diagnostic Radiology**. 32 (4) page 156-168.

Kumar, M., Mishra, N. K. and Shukla, P. K. (2005) "Sensitive and rapid polymerase chain reaction based diagnosis of mycotic keratitis through single stranded conformation polymorphism" **American Journal of Ophthalmology**. 140 (5) page 851-857.

Marti-Carrizosa et al. (2014) "Fungemia in a Spanish hospital: the role of *Candida parapsilosis* over a 15-year period" **Scandinavian Journal** of **Infectious Diseases**. 46 (6) page 454-461.

McGinnis et al. (1992) "Phaeohyphomycosis caused by Bipolaris spicifera: an informative case" **European Journal of Epidemiology**. 8 (3) page 383-386.

McGinnis M. R., Rinaldi, M. G. and Winn, R. E. (1986) "Emerging agents of phaeohyphomycosis: pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*" **Journal of Clinical Microbiology**. 24 (2) page 250-259.

Meyer et al. (2003) "Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates" **Emerging Infectious Disease.** 9 page 189–195.

O'Neill, R. P. and Penman, R. W. (1971) "Aspergillosis: a review and case report" **Southern Medical Journal**. 64 (4) page 392-396.

Orsi, C. F., Colombari, B. and Blasi, E. (2010) "*Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex" **Medical Mycology**. 48 (8) page 1024-1033.

Ostry, V., Malir, F. and Ruprich, J. (2013) "Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin" **Toxins (Basel)**. 5 (9) page 1574-1586.

Prabhu, R. M. and Patel, R. (2004) "Mucormycosis and entomophthoramycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment" **Clinical Microbiology Infection**. 10 (Suppl 1) page 31-47.

Prince, H. E, Kaplan, M. A. and Morrow, M. B. (1956) "Fungi and bacteria in the etiology of respiratory allergic diseases. XVII. Comparison of the allergenicity of a sporulating and a nonsporulating Alternaria" **Annals of Allergy**. 14 (1) page 15-17.

Pryszcz LP, Nemeth T, Gacser A and Gabaldon T. (2014) "Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies" **Genome Biology and Evolution**. 6(5):1069-1078. PubMed PMID: 24747362.

Rao et al. (1989) "Phaeohyphomycosis of the nasal sinuses caused by *Bipolaris* species" **Pathology**. 21 (4) page 280-281.

Rasse, M., Male, O. and Knosp, E. (1990) "[Rhinocerebral mycoses caused by Mucoraceae species (mucormycosis). Case report and literature review]" **Wiener klinische Wochenschrift.** 102 (14) page 395-403.

Revankar et al. (2002) "Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis" **Clinical of Infectious Dissease**. 34 (4) page 467-476.

Rozanska-Kudelska et al. (2009) "[Mold fungi and the role of allergy on fungi in chronic rhinosinusitis]" **The Polish otolaryngology**. 63 (3) page 245-248.

Rupp et al. (2008) "Routine sampling of air for fungi does not predict risk of invasive aspergillosis in immunocompromised patients" **Journal of Hospital Infection**. 68 (3) page 270-271.

Safirstein, B. H. (1976) "Allergic bronchopulmonary aspergillosis with obstruction of the upper respiratory tract" **Chest**. 70 (6) page 788-790.

Sasaki et al. (1970) "[Case of mucormycosis secondary to upper respiratory infection]" **Jibiinkoka**. 42 (1) page 43-47.

Schaefer, J. C., Yu, B. and Armstrong, D. (1976) "An *aspergillus* immunodiffusion test in the early diagnosis of aspergillosis in adult leukemia patients" The **American Review of Respiratory Disease**. 113 (3) page 325-329.

Shah, A. and Panjabi, C. (2014) "Allergic aspergillosis of the respiratory tract" **European Respiratory Review**. 23 (131) page 8-29.

Singh et al. (2014) "Detection of the mycotoxin citrinin using silver substrates and Raman spectroscopy" **Journal Hazardous Materials.** 26 5 pag 89-95.

Taj-Aldeen et al. (2014) "Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar" **Med ical Mycology**. 52 (5) page 552-556.

Twaruzek et al. (2014) "The occurrence of molds in patients with chronic sinusitis" **European archives of otorhinolaryngology**. 271 (5) page 1143-1148.

Vaillancourt, L. J. and Hanau, R. M. (1994) "Cotransformation and Targeted Gene Inactivation in the Maize Anthracnose Fungus, *Glomerella graminicola*" **Applied and Environmental Microbiology**. 60 (10) page 3890-3893.

Vaillancourt, L. J. and Hanau, R. M. (1999) "Sexuality of Self-Sterile Strains of *Glomerella graminicola*" **Mycologia**. 91 page 593-596.

White et al. (1990) **In PCR Protocols : A guide to Methods and Applications**. The United State of America : Academic Press

Whitney et al. (2013) "Evaluation of serum galactomannan detection for diagnosis of feline upper respiratory tract aspergillosis" **Veterinay Microbiology**. 162 (1) page 180-185.

Willson, M.E., Davis, N.D. and Diener, U.L. (1986) "A toxic metabilte of *Neurospora oryzae* (Berk and Br.) petch" **Mycopathologia.** 95 page 133-138.

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY
華僑崇聖大學

## ประวัติย่อผู้วิจัย

**หัวหน้าโครงการวิจัย**


**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวพัชรี กัมมารเจษฎากุล

**ประวัติการศึกษา** วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ด. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**สถานที่ติดต่อ** กลุ่มจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 02 3126300 ต่อ 1221


**ผู้วิจัย**


**ชื่อ-นามสกุล** นางจิดาภา เซคเคย์

**ประวัติการศึกษา** วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)

วท.ด. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**สถานที่ติดต่อ** คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทรศัพท์ 074 289102


**ผู้วิจัย**


**ชื่อ-นามสกุล** นางสาววัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์

**ประวัติการศึกษา** วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล

**สถานที่ติดต่อ** กลุ่มจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 02 3126300 ต่อ 1221

**ผู้วิจัย**

**ชื่อ-นามสกุล** นางอิสยา จันทร์วิทยานุชิต

**ประวัติการศึกษา** วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล

**สถานที่ติดต่อ** กลุ่มจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 02 3126300 ต่อ 1221

**ผู้วิจัย**

**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวอริยา จินดามพร

**ประวัติการศึกษา** วท.บ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.ด. (Basic Sciences) Nagoya University, Japan

**สถานที่ติดต่อ** หน่วยราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02 2564472 ต่อ 601-3