Thai Science and Technology Journal
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
Journal Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj

บทบาทของ Blood Agar ในการแสดงลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์: การเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาและการเจริญกับ Sabouraud Dextrose Agar

The Role of Blood Agar in Demonstrating Phenotypic Characteristics of Human Pathogenic Fungi: Morphological and Growth Comparison with Sabouraud Dextrose Agar

ปัญญวัฒน์ บุณถนอม[1*], วัชรมาศ ม่วงแก้ว[2*], พรพรรณ ขำเอี่ยม[2], ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย[3**]

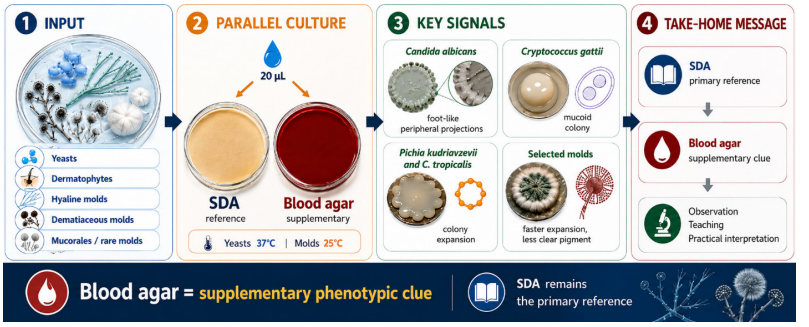
[1]*สำนักงานคณบดี งานเทคโนโลยีการศึกษาและศิลปกรรม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล*
[2]*ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล*
[3]*สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

Panyawat Boontanom[1*], Watcharamat Muangkaew[2*], Pronpan Khum-eam[2], Natthapaninee Thanomsridetchai[3]

[1]*Educational Technology and Art Unit, Dean Office, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University*
[2]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University*
[3]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University*

Received

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

(ภาพประกอบบางส่วนในบทความนี้จัดทำขึ้นโดยใช้ ChatGPT (OpenAI) เป็นเครื่องมือช่วยในการสร้างและปรับปรุงภาพ ภายใต้แนวคิด การกำกับทิศทาง และคำแนะนำด้านเนื้อหาวิชาการของผู้เขียน เนื้อหาทางวิทยาศาสตร์ คำศัพท์เฉพาะ และการตีความเพื่อการเรียนรู้ทั้งหมดได้รับการตรวจสอบแก้ไข และรับรองโดยผู้เขียนก่อนนำมาเผยแพร่)

Despite advances in modern diagnostic technologies, the diagnosis of human pathogenic fungi still relies substantially on culture, morphological assessment, and direct microscopic examination. Sabouraud dextrose agar (SDA) remains the standard medium for evaluating fungal morphology. However, blood agar is widely used in clinical microbiology laboratories and may be one of the first routine media on which fungi are unexpectedly detected. Understanding how fungi express their phenotypes on blood agar may therefore help laboratory personnel recognize medium-dependent phenotypic variation and reduce potential errors in preliminary interpretation.

This study aimed to compare the growth rates and morphological characteristics of diverse groups of human pathogenic fungi cultured on SDA and blood agar. The organisms included yeasts, dermatophytes, hyaline molds, dematiaceous molds, thermally dimorphic molds, non-septate molds, neglected molds, and an entomopathogenic mold. The initial inocula were standardized to comparable levels. Yeasts were incubated at 37°C, whereas filamentous fungi were incubated at 25°C. Growth rate, colony morphology, surface and reverse coloration, and microscopic structures were subsequently evaluated.

Most fungi were able to grow on blood agar; however, SDA provided clearer visualization of pigmentation, reverse colony morphology, and sporulating structures in many molds. In contrast, blood agar revealed foot-like projections in *Candida albicans* and a mucoid colony phenotype in *Cryptococcus gattii*, and greater colony expansion or growth in *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Microsporum canis*, and *Aspergillus niger*.

In conclusion, SDA remains the primary standard medium for fungal morphological assessment, whereas blood agar may serve as a supplementary medium that reveals selected phenotypic characteristics. Its use may enhance observational skills, result interpretation, and diagnostic evaluation of pathogenic fungi commonly encountered in routine clinical microbiology workflows.

คำสำคัญ

เชื้อราก่อโรคในมนุษย์;
Blood agar;
Sabouraud dextrose agar;
สัณฐานวิทยาเชื้อรา;
ราวิทยาทางการแพทย์

Keywords

Human pathogenic fungi;
Blood agar;
Sabouraud dextrose agar;
Fungal morphology;
Medical mycology

บทคัดย่อ

แม้จะมีความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการวินิจฉัยสมัยใหม่ แต่การวินิจฉัยเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ยังคงต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ การประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก โดยมี Sabouraud Dextrose Agar (SDA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตาม Blood agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก และอาจเป็นอาหารชนิดแรกที่ตรวจพบเชื้อราโดยไม่ได้คาดหมาย การทำความเข้าใจฟีโนไทป์ที่เชื้อราแสดงบน Blood agar จึงอาจช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานตระหนักถึงความแปรผันที่ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อและลดความคลาดเคลื่อนในการแปลผลเบื้องต้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์กลุ่มต่างๆ บน SDA และ Blood agar ครอบคลุม yeasts, dermatophytes, hyaline molds, dematiaceous molds, thermally dimorphic molds, non-septate molds, neglected molds และ entomopathogenic mold โดยปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้ใกล้เคียงกัน บ่มยีสต์ที่ 37 องศาเซลเซียส และราเส้นใยที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นประเมินอัตราการเจริญ ลักษณะโคโลนี สีด้านหน้า สีด้านหลัง และโครงสร้างจุลทรรศน์

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่เจริญบน Blood agar ได้ แต่ SDA แสดง pigment, reverse morphology และโครงสร้างสร้างสปอร์ได้ชัดเจนกว่าใน mold หลายชนิด ขณะที่ Blood agar ทำให้เห็น foot-like projections ใน *Candida albicans*, mucoid colony ใน *Cryptococcus gattii* และเพิ่มการแผ่ขยายหรือการเจริญของ *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Microsporum canis* และ *Aspergillus niger*

สรุปได้ว่า SDA ยังคงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานหลักสำหรับการประเมินสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ส่วน Blood agar สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือกเพิ่มเติม ซึ่งช่วยเผยให้เห็นลักษณะฟีโนไทป์ที่จำเพาะเจาะจง การประยุกต์ใช้นี้จึงมีส่วนช่วยส่งเสริมทักษะการสังเกตทางสัณฐานวิทยา การอ่านผลและการวิเคราะห์ผลวินิจฉัยเชื้อราก่อโรคที่มักพบในกระบวนการตรวจทางจุลชีววิทยาคลินิก

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** natthapaninee@go.buu.ac.th **DOI:**

1. บทนำ

การติดเชื้อราก่อโรคในมนุษย์มีความสำคัญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยวิกฤต ผู้ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน และผู้ได้รับยาต้านจุลชีพเป็นเวลานาน เชื้อราหลายชนิดซึ่งเคยถูกมองว่าเป็นเพียงเชื้อฉวยโอกาสหรือเชื้อจากสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันสามารถก่อการติดเชื้อเฉพาะที่ การติดเชื้อในกระแสเลือด ปอด ผิวหนัง เล็บ และการติดเชื้อแบบแพร่กระจายที่รุนแรงได้ ประกอบกับการเพิ่มขึ้นของเชื้อราดื้อต่อยาต้านเชื้อรา และเชื้อที่มีความไวต่อยาต่ำโดยธรรมชาติ การวินิจฉัยชนิดเชื้ออย่างถูกต้องและรวดเร็วจึงมีความสำคัญต่อการเลือกแนวทางรักษาที่เหมาะสม [1-2]

แม้เทคโนโลยีอณูชีววิทยา การตรวจแอนติเจน และระบบระบุชนิดเชื้ออัตโนมัติจะมีบทบาทมากขึ้น การเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับ direct microscopy และการประเมิน morphology ยังคงเป็นพื้นฐานสำคัญของราวิทยาทางการแพทย์ โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่ต้องพึ่งพาวิธีมาตรฐานเพื่อการตรวจคัดกรองและแปลผลเบื้องต้น การสังเกต yeast cells, pseudohyphae, true hyphae, septate หรือ non-septate hyphae, conidia, conidiophore, sporangia และ rhizoids ช่วยจำกัดขอบเขตการวินิจฉัยและกำหนดการตรวจยืนยันเพิ่มเติมได้อย่างเป็นระบบ [3-4] ทักษะการอ่านสีผิว สีด้านหลัง ขอบ ความนูน พื้นผิว pigment และโครงสร้างจุลทรรศน์จึงยังจำเป็นต่อบุคลากรห้องปฏิบัติการและผู้เรียนด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) เป็นอาหารมาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงและศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เนื่องจากสนับสนุนการเจริญของเชื้อหลายชนิดและช่วยให้เห็นสีโคโลนี สีด้านหลัง การสร้างสปอร์และโครงสร้างจำเพาะได้ชัดเจน ในทางตรงกันข้าม Blood agar เป็นอาหารพื้นฐานที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก และมักเป็นอาหารชนิดแรกที่ตรวจพบเชื้อราโดยไม่ตั้งใจ ประเด็นสำคัญจึงไม่ใช่ว่า Blood agar จะทดแทน SDA ได้หรือไม่ แต่คือเชื้อราจะแสดง morphology แตกต่างจากบน SDA เพียงใด และความแตกต่างนั้นมีประโยชน์ต่อการสังเกต การเตือนผู้ตรวจ การวินิจฉัยเบื้องต้น และการลดความผิดพลาดในการแปลผลหรือไม่

อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้ทำหน้าที่เป็นเพียงพื้นผิวสำหรับการเจริญ แต่เป็นสภาพแวดล้อมที่กำหนดการแสดงออกทางฟีโนไทป์ องค์ประกอบของอาหาร แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โปรตีน ธาตุอาหารรอง ค่า pH ความชื้น และส่วนประกอบจากเลือดอาจส่งผลต่ออัตราการเจริญ filamentation, sporulation, capsule-associated appearance และ pigmentation เชื้อชนิดเดียวกันจึงอาจมีลักษณะโคโลนีและโครงสร้างจุลทรรศน์แตกต่างกันบนอาหารต่างชนิด ความแตกต่างดังกล่าวเป็นทั้งโอกาสในการศึกษาความยืดหยุ่นของลักษณะฟีโนไทป์และข้อควรระวังในการแปลผลทางห้องปฏิบัติการ [5-7]

ในกลุ่ม yeast อาหารเลี้ยงเชื้ออาจเปลี่ยนสี ความมันวาว รอยย่น ขอบโคโลนี และการสร้าง pseudohyphae โดยเฉพาะ Candida albicans ซึ่งเปลี่ยนรูปร่างระหว่าง yeast, pseudohyphae และ hyphae ได้ [8-10] Cryptococcus neoformans และ Cryptococcus gattii มี capsule เป็นลักษณะสำคัญ และอาจแสดง mucoid colony แตกต่างกันตามสภาวะเพาะเลี้ยง [11-14] ส่วน Trichosporon asahii สามารถสร้าง budding yeast cells, pseudohyphae, true hyphae และ arthroconidia จึงเป็นตัวอย่างของ yeast-like fungus ที่ morphology เปลี่ยนแปลงตามสิ่งแวดล้อมได้ชัดเจน [15]

สำหรับ dermatophytes การประเมินสีด้านหน้าและด้านหลัง ลักษณะผิวโคโลนี microconidia และ macroconidia ยังเป็นพื้นฐานของการจำแนกเชื้อ [16-17] ส่วน hyaline molds, dematiaceous molds และ thermally dimorphic molds ต้องอาศัย pigment, conidial head, vesicle, phialide,

conidiophore และโครงสร้างจำเพาะอื่นร่วมกันในการแปลผล [18-21] Blood agar อาจส่งเสริมการแผ่ขยายของโคโลนีบางชนิด แต่สีพื้นและความชื้นของอาหารอาจลดความชัดเจนของ reverse pigment หรือรบกวนการสร้างโครงสร้างที่จำเป็นต่อการวินิจฉัย

ในกลุ่ม non-septate molds และ neglected molds เช่น Mucor spp., Rhizopus spp., Scedosporium spp. และ Lomentospora prolificans ความเร็วในการเจริญ ความฟูของโคโลนี ตลอดจน rhizoids, sporangia, conidia และ conidiogenous cells มีความสำคัญต่อการคัดแยกเบื้องต้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยง [22-23] การพบเชื้อเหล่านี้บน Blood agar จึงอาจเป็นสัญญาณเตือนที่มีคุณค่า แต่การระบุชนิดยังต้องอาศัยอาหารสำหรับเชื้อรา microscopy และการตรวจยืนยันที่เหมาะสม ขณะที่ Malassezia furfur สะท้อนข้อจำกัดของอาหารทั่วไปอย่างชัดเจน เนื่องจากเป็น lipid-dependent yeast และมักต้องใช้อาหารที่มี lipid enrichment เช่น modified Dixon agar [24-26]

จุดเด่นของการศึกษานี้คือการเปรียบเทียบ SDA และ Blood agar ในเชื้อราก่อโรคหลายกลุ่มภายใต้กรอบเดียวกัน ทำให้เห็นทั้งศักยภาพและข้อจำกัดของ Blood agar ในฐานะอาหารเสริมสำหรับการสังเกตลักษณะฟีโนไทป์ที่ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อมูลดังกล่าวช่วยลดการจดจำ morphology แบบตายตัวจาก SDA เพียงอย่างเดียว และสนับสนุนการเรียนรู้เชิงเปรียบเทียบที่สอดคล้องกับสถานการณ์จริงในห้องปฏิบัติการ [27-28]

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและอัตราการเจริญของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์บน SDA และ Blood agar โดยประเมินสีผิว สีด้านหลัง ขอบ ความนูน พื้นผิว และโครงสร้างจุลทรรศน์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับพัฒนาคู่มือการสังเกตเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบในงานประจำ และเชื่อมโยงการเรียนการสอนราวิทยาทางการแพทย์กับการปฏิบัติงานอย่างเป็นรูปธรรม

2. อุปกรณ์และวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์บน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) และ Blood agar โดยกำหนดให้ SDA เป็นอาหารมาตรฐานสำหรับประเมิน morphology และใช้ Blood agar เป็นอาหารเปรียบเทียบ เพื่อศึกษาผลขององค์ประกอบอาหารต่อขนาด สี พื้นผิว ขอบ ความนูน สีด้านหลังโคโลนี และโครงสร้างจุลทรรศน์ การศึกษานี้มุ่งประเมินคุณค่าและข้อจำกัดของ Blood agar ในฐานะอาหารเสริมสำหรับเชื้อราที่อาจตรวจพบในงานจุลชีววิทยาคลินิก มิได้เสนอให้ใช้ทดแทน SDA การประเมินประกอบด้วยการสังเกตโคโลนี การถ่ายภาพด้านหน้าและด้านหลัง การวัดขนาดเพื่อคำนวณอัตราการเจริญ และการตรวจโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ตามหลักราวิทยาทางการแพทย์ [3-4]

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดเป็นสายพันธุ์/ไอโซเลตที่ได้รับการอนุเคราะห์และเก็บรักษาไว้เพื่อการเรียนการสอนและการวิจัย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล รวมทั้งสิ้น 32 สายพันธุ์/ไอโซเลต แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ 1) yeasts and yeast-like fungi จำนวน 12 สายพันธุ์ 2) dermatophytes จำนวน 5 สายพันธุ์ 3) hyaline molds จำนวน 5 สายพันธุ์ 4) dematiaceous and thermally dimorphic molds จำนวน 4 สายพันธุ์ และ 5) non-septate, neglected, and entomopathogenic molds จำนวน 6 สายพันธุ์ โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ 1) yeasts และ yeast-like fungi: Candida albicans 96901, C. albicans 90028, C. albicans, Nakaseomyces glabratus (Candida glabrata), Candida tropicalis, Pichia kudriavzevii (Candida krusei), Candida parapsilosis,

Lodderomyces elongisporus, Cryptococcus neoformans, Cryptococcus gattii, Trichosporon asahii และ Malassezia furfur; 2) dermatophytes: Trichophyton mentagrophytes complex, T. rubrum complex, Microsporum canis, Nannizzia gypsea และ Epidermophyton floccosum; 3) hyaline molds: Aspergillus fumigatus, A. flavus, A. niger, Penicillium spp. และ Fusarium spp.; 4) dematiaceous และ thermally dimorphic molds: Fonsecaea pedrosoi, Cladosporium spp., Talaromyces marneffei และ Sporothrix schenckii; และ 5) non-septate, neglected และ entomopathogenic molds: Mucor spp., Rhizopus spp., Scedosporium apiospermum, S. boydii, Lomentospora prolificans และ Beauveria bassiana

การคัดเลือกดังกล่าวครอบคลุมเชื้อที่มีรูปแบบการเจริญ โครงสร้างจำเพาะ และความสำคัญทางคลินิกแตกต่างกัน โดยเฉพาะเชื้อฉวยโอกาสที่มีความสำคัญในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยง [1-2]

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมอาหาร

Sabouraud Dextrose Agar (SDA; [Difco™ (BBL/BD), USA]) และอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปพร้อมใช้ 5% Sheep Blood agar [BioMedia, Thailand] ถูกใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อหลักในการเปรียบเทียบ อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมตามคำแนะนำของผู้ผลิตและควบคุมภายใต้สภาวะเดียวกันตลอดการทดลอง สำหรับ *Malassezia furfur* ใช้ modified Dixon agar [Difco™ (BBL/BD), USA] เพิ่มเติมเนื่องจากเป็น lipid-dependent yeast

ก่อนการทดลอง เลือกโคโลนีบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเหมาะสม เตรียม fungal suspension ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ และทำให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 1×10^5 เซลล์หรือโคนิเดียต่อมิลลิลิตร เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นระหว่างอาหารให้ใกล้เคียงกัน การปรับ inoculum คำนึงถึงการจับกลุ่มของเซลล์ yeast การมี pseudohyphae และการปะปนของชิ้นส่วนเส้นใยในเชื้อราเส้นใย ซึ่งอาจทำให้จำนวนเชื้อที่ประเมินคลาดเคลื่อนได้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมปริมาณเริ่มต้นภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน มิใช่เพื่อยืนยันจำนวนเซลล์หรือโคนิเดียที่แท้จริงอย่างสมบูรณ์ [1-2]

การเพาะเชื้อและการบ่ม

หยอด suspension ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนผิว SDA และ Blood agar โดยทำซ้ำ 3 เพลทต่ออาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เพื่อลดผลจากความคลาดเคลื่อนเฉพาะเพลท เชื้อกลุ่ม yeast บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อกลุ่ม mold บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่มปรับตามความเร็วในการเจริญและช่วงเวลาที่เชื้อแสดงลักษณะจำเพาะ โดย dermatophytes, dematiaceous molds และ thermally dimorphic molds อาจต้องใช้ระยะเวลาบ่มนานกว่า yeast หรือ mold ที่เจริญเร็ว

การประเมินลักษณะโคโลนี

ประเมินโคโลนีด้วยตาเปล่าและถ่ายภาพด้านหน้าและด้านหลังภายใต้สภาวะแสงใกล้เคียงกัน บันทึกสี ขนาด พื้นผิว ขอบ ความนูน สีด้านหลัง และลักษณะจำเพาะ ได้แก่ foot-like projections, mucoid appearance, radial folds, concentric rings, reverse pigmentation และการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเปรียบเทียบดำเนินการแบบ paired comparison โดยเชื้อชนิด/สายพันธุ์เดียวกันบน SDA และ Blood agar ได้รับการเพาะและประเมินภายใต้ปริมาณ inoculum อุณหภูมิ ระยะเวลาบ่ม และสภาวะการถ่ายภาพเดียวกัน พร้อมใช้เกณฑ์การประเมินที่กำหนดไว้ล่วงหน้า ได้แก่ ขนาดและอัตราการเจริญ สีและพื้นผิวโคโลนี ขอบ ความนูน สีด้านหลัง และลักษณะสัณฐานจำเพาะ เพื่อให้ความแตกต่างที่สังเกตได้สะท้อนความสัมพันธ์กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด

ใน C. albicans เน้นการประเมิน pseudohyphae และ foot-like projections [5,29] ส่วน Cryptococcus spp. ประเมินความเป็นเมือกของโคโลนีและลักษณะที่สัมพันธ์กับ capsule [11-12] สำหรับ Aspergillus spp., Penicillium spp. และ Fusarium spp. ประเมินสีโคโลนี สีด้านหลัง และโครงสร้างสร้างสปอร์ที่สำคัญต่อการแปลผล [18-19]

การวัดขนาดและอัตราการเจริญ

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Digital Vernier caliper [VIGOR, Germany]; resolution 0.01 mm) ในช่วงเวลาที่กำหนด หากโคโลนีมีลักษณะไม่เป็นวงกลมสมบูรณ์ ให้วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 แนวที่ตั้งฉากกันและใช้ค่าเฉลี่ยเป็นค่าขนาดโคโลนี ณ จุดเวลานั้น อัตราการเจริญคำนวณจากการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่านศูนย์กลางต่อระยะเวลาบ่ม และรายงานเป็นมิลลิเมตรต่อวัน (mm/day) สำหรับเชื้อที่เจริญรวดเร็วมาก เช่น *Rhizopus* spp. รายงานอัตราการเจริญเป็นมิลลิเมตรต่อชั่วโมง (mm/hour)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

เตรียมสไลด์จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิดและย้อมด้วย Lactophenol Cotton Blue เพื่อตรวจ budding yeast cells, pseudohyphae, true hyphae, arthroconidia, septate หรือ non-septate hyphae, macroconidia, microconidia, conidiophore, phialide, vesicle, conidial head, sporangium, sporangiophore และ rhizoids

สำหรับ C. neoformans และ C. gattii ใช้ India ink เพิ่มเติมเพื่อประเมิน encapsulated budding yeast cells และ capsule [3,12] ภาพจุลทรรศน์ถ่ายด้วยกำลังขยายที่เหมาะสมและใส่ scale bar เมื่อสามารถดำเนินการได้ เพื่อสนับสนุนการเปรียบเทียบระหว่าง SDA และ Blood agar และใช้เป็นหลักฐานประกอบผลการศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงพรรณนาประกอบด้วยสี พื้นผิว ขอบ ความนูน สีด้านหลัง และโครงสร้างจุลทรรศน์ โดยนำเสนอเป็นภาพเปรียบเทียบระหว่างอาหารทั้งสองชนิด ข้อมูลเชิงปริมาณประกอบด้วยอัตราการเจริญจากการเพาะซ้ำ 3 เพลทในแต่ละเงื่อนไข รายงานเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การวิเคราะห์เน้นเปรียบเทียบแนวโน้มของอัตราการเจริญร่วมกับความชัดเจนของลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจำแนก เนื่องจากอาหารที่ส่งเสริมการขยายโคโลนีอาจไม่เหมาะต่อการระบุชนิด หาก reverse color, pigment หรือ sporulating structures แสดงไม่ชัดเจน ในทางกลับกัน Blood agar อาจมีคุณค่าเชิงสังเกตเมื่อทำให้ filamentous extensions, mucoid colonies หรือ altered colony architecture เด่นขึ้น

การควบคุมคุณภาพและความคลาดเคลื่อน

เพื่อให้การเปรียบเทียบระหว่าง SDA และ Blood agar มีความสม่ำเสมอ ผู้วิจัยควบคุมอายุของเชื้อ ปริมาณและปริมาตรของ inoculum ชนิดและรุ่นการผลิตของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่ม วิธีการวัดขนาดโคโลนี และสภาวะการถ่ายภาพให้ใกล้เคียงกันสำหรับเชื้อชนิดเดียวกันบนอาหารทั้งสองชนิด การประเมินลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาดำเนินการโดยผู้มีพื้นฐานด้านราวิทยาทางการแพทย์ โดยใช้เกณฑ์การประเมินเดียวกันสำหรับ SDA และ Blood agar

ความปลอดภัยทางชีวภาพ

การเพาะเลี้ยงและจัดการเชื้อราดำเนินการตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพของสถาบัน โดยเฉพาะ filamentous fungi และ rare molds ที่สามารถสร้างสปอร์และแพร่กระจายทางอากาศ การเปิดเพลท การเตรียมสไลด์ และการกำจัดวัสดุปนเปื้อนต้องดำเนินการในพื้นที่และด้วยอุปกรณ์ป้องกันที่เหมาะสม ภายใต้การกำกับของห้องปฏิบัติการที่มีความ

พร้อม และได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพของสถาบันตามข้อกำหนดที่เกี่ยวข้อง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ภาพรวมการเจริญของเชื้อราบน SDA และ Blood agar

เชื้อราก่อโรคในมนุษย์ส่วนใหญ่เจริญได้บนทั้ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) และ Blood agar แต่แตกต่างกันด้านอัตราการเจริญ สีโคโลนี pigment สีด้านหลัง และโครงสร้างจุลทรรศน์ โดยรวม SDA ยังคงเหมาะต่อการประเมินสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะเชื้อราเส้นใยที่ต้องอาศัยสี การสร้างสปอร์ และโครงสร้างจำเพาะในการจำแนก ร่วมกับ direct microscopy [1-2]

อย่างไรก็ตาม พบว่า Blood agar แสดงลักษณะฟีโนไทป์บางประการได้เด่นกว่า เช่น การยืดขยายเป็นเส้นใย (filamentous extension) ของ *Candida albicans*, mucoid colony ของ Cryptococcus gattii และ colony expansion ของ dermatophytes บางชนิด สะท้อนว่าองค์ประกอบของอาหารอาจมีผลต่อ filamentation, capsule-associated appearance, pigmentation และ sporulation [7,13,15,30]

แม้เชื้อส่วนใหญ่เจริญหรือแสดง morphology ได้ชัดกว่าบน SDA แต่ Candida tropicalis, Pichia kudriavzevii, Microsporum canis, Aspergillus niger, Scedosporium spp., Lomentospora prolificans และ Beauveria bassiana เจริญบน Blood agar สูงกว่า SDA ดังสรุปใน Figure 1, Supplementary Figure 1 และ Supplementary Table 1

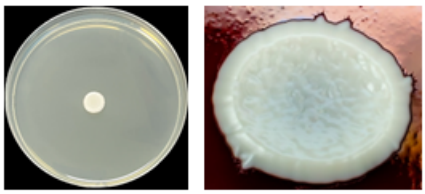
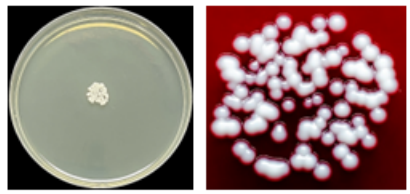
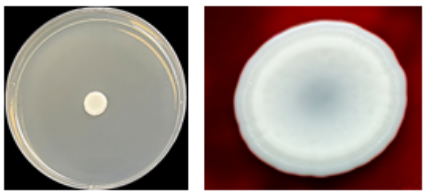
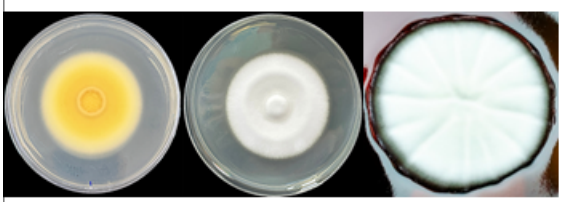
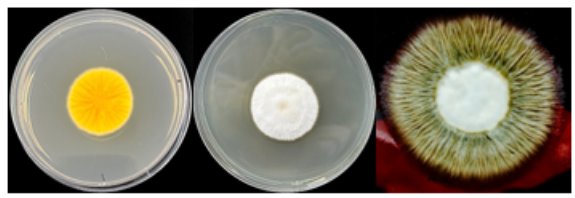
หมายเหตุ: ค่าที่รายงานแสดงเป็นอัตราการเจริญของโคโลนีในหน่วยมิลลิเมตรต่อวัน (mm/day) ยกเว้น *Rhizopus* spp. ซึ่งแสดงเป็นมิลลิเมตรต่อชั่วโมง (mm/hour) เนื่องจากมีการเจริญและแผ่ขยายของโคโลนีอย่างรวดเร็ว การประเมินผลควรพิจารณาอัตราการเจริญควบคู่กับคุณภาพของลักษณะสัณฐานวิทยา เนื่องจากการเจริญที่รวดเร็วบน blood agar ไม่จำเป็นต้องสะท้อนถึงความเหมาะสมที่เหนือกว่าสำหรับการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

เมื่อพิจารณา Figure 1, Supplementary Figure 1 และ Supplementary Table 1 ร่วมกับลักษณะโคโลนีและโครงสร้างจุลทรรศน์ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นสองประเด็นสำคัญ ประการแรก SDA ยังคงเป็นอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมกว่าสำหรับการประเมิน morphology ของเชื้อรา โดยเฉพาะเมื่อการแปลผลต้องอาศัยสีโคโลนี สีด้านหลังโคโลนี รงควัตถุ และโครงสร้างสร้างสปอร์ ประการที่สอง Blood agar มีคุณค่าในฐานะอาหารเลี้ยงเชื้อเสริม เนื่องจากอาจช่วยเผยให้เห็นลักษณะฟีโนไทป์บางประการ เช่น filamentous extension, mucoid colony, altered colony architecture หรือการเจริญที่เพิ่มขึ้นในเชื้อราบางชนิด ดังนั้น Blood agar จึงเหมาะสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือก เพื่อช่วยเสริมในการสังเกตลักษณะจำเพาะของเชื้อราและเพิ่มความแม่นยำในการตรวจยืนยันเท่านั้น มิใช่เพื่อใช้ทดแทน SDA ในการประเมินสัณฐานวิทยาเพื่อการวินิจฉัย

ผลการศึกษาในกลุ่ม Yeasts และ yeast-like fungi

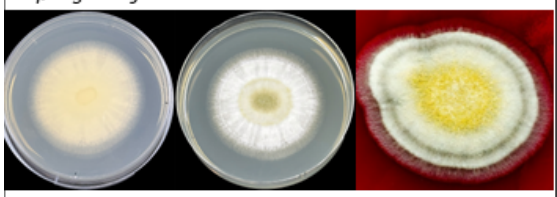
เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้บนทั้ง SDA และ Blood agar แต่แตกต่างกันด้านสี ความมันวาว พื้นผิว ขอบโคโลนี รอยย่น และการสร้าง pseudohyphae หรือ true hyphae สะท้อนว่า Blood agar สามารถปรับเปลี่ยน colony phenotype ได้ แม้ SDA มักให้ลักษณะพื้นฐานที่อ่านผลง่ายกว่า การแปลผลจึงควรพิจารณาร่วมกับความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่างของ yeast โดยเฉพาะ Candida albicans ซึ่งเปลี่ยนได้ระหว่าง yeast, pseudohyphae และ hyphae [5-7]

C. albicans 96901 สายพันธุ์ดื้อต่อ azole ให้โคโลนีขาวอมเทา เรียบ มัน และย่นกลางโคโลนีบน SDA โดยพบ budding yeast cell แต่ไม่เด่นด้าน pseudohyphae ขณะที่ Blood agar ให้โคโลนีขาวครีม

Yeasts / yeast-like fungi	
Candida albicans  SDA Blood agar 1.280±0.1127 mm/day 1.170±0.1347 mm/day Blood agar highlighted foot-like peripheral projections.	*Nakaseomyces glabratus (Candida glabrata)*  SDA Blood agar NR NR Quantitative growth rate was not available; morphology was described qualitatively.
Candida tropicalis  SDA Blood agar 1.383±0.1083 mm/day 1.469±0.1439 mm/day Blood agar showed slight growth enhancement with flower-like colony expansion.	*Pichia kudriavzevii (candida krusei)*  SDA Blood agar 1.358±0.2571 mm/day 2.762±0.2091 mm/day Blood agar markedly enhanced colony expansion and pseudohyphal appearance.
Dermatophytes	
Trichophyton mentagrophytes complex  SDA (reverse) SDA Blood agar 4.418±0.1412 mm/day 2.674±0.1357 mm/day SDA provided higher growth and clearer reverse morphology.	*Microsporum canis*  SDA (reverse) SDA Blood agar 2.393±0.1013 mm/day 3.008±0.1253 mm/day Blood agar increased expansion, but SDA better showed standard morphology.

Hyaline molds

Aspergillus flavus

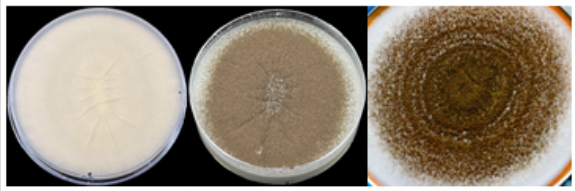


SDA (reverse) SDA Blood agar

15.38±0.3923 mm/day 9.728±0.5195 mm/day

Blood agar supported growth, but SDA showed clearer morphology.

Aspergillus niger



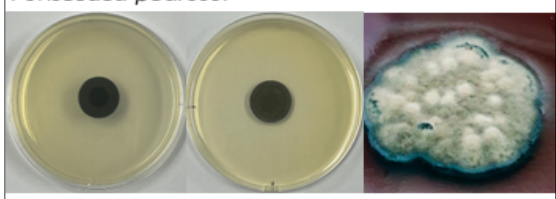
SDA (reverse) SDA Blood agar

5.789±2.189 mm/day 11.78±0.3542 mm/day

Blood agar enhanced growth but may obscure pigment interpretation.

Dematiaceous / thermally dimorphic molds

Fonsecaea pedrosoi

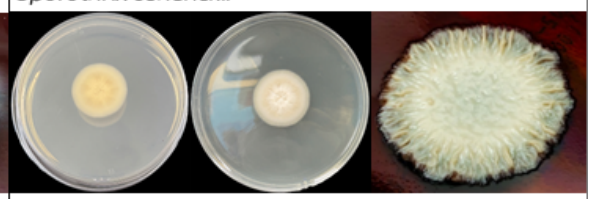


SDA (reverse) SDA Blood agar

1.192±0.1103 mm/day 0.5427±0.04187 mm/day

SDA better supported dematiaceous colony interpretation.

Sporothrix schenckii



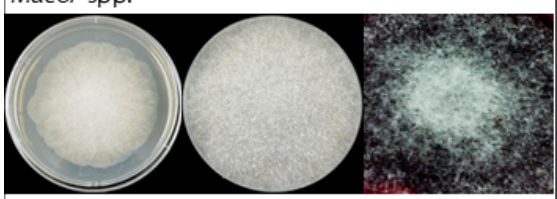
SDA (reverse) SDA Blood agar

1.849±0.06106 mm/day 0.8100±0.04352 mm/day

SDA better supported growth, although conidial arrangement remained observable on Blood agar.

Non-septate / neglected molds / entomopathogenic mold

Mucor spp.

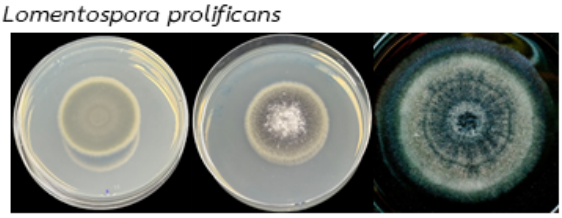


SDA (reverse) SDA Blood agar

9.332±1.222 mm/day 9.756±0.9838 mm/day

Rapid growth occurred on both media; microscopy is required for interpretation.

Lomentospora prolificans



SDA (reverse) SDA Blood agar

2.807±0.06398 mm/day 4.583±0.09019 mm/day

Blood agar increased expansion, but SDA better supports detailed morphology.

Abbreviations: SDA, Sabouraud Dextrose Agar; NR, not reported.

Note: Values are expressed as mm/day, except *Rhizopus* spp., which is expressed as mm/hour because of rapid colony expansion. Growth rate should be interpreted together with morphological quality; faster growth on Blood agar does not necessarily indicate greater diagnostic suitability.

Figure 1 Comparative growth rates of human pathogenic fungi on Sabouraud Dextrose Agar and Blood agar

และพบ pseudohyphae มากขึ้น อัตราการเจริญบน SDA และ Blood agar เท่ากับ 1.217±0.1528 และ 0.9650±0.06602 มิลลิเมตร/วัน ตามลำดับ จึงชี้ว่า SDA ส่งเสริมการขยายโคโลนี แต่ Blood agar อาจกระตุ้น filamentous phenotype มากกว่า ส่วน C. albicans 90028 สายพันธุ์ไวต่อ azole ให้โคโลนีขาว ผิวเรียบ และมีวงซ้อนบน SDA แต่บน Blood agar ผิวแห้งหยาบ และขอบขรุขระขึ้น โดยพบ budding yeast cell และ pseudohyphae บนทั้งสองอาหาร อัตราการเจริญเท่ากับ 1.521±0.06141 และ 1.038±0.2609 มิลลิเมตร/วัน ตามลำดับ C. albicans อีกสายพันธุ์หนึ่งเจริญบน SDA เร็วกว่าเล็กน้อย (1.280±0.1127 เทียบกับ 1.170±0.1347 มิลลิเมตร/วัน) แต่ Blood agar ทำให้เกิด foot-like projections และพบ pseudohyphae เด่นกว่า ซึ่งเป็นลักษณะเสริมที่มีคุณค่าเชิงสังเกต

Nakaseomyces glabratus (Candida glabrata) ให้โคโลนีและ budding yeast cell ขนาดเล็กบนทั้งสองอาหาร โดยไม่สร้าง pseudohyphae เด่นชัด จึงแตกต่างจาก C. albicans อย่างชัดเจน Candida tropicalis ให้โคโลนีขนาดใหญ่และ pseudohyphae จำนวนมากบน SDA ส่วน Blood agar ทำให้เกิดลักษณะคล้ายกลีบดอกไม้และให้อัตราการเจริญสูงกว่าเล็กน้อย (1.469±0.1439 เทียบกับ 1.383±0.1083 มิลลิเมตร/วัน) Pichia kudriavzevii (Candida krusei) แตกต่างเด่นที่สุด โดย Blood agar ให้โคโลนีเป็นวงซ้อน ขอบหยัก pseudohyphae ยาว และอัตราการเจริญ 2.762±0.2091 มิลลิเมตร/วัน สูงกว่า SDA ที่ 1.358±0.2571 มิลลิเมตร/วัน สะท้อนการส่งเสริมทั้ง growth และ filamentous phenotype

Candida parapsilosis เจริญบน SDA สูงกว่า Blood agar (1.120±0.1108 เทียบกับ 0.9183±0.1228 มิลลิเมตร/วัน) และพบ pseudohyphae เด่นบน SDA แต่ไม่เด่นบน Blood agar แสดงว่าผลของอาหารต่อ morphology จำเพาะต่อ species หรือ isolate ขณะที่ Lodderomyces elongisporus ให้ budding yeast cell บนทั้งสองอาหาร แต่ SDA สนับสนุนการเจริญชัดเจนกว่า (1.375±0.6014 เทียบกับ 0.4967±0.3321 มิลลิเมตร/วัน)

ใน *Cryptococcus* spp. อาหารมีผลเด่นต่อความมันและความเป็นเมือกของโคโลนี C. neoformans ให้ encapsulated budding yeast cells บนทั้งสองอาหาร ส่วน C. gattii ให้โคโลนีเทา มันวาว และเยิ้มบน Blood agar แม้อัตราการเจริญต่ำกว่า SDA (0.720±1.227 เทียบกับ 1.002±0.6349 มิลลิเมตร/วัน) ลักษณะ mucoid ดังกล่าวจึงมีคุณค่าในการสังเกตลักษณะฟีโนไทป์ที่สัมพันธ์กับ capsule [11,13] Trichosporon asahii สร้าง budding yeast cell, pseudohyphae และ true hyphae บนทั้งสองอาหาร โดย SDA ให้การเจริญสูงกว่าเล็กน้อย (1.775±0.1282 เทียบกับ 1.594±0.4555 มิลลิเมตร/วัน) แต่ Blood agar ทำให้โคโลนีเหลือง แห้ง ขรุขระ และคล้ายราเส้นใย ช่วยสะท้อนความเป็น polymorphic yeast-like fungus [15]

Malassezia furfur แสดงข้อจำกัดของอาหารทั่วไปอย่างชัดเจน โดยเจริญต่ำมากบน SDA (0.05643±0.1297 มิลลิเมตร/วัน) ไม่เจริญบน Blood agar และเจริญสูงสุดบน modified Dixon agar (0.9276±0.5894 มิลลิเมตร/วัน) ยืนยันว่าเชื้อที่ต้องการ lipid ควรประเมินด้วยอาหารเฉพาะ [24-26]

โดยรวม SDA ส่งเสริมการเจริญของ yeast ส่วนใหญ่ ขณะที่ Blood agar ช่วยเผยให้เห็นลักษณะเสริมสำคัญ ได้แก่ foot-like projections ของ *C. albicans,* colony pattern ของ *C. tropicalis,* growth และ pseudohyphae ของ *P. kudriavzevii,* mucoid phenotype ของ *C. gattii* และ yeast-like mold phenotype ของ *T. asahii* จึงเหมาะเป็นอาหารเสริม ไม่ใช่อาหารทดแทน SDA ลักษณะตัวแทนเหล่านี้ รวมถึงข้อจำกัดในเชื้อที่ต้องการ lipid-enriched medium

ผลการศึกษาในกลุ่ม Dermatophytes

การจำแนก dermatophytes อาศัยสีด้านหน้าและด้านหลัง ลักษณะเส้นใย ตลอดจน microconidia และ macroconidia ผลการศึกษาพบว่า SDA ให้ colony morphology และ reverse pigment ชัดกว่า Blood agar โดยรวม สอดคล้องกับหลักการวินิจฉัยที่ต้องพิจารณาลักษณะมหภาคและจุลทรรศน์ร่วมกัน [16-17]

Trichophyton mentagrophytes complex บน SDA ให้โคโลนีขาว cottony มีวงซ้อนและ reverse สีเหลือง พร้อม microconidia รูปหยดน้ำเรียงคล้ายพวงองุ่น ขณะที่ Blood agar ทำให้เกิดร่องรัศมี แต่ reverse color ไม่ชัด อัตราการเจริญบน SDA สูงกว่า Blood agar (4.418±0.1412 เทียบกับ 2.674±0.1357 มิลลิเมตร/วัน) T. rubrum complex ให้โคโลนีขาว cottony และ reverse สีเหลืองถึงน้ำตาลอ่อนบน SDA ส่วน Blood agar ให้ผิวกำมะหยี่แต่ไม่เห็น pigment ด้านหลังชัดเจน โดยเจริญ 3.778±0.1898 และ 3.156±0.4818 มิลลิเมตร/วัน ตามลำดับ

Microsporum canis เป็นข้อยกเว้นที่ Blood agar ให้การเจริญสูงกว่า SDA (3.008±0.1253 เทียบกับ 2.393±0.1013 มิลลิเมตร/วัน) แต่ SDA ยังแสดงโคโลนีฟูคล้ายขนแมว reverse สีเหลือง และ macroconidia รูปกระสวย ผนังหนา ผิวขรุขระ ได้เหมาะสมกว่า Nannizzia gypsea เจริญบน SDA สูงกว่า Blood agar (6.220±0.2736 เทียบกับ 4.872±0.4744 มิลลิเมตร/วัน) และให้ reverse สีเหลืองชัด แม้ Blood agar อาจพบ macroconidia มากกว่าในบางมุม

ดังนั้น SDA ยังคงเหมาะเป็นอาหารหลักสำหรับ dermatophytes โดยเฉพาะการประเมิน reverse pigment ส่วน Blood agar มีประโยชน์เสริมต่อการเห็น radial growth หรือ macroconidia บางชนิด แต่ไม่ควรใช้แทน SDA

ผลการศึกษาในกลุ่ม Hyaline molds

SDA ให้สีโคโลนี reverse color และโครงสร้างสร้างสปอร์ชัดกว่า Blood agar ในเชื้อส่วนใหญ่ ซึ่งมีความสำคัญต่อการประเมิน conidial head, conidiophore, vesicle, phialide, conidia และ macroconidia ร่วมกับ direct microscopy [3-4,18-19]

Aspergillus fumigatus ให้โคโลนีเขียวอมเทาขอบขาว และหัวสปอร์แบบ columnar บน SDA โดยเจริญสูงกว่า Blood agar อย่างมาก (11.38±0.7787 เทียบกับ 2.378±0.2038 มิลลิเมตร/วัน) A. flavus ให้โคโลนีเหลืองอมเขียวและหัวสปอร์แบบ radiate โดย SDA ยังให้การเจริญและ reverse morphology ดีกว่า (15.38±0.3923 เทียบกับ 9.728±0.5195 มิลลิเมตร/วัน) ตรงกันข้าม A. niger เจริญบน Blood agar สูงกว่า SDA (11.78±0.3542 เทียบกับ 5.789±2.189 มิลลิเมตร/วัน) แต่สีพื้นและการเปลี่ยนสีของอาหารรบกวนการแปลผล pigment และ reverse color

Penicillium spp. เจริญบน SDA สูงกว่า Blood agar (3.756±0.08120 เทียบกับ 2.733±0.3254 มิลลิเมตร/วัน) และแสดง conidiophore รูปแปรงชัด ขณะที่ Blood agar แม้รองรับการเจริญ แต่ไม่พบโครงสร้างดังกล่าวเด่นชัด แสดงว่า “การเจริญได้” ไม่เท่ากับ “เหมาะต่อการจำแนกชนิด” Fusarium spp. เจริญใกล้เคียงกันบน SDA และ Blood agar (10.04±0.1777 และ 9.815±0.4028 มิลลิเมตร/วัน) และพบ macroconidia รูปพระจันทร์เสี้ยว แต่ SDA ให้ reverse color และภาพรวมโคโลนีชัดกว่า

โดยสรุป Blood agar อาจส่งเสริม growth ของ hyaline mold บางชนิด โดยเฉพาะ A. niger แต่ SDA เหมาะกว่าสำหรับการอ่าน pigment, reverse morphology และ sporulating structures ซึ่งเป็นหัวใจของการจำแนกเชื้อราเส้นใย

ผลการศึกษาในกลุ่ม Dematiaceous molds และ Thermally dimorphic molds

SDA เหมาะกว่า Blood agar ทั้งด้านอัตราการเจริญและความชัดเจนของ pigment เนื่องจากการประเมินเชื้อกลุ่มนี้พึ่งพาสีเข้มของโคโลนี reverse color และโครงสร้างจุลทรรศน์จำเพาะ ขณะที่สีพื้นของ Blood agar ลดความชัดเจนของลักษณะดังกล่าว [20-21]

Fonsecaea pedrosoi ให้โคโลนีดำ ผิวกำมะหยี่ reverse สีดำ และ conidiophore แตกแขนงบน SDA โดยเจริญสูงกว่า Blood agar (1.192±0.1103 เทียบกับ 0.5427±0.04187 มิลลิเมตร/วัน) Cladosporium spp. ให้โคโลนีเขียวอมเทาถึงเขียวเข้มบน SDA และเจริญสูงกว่า Blood agar (3.152±0.1355 เทียบกับ 1.931±0.1329 มิลลิเมตร/วัน) ซึ่งยืนยันข้อจำกัดของ Blood agar ต่อการสังเกต pigment และ colony architecture

Talaromyces marneffei เจริญบน SDA สูงกว่า Blood agar อย่างชัดเจน (5.044±0.3952 เทียบกับ 0.4665±0.08596 มิลลิเมตร/วัน) จึงไม่ควรใช้ Blood agar เป็นอาหารหลักในการประเมินเชื้อสำคัญทางคลินิกชนิดนี้ Sporothrix schenckii ให้โคโลนีครีมกำมะหยี่ และ conidia รวมเป็นช่อดอกไม้บน SDA ส่วน Blood agar ให้โคโลนีแบน ย่น และเป็นเมือก แม้ยังพบโครงสร้างจุลทรรศน์ได้ แต่อัตราการเจริญต่ำกว่า SDA (0.8100±0.04352 เทียบกับ 1.849±0.06106 มิลลิเมตร/วัน)

ผลดังกล่าวยืนยันว่า Blood agar ใช้สังเกตลักษณะเสริมได้ แต่ไม่เหมาะเป็นอาหารหลักเมื่อ pigment, reverse color และ colony morphology เป็นองค์ประกอบสำคัญของการแปลผล

ผลการศึกษาในกลุ่ม Non-septate molds, Neglected molds และ Entomopathogenic mold

เชื้อกลุ่มนี้มีการเจริญหลากหลายและมีความสำคัญทางคลินิก โดยเฉพาะ Mucorales, Scedosporium spp. และ Lomentospora prolificans ซึ่งเกี่ยวข้องกับ opportunistic และ rare mold infections [2,18,22-23] การตรวจพบอย่างรวดเร็วจึงสำคัญต่อการจัดการผู้ป่วย [20-21]

Mucor spp. เจริญรวดเร็วและใกล้เคียงกันบน SDA กับ Blood agar (9.332±1.222 และ 9.756±0.9838 มิลลิเมตร/วัน) แต่การจำแนกต้องพิจารณา non-septate หรือ pauci-septate hyphae และ sporangial structures ร่วมด้วย Rhizopus spp. เจริญบน SDA สูงกว่า Blood agar (3.888±0.1483 เทียบกับ 2.166±0.2660 มิลลิเมตร/ชั่วโมง) และต้องอาศัย sporangiophore, sporangium และ rhizoids ในการแยกชนิด

Blood agar ส่งเสริมการเจริญของ neglected molds หลายชนิด ได้แก่ *Scedosporium apiospermum* (6.230±0.1855 เทียบกับ 2.804±0.06034 มิลลิเมตร/วัน), *S. boydii* (6.521±0.2506 เทียบกับ 4.785±0.1243 มิลลิเมตร/วัน) และ *Lomentospora prolificans* (4.583±0.09019 เทียบกับ 2.807±0.06398 มิลลิเมตร/วัน) เมื่อเทียบกับ SDA แม้ S. boydii จะสร้าง conidia จำนวนมากภายใต้เงื่อนไขที่สังเกต แต่การจำแนกทุกชนิดยังต้องอาศัย colony morphology, conidia, conidiogenous cells และการตรวจยืนยันเพิ่มเติม จึงควรเพาะต่อบนอาหารสำหรับเชื้อรา

Beauveria bassiana ให้โคโลนีขาว หนานุน และย่นคล้ายกลีบดอกไม้บน SDA ส่วน Blood agar ให้โคโลนีแบนคล้ายผงแป้งและเจริญสูงกว่า (5.116±0.2304 เทียบกับ 2.837±0.06615 มิลลิเมตร/วัน) อย่างไรก็ตาม SDA แสดง colony architecture และ reverse color เหมาะต่อการบรรยาย morphology มากกว่า

โดยสรุป Blood agar ให้ growth advantage ใน Scedosporium spp., L. prolificans และ B. bassiana แต่ growth ที่เร็วหรือกว้างกว่าไม่ได้รับประกัน

ความชัดเจนของ pigment, reverse color, colony architecture หรือ microscopic morphology ความแตกต่างระหว่าง “growth advantage” กับ “diagnostic suitability” จึงเป็นข้อพิจารณาสำคัญ และสนับสนุนให้ใช้ Blood agar เป็นอาหารเสริม ขณะที่ SDA ยังคงเป็นอาหารมาตรฐานสำหรับการจำแนกเชื้อราโดยรวม

สรุปแนวโน้มของผลการศึกษา

เมื่อรวบรวมผลจากเชื้อราทุกกลุ่ม พบว่า SDA ยังคงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ความชัดเจนของ morphology โดยรวมดีที่สุด โดยเฉพาะการสังเกต pigment, reverse color, colony architecture และโครงสร้างสร้างสปอร์ในเชื้อกลุ่ม mold อย่างไรก็ตาม Blood agar ยังมีคุณค่าเชิงเสริม เนื่องจากเชื้อราบางชนิดแสดงการเจริญที่สูงกว่า SDA หรือแสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่เด่นขึ้นในบางมิติ เช่น filamentous extension, mucoid colony, colony expansion และ altered surface texture ขณะเดียวกัน สีพื้นและลักษณะของ Blood agar อาจรบกวนการอ่าน pigment หรือ reverse morphology ในเชื้อราบางกลุ่ม ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนแนวคิดว่า Blood agar ควรถูกตีความเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือกเพื่อช่วยเสริมในการสังเกตลักษณะจำเพาะของเชื้อราและเพิ่มความแม่นยำในการตรวจยืนยันเท่านั้น มากกว่าการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแทน SDA

เพื่อให้การแปลผลมีความชัดเจนในเชิงปฏิบัติ ใน Supplementary Table 1 สรุป phenotypic signatures สำคัญที่พบเมื่อเชื้อราเจริญบน Blood agar เปรียบเทียบกับ SDA พร้อมคุณค่าที่อาจนำไปใช้ในการสังเกต การเรียนการสอน และข้อควรระวังในการแปลผลทางห้องปฏิบัติการ ตารางนี้จึงทำหน้าที่เป็นกรอบการอ่านผลเชิงเปรียบเทียบ โดยเน้นว่า Blood agar สามารถให้ข้อมูลเสริมบางประการ แต่ไม่ควรถูกใช้แทน SDA ในฐานะอาหารมาตรฐานสำหรับการประเมิน morphology ของเชื้อรา

อภิปรายผล

การศึกษานี้ยืนยันว่า Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ยังคงเป็นอาหารมาตรฐานสำหรับศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ เนื่องจากแสดงการเจริญ สีโคโลนี สีด้านหลัง และโครงสร้างจุลทรรศน์ได้ชัดเจน โดยเฉพาะเชื้อที่ต้องอาศัย pigment, reverse morphology และ sporulating structures ในการจำแนก แม้มีเทคโนโลยีวินิจฉัยสมัยใหม่ การเพาะเลี้ยงร่วมกับ direct microscopy และการประเมิน morphology ยังจำเป็นต่อการตรวจคัดกรองและแปลผลเบื้องต้น [3-4]

การศึกษานี้ไม่ได้เสนอให้ Blood agar ทดแทน SDA แต่แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ซึ่งใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกสามารถแสดงให้เห็นฟีโนไทป์บางประการของเชื้อราได้ เชื้อราอาจเจริญบน Blood agar โดยไม่ใช่เป้าหมายหลักของการตรวจ หากผู้ปฏิบัติงานไม่ทราบว่าลักษณะดังกล่าวอาจแตกต่างจาก SDA อาจมองข้ามหรือแปลผลคลาดเคลื่อนได้ ข้อมูลเปรียบเทียบนี้จึงมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยเบื้องต้นและการเรียนการสอน ผลโดยรวมสนับสนุนหลักการว่า “การเจริญได้” ไม่เท่ากับ “เหมาะต่อการวินิจฉัย” เชื้อบางชนิดเจริญบน Blood agar ได้เร็วกว่า แต่ pigment, reverse color หรือโครงสร้างสร้างสปอร์ไม่ชัดเจน ขณะที่บางชนิดเจริญช้ากว่าแต่แสดง pseudohyphae, foot-like projections, mucoid colony หรือ altered colony architecture เด่นขึ้น จึงควรประเมินทั้งอัตราการเจริญและคุณภาพของ morphology ไม่ควรใช้ขนาดโคโลนีเพียงอย่างเดียว

ในกลุ่ม yeast, Blood agar ทำให้เห็นความแปรผันของ colony morphology โดย *Candida albicans* บางสายพันธุ์แสดง foot-like projections และ pseudohyphae มากขึ้น แม้ SDA ให้การเจริญสูงกว่า สอดคล้องกับความสามารถในการเปลี่ยนระหว่าง yeast, pseudohyphae และ hyphae [5-7] อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้พิสูจน์กลไกระดับโมเลกุล จึงควร

สรุปเพียงว่า Blood agar เอื้อต่อการสังเกต filamentous phenotype ในบางสายพันธุ์ *Candida tropicalis* และ *Pichia kudriavzevii* เจริญหรือแสดง pseudohyphae เด่นขึ้นบน Blood agar ขณะที่ *Candida parapsilosis* และ *Lodderomyces elongisporus* เจริญดีกว่าบน SDA สะท้อนว่าอิทธิพลของอาหารอาจจำเพาะต่อ species หรือ isolate การระบุชนิดจึงต้องใช้วิธีมาตรฐานและการทดสอบความไวต่อยาร่วมด้วย [8-10,29]

Cryptococcus gattii ให้โคโลนีมันวาวและ mucoid ชัดบน Blood agar แม้เจริญต่ำกว่า SDA ลักษณะดังกล่าวอาจสัมพันธ์กับ capsule [11-14] แต่เนื่องจากไม่ได้วัดความหนาของ capsule จึงไม่อาจสรุปว่า Blood agar เพิ่มการสร้าง capsule ส่วน Trichosporon asahii แสดงโคโลนีแห้ง ขรุขระ และคล้ายราเส้นใยมากขึ้น สอดคล้องกับความเป็น yeast-like fungus [15] ขณะที่ Malassezia furfur เจริญดีที่สุดบน modified Dixon agar ยืนยันว่าเชื้อที่ต้องการ lipid จำเป็นต้องใช้อาหารจำเพาะ [24-26]

ในกลุ่ม dermatophytes, SDA เหมาะกว่าสำหรับประเมินสีด้านหน้า reverse pigment พื้นผิวโคโลนี และ microconidia หรือ macroconidia โดย Trichophyton mentagrophytes complex, T. rubrum complex และ Nannizzia gypsea ให้ลักษณะสำคัญบน SDA ชัดกว่า แม้ Microsporum canis เจริญบน Blood agar ได้เร็วกว่า แต่ SDA ยังคงเหมาะต่อการอ่าน diagnostic morphology โดยรวม [17]

ในกลุ่ม hyaline molds, SDA ให้สีโคโลนี reverse morphology และ conidial structures ชัดกว่าใน Aspergillus fumigatus, A. flavus, Penicillium spp. และ Fusarium spp. [3-4,19] Aspergillus niger เป็นข้อยกเว้นที่เจริญบน Blood agar สูงกว่า แต่สีพื้นและการเปลี่ยนสีของอาหารอาจรบกวนการแปลผล pigment ส่วน Penicillium spp. แสดงให้เห็นชัดว่า แม้เชื้อเจริญได้บน Blood agar แต่ conidiophore รูปแปรงอาจไม่เด่น จึงไม่เหมาะต่อการจำแนกด้วยอาหารชนิดนี้เพียงอย่างเดียว

ในกลุ่ม dematiaceous และ thermally dimorphic molds, Blood agar มีข้อจำกัดมากขึ้น เพราะการจำแนกต้องอาศัย pigment, reverse morphology และโครงสร้างจำเพาะ Fonsecaea pedrosoi, Cladosporium spp., Talaromyces marneffei และ Sporothrix schenckii โดยรวมให้การเจริญหรือ morphology บน SDA ชัดกว่า โดยเฉพาะ T. marneffei ซึ่งเจริญบน Blood agar ต่ำมาก จึงควรใช้อาหารสำหรับเชื้อราและสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

สำหรับ non-septate, neglected และ entomopathogenic molds, Blood agar สนับสนุนการเจริญของ Scedosporium apiospermum, S. boydii, Lomentospora prolificans และ Beauveria bassiana ได้ดี แต่การระบุชนิดยังต้องอาศัย colony architecture, conidia, conidiogenous cells และการตรวจยืนยันเพิ่มเติม [20-21] ส่วน Mucor spp. และ Rhizopus spp. ต้องพิจารณา hyphae, sporangium, sporangiophore และ rhizoids ไม่ควรอาศัยความเร็วหรือความฟูของโคโลนีเพียงอย่างเดียว [22-23]

ผลการศึกษามีคุณค่าต่อการเรียนการสอน เพราะแสดงว่า morphology ของเชื้อราเปลี่ยนแปลงตามอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยลดการจดจำภาพมาตรฐานแบบตายตัวและส่งเสริมการคิดเชิงเปรียบเทียบ [27-28] ในทางปฏิบัติ เมื่อพบโคโลนีที่สงสัยเชื้อราบน Blood agar ควรบันทึกลักษณะเบื้องต้น แล้ว subculture ไปยัง SDA หรืออาหารจำเพาะ พร้อมตรวจ microscopic morphology ก่อนสรุปผล

ข้อจำกัดของการศึกษา ได้แก่ ความคลาดเคลื่อนของ inoculum จากการจับกลุ่มของเซลล์หรือชิ้นส่วนเส้นใย ความแปรปรวนจากการปิเปต ความชื้นผิวอาหาร ระยะเวลาบ่ม lot ของอาหาร และการประเมิน morphology ที่ขึ้นกับผู้ตรวจ รวมทั้งสีพื้นของ Blood agar ที่รบกวนการอ่าน pigment การศึกษาต่อไปควร

เพิ่มจำนวน isolates ประเมินภาพถ่ายเชิงปริมาณ และเปรียบเทียบกับอาหารจำเพาะอื่น เพื่อจำแนกความแตกต่างระดับ species และ isolate ให้ชัดเจนขึ้น [24-26]

โดยสรุป SDA ยังคงเป็นอาหารมาตรฐานสำหรับศึกษาสัณฐานวิทยา ส่วน Blood agar มีบทบาทเป็นอาหารเสริมที่ช่วยแสดงให้เห็นphenotypic plasticity ของเชื้อบางชนิด การเข้าใจความแตกต่างระหว่าง growth advantage และ diagnostic suitability จะช่วยให้การอ่านผลเชื้อราบนอาหารที่ใช้ในงานประจำมีความแม่นยำและสอดคล้องกับชีววิทยาของเชื้อมากขึ้น

4. สรุป

การศึกษานี้ยืนยันว่า Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ยังคงเป็นอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดสำหรับประเมินสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ เนื่องจากแสดงการเจริญ สีโคโลนี สีด้านหลัง pigment และโครงสร้างจุลทรรศน์ได้ชัดเจน โดยเฉพาะในกลุ่ม dermatophytes, hyaline molds, dematiaceous molds และ thermally dimorphic molds ซึ่งต้องอาศัยลักษณะดังกล่าวในการจำแนกเชื้อ

อย่างไรก็ตาม Blood agar ไม่ได้มีบทบาทเฉพาะต่อการเพาะแบคทีเรีย เนื่องจากเชื้อราหลายชนิดสามารถเจริญและแสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่มีคุณค่าเชิงสังเกตบนอาหารชนิดนี้ เช่น foot-like projections ของ Candida albicans, mucoid colony ของ Cryptococcus gattii, colony pattern ของ Candida tropicalis และ pseudohyphae ของ Pichia kudriavzevii นอกจากนี้ Microsporum canis, Aspergillus niger, Scedosporium spp., Lomentospora prolificans และ Beauveria bassiana ยังเจริญบน Blood agar ได้สูงกว่า SDA ผลดังกล่าวสนับสนุนให้ใช้ Blood agar เป็น supplementary observational medium สำหรับศึกษาความยืดหยุ่นของลักษณะฟีโนไทป์แต่ไม่ควรใช้แทน SDA ในฐานะ standard morphology medium

ข้อค้นพบสำคัญคือ “การเจริญได้” ไม่เท่ากับ “เหมาะต่อการวินิจฉัย” เชื้อบางชนิดอาจเจริญบน Blood agar ได้เร็วกว่า แต่ reverse pigment, colony architecture หรือโครงสร้างสปอร์ไม่ชัดเจนเพียงพอ ขณะที่บางชนิดเจริญช้ากว่าแต่แสดงลักษณะเฉพาะที่มีประโยชน์ต่อการสังเกต ดังนั้น การประเมินอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องพิจารณาทั้งอัตราการเจริญและคุณภาพของ morphology ซึ่งเมื่อพบเชื้อราเจริญบน Blood agar จึงควรบันทึกลักษณะเบื้องต้นที่พบและเพาะเลี้ยงบน SDA หรืออาหารจำเพาะสำหรับเชื้อราก่อนสรุปผลการวินิจฉัย

ข้อเสนอแนะ

ควรใช้ SDA เป็นอาหารหลักเมื่อต้องประเมิน pigment, reverse colony, conidial structures, macroconidia, microconidia, conidiophore, phialide, vesicle, sporangium หรือ rhizoid หากพบเชื้อราบน Blood agar ไม่ควรระบุชนิดจากอาหารนี้เพียงอย่างเดียว แต่ควร subculture และตรวจ microscopic morphology เพิ่มเติม [3-4]

ในกรณีของ yeast อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar สามารถใช้ในการสังเกต colony texture, filamentous extension, pseudohyphae และ mucoid phenotype แต่การจำแนกชนิดจำเป็นต้องยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน โดยเฉพาะ Candida spp. และ Cryptococcus spp. [9,11,29] ส่วน Malassezia furfur และเชื้อที่ต้องการสารอาหารจำเพาะควรเพาะบนอาหารที่มี lipid enrichment เช่น modified Dixon agar [24-26] ขณะที่เชื้อราในกลุ่ม dermatophytes, dematiaceous molds, dimorphic molds และ rare molds จำเป็นต้องพิจารณาอย่างระมัดระวังเป็นพิเศษ เพราะสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar มีผลต่อการสังเกต pigment และ reverse morphology [21-22,30]

การประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการและการเรียนการสอน ผลการศึกษานี้ช่วยเตือนผู้ปฏิบัติงานไม่ให้มอง

ข้ามโคโลนีเชื้อราบน Blood agar โดยเฉพาะโคโลนีที่ฟูเป็นผง มีเส้นใย มันวาว เป็นเมือก หรือเปลี่ยนสีอาหาร หากพบ yeast-like colony ควรตรวจ budding yeast cell, pseudohyphae, capsule หรือ arthroconidia ส่วน mold ควรเพาะเลี้ยงบน SDA หรืออาหารเฉพาะ และตรวจโครงสร้างจุลทรรศน์ก่อนระบุชนิด อีกทั้งควรพัฒนา comparative diagnostic guide ที่แสดงภาพด้านหน้า ด้านหลัง และภาพจุลทรรศน์ของเชื้อชนิดเดียวกันบน SDA และ Blood agar พร้อมระบุข้อสังเกตอาหารที่ควรใช้เพาะเลี้ยง และลักษณะที่ไม่ควรใช้สรุปชนิดของเชื้อ วิธีดังกล่าวจะลดการจดจำภาพแบบตายตัว ส่งเสริมการคิดเชิงวิเคราะห์ และทำให้ผลการศึกษาเป็นเครื่องมือที่ใช้ได้จริงทั้งในห้องปฏิบัติการและห้องเรียน [27-28]

ข้อจำกัดของการศึกษา

การเตรียม inoculum อาจคลาดเคลื่อนจากการจับกลุ่มของเซลล์ pseudohyphae หรือชิ้นส่วนเส้นใย โดยเฉพาะเชื้อราเส้นใยที่ควบคุมจำนวนหน่วยเชื้อได้ยาก [3-4] การหยอดเชื้อปริมาตรน้อยยังอาจได้รับผลจากการปิเปต ความสม่ำเสมอของ suspension ตำแหน่งหยอด และความชื้นผิวอาหาร ทำให้ขนาดโคโลนีสะท้อนทั้งการเจริญและการแผ่กระจาย

การประเมินสี ความฟู ความย่น ความมัน และ pigment มีลักษณะเชิงคุณภาพ จึงอาจแปรผันตามประสบการณ์ผู้ประเมิน แสง ระยะเวลาบ่ม และ lot ของอาหาร นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังไม่ได้ตรวจกลไกระดับชีวเคมีหรือโมเลกุลที่ทำให้ลักษณะฟีโนไทป์แตกต่างกันบน Blood agar จึงไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์เชิงเหตุและผลโดยตรง

อีกทั้งจำนวน isolate ต่อชนิดที่นำมาศึกษายังมีจำกัด โดยเฉพาะเชื้อที่ให้ผลเด่น ได้แก่ P. kudriavzevii, C. tropicalis, M. canis, A. niger, S. apiospermum, S. boydii, L. prolificans และ B. bassiana การศึกษาต่อไปควรเพิ่มจำนวน isolate ใช้ผู้ประเมินมากกว่าหนึ่งคน และพัฒนาการวิเคราะห์ภาพเชิงปริมาณ เพื่อแยกความแตกต่างระดับ species และ isolate ให้ชัดเจนขึ้น [1]

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และนิสิตนักศึกษาที่มีส่วนร่วมในการเตรียมเชื้อ การเพาะเลี้ยง การบันทึกผล การถ่ายภาพ และการตรวจลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตลอดจนผู้ให้คำแนะนำด้านราวิทยาทางการแพทย์ซึ่งช่วยให้การวิเคราะห์และการอภิปรายผลมีความสมบูรณ์มากขึ้น

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้นิพนธ์ขอรับรองว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษานี้

แหล่งทุน

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) (ข้อตกลงเลขที่ สวรส.69-137) และงบประมาณสนับสนุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา “งบประมาณเงินอุดหนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ปีงบประมาณ พ.ศ. 2569” เลขที่สัญญา วน.2.66/2569

ข้อพิจารณาทางจริยธรรมและความปลอดภัยทางชีวภาพ

การศึกษานี้ใช้เชื้อราที่เก็บรักษาไว้เพื่อการเรียนการสอนและการวิจัย โดยไม่มีการเก็บสิ่งส่งตรวจใหม่จากผู้ป่วย ข้อมูลส่วนบุคคล หรือข้อมูลที่สามารถระบุตัวบุคคลได้ การเพาะเลี้ยง การเตรียม fungal suspension การตรวจลักษณะทางมหภาคและจุลทรรศน์ และการกำจัดวัสดุปนเปื้อนดำเนินการภายใต้มาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพของคณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล และอยู่ภายใต้โครงการที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน (Institutional Biosafety Committee; IBC) หมายเลข TM2026-022 กิจกรรมที่ดำเนินการในการศึกษานี้ไม่มีการเพิ่มชนิดของ biological agents หรือขั้นตอนที่เพิ่มระดับความเสี่ยงทางชีวภาพนอกเหนือจากขอบเขตที่ได้รับการรับรอง

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Donnelly, J.P., Chen, S. C., Kauffman, C.A., Steinbach, W.J., Baddley, J.W., Verweij, P.E., Clancy, C.J., Wingard, J.R., Lockhart, S.R., Groll, A.H., Sorrell, T.C., Bassetti, M., Akan, H., Alexander, B.D., Andes, D., Azoulay, E., Bialek, R., Bradsher, R.W., Bretagne, S., Calandra, T., Caliendo, A.M., Castagnola, E., Cruciani, M., Cuenca-Estrella, M., Decker, C.F., Desai, S.R., Fisher, B., Harrison, T., Heussel, C.P., Jensen, H.E., Kibbler, C.C., Kontoyiannis, D.P., Kullberg, B.J., Lagrou, K., Lamoth, F., Lehrnbecher, T., Loeffler, J., Lortholary, O., Maertens, J., Marchetti, O., Marr, K.A., Masur, H., Meis, J.F., Morrisey, C.O., Nucci, M., Ostrosky-Zeichner, L., Pagano, L., Patterson, T.F., Perfect, J.R., Racil, Z., Roilides, E., Ruhnke, M., Prokop, C.S., Shoham, S., Slavin, M.A., Stevens, D.A., Thompson, G.R., Vazquez, J.A., Viscoli, C., Walsh, T.J., Warris, A., Wheat, L.J., White, P.L., Zaoutis, T.E. and Pappas, P. G., 2020, Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium, Clin. Infect. Dis. 71(6): 1367-76. https://doi.org/10.1093/cid/ciz1008.

[2] Bupha-Intr, O., Butters, C., Reynolds, G., Kennedy, K., Meyer, W., Patil, S., Bryant, P., Morrissey, C. O., and Australasian Antifungal Guidelines Steering Committee, 2021, Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive fungal disease due to moulds other than *Aspergillus* in the haematology/oncology setting, Intern. Med. J. 51 Suppl 7: 177-219. https://doi.org/10.1111/imj.15592.

[3] Knoll, M.A., Steixner, S., Lass-Flörl, C., 2023, How to use direct microscopy for diagnosing fungal infections, Clin. Microbiol. Infect. 29(8): 1031-8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.05.012.

[4] Borman, A.M., Mohammed, S., Palmer, M.D., Childs, N. and Johnson, E.M., 2022, The importance of appropriate processing and direct microscopic examination for the timely diagnosis and management of invasive infections caused by filamentous fungi, Med. Mycol. 60(12): myac081. https://doi.org/10.1093/mmy/myac081.

[5] Chen, H., Zhou, X., Ren, B. and Cheng, L., 2020, The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*, Virulence. 11(1): 337–48. https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930.

[6] Villa, S., Hamideh, M., Weinstock, A., Qasim, M.N., Hazbun, T.R., Sellam, A., Hernday, A.D. and Thangamani, S., 2020,

Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*, FEMS Yeast Res. 20(1): foaa005. https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa005.

[7] Chow, E.W.L., Pang, L.M. and Wang, Y., 2021, From Jekyll to Hyde: The Yeast-Hyphal Transition of *Candida albicans*, Pathogens (Basel, Switzerland). 10(7): 859. https://doi.org/10.3390/pathogens10070859.

[8] Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I. and Škrlec, I., 2021, *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection, J. Fungi (Basel, Switzerland). 7(2): 79. https://doi.org/10.3390/jof7020079.

[9] Ciurea, C.N., Kosovski, I.B., Mare, A.D., Toma, F., Pintea-Simon, I.A. and Man, A., 2020, *Candida* and Candidiasis-Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits, Microorganisms. 8(6): 857. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857.

[10] Richardson, J.P., 2022, *Candida albicans*: A Major Fungal Pathogen of Humans, Pathogens. 11(4): 459. https://doi.org/10.3390/pathogens11040459.

[11] Chang, C.C., Harrison, T.S., Bicanic, T.A., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T.C., Warris, A., Hagen, F., Spec, A., Oladele, R., Govender, N.P., Chen, S.C., Mody, C.H., Groll, A.H., Chen, Y.C., Lionakis, M.S., Alanio, A., Castañeda, E., Lizarazo, J., Vidal, J.E., Takazono, T., Hoenigl, M., Alffenaar, J.W., Gangneux, J.P., Soman, R., Zhu, L.P., Bonifaz, A., Jarvis, J.N., Day, J.N., Klimko, N., Salmanton-García, J., Jouvion, G., Meya, D.B., Lawrence, D., Rahn, S., Bongomin, F., McMullan, B.J., Sprute, R., Nyazika, T.K., Beardsley, J., Carlesse, F., Heath, C.H., Ayanlowo, O.O., Mashedi, O.M., Queiroz-Telles, Filho. F., Hosseinipour, M.C., Patel, A.K., Temfack, E., Singh, N., Cornely, O.A., Boulware, D.R., Lortholary, O., Pappas, P.G. and Perfect, J.R., 2024, Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM, Lancet. Infect. Dis. 24(8): e495-e512. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00731-4. Epub 2024 Feb 9. Erratum in: Lancet. Infect. Dis. 24(8): e485. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00426-2.

[12] Oliveira, L.S.S., Pinto, L.M., de Medeiros, M.A.P., Toffaletti, D.L., Tenor, J.L., Barros, T.F., Neves, R.P., Neto, R.G.L., Milan, E.P., Padovan, A.C.B., Rocha, W.P.D.S., Perfect, J.R. and Chaves, G.M., 2021, Comparison of *Cryptococcus gattii/neoformans* Species Complex to Related Genera (*Papiliotrema* and *Naganishia*) Reveal Variances in Virulence Associated Factors and Antifungal Susceptibility, Front. Cell. Infect. Microbiol. 11: 642658. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.642658.

[13] Saidykhan, L., Onyishi, C.U. and May, R.C., 2022, The *Cryptococcus gattii* species

complex: Unique pathogenic yeasts with understudied virulence mechanisms, PLoS Neglected Trop. Dis.16(12): e0010916. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010916.

[14] Al-Huthaifi, A.M., Radman, B.A., Al-Alawi, A.A., Mahmood, F. and Liu, T.B., 2024, Mechanisms and Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans* Dissemination to the Central Nervous System, J. Fungi (Basel, Switzerland). 10(8): 586. https://doi.org/10.3390/jof10080586.

[15] Sprute, R., Cornely, O.A., Chen, S.C., Seidel, D., Schuetz, A.N. and Zhang, S.X., 2021, All You Need To Know and More about the Diagnosis and Management of Rare Yeast Infections, mBio. 12(4): e0159421. https://doi.org/10.1128/mBio.01594-21.

[16] Segal, E., and Elad, D., 2021, Human and Zoonotic Dermatophytoses: Epidemiological Aspects, Front. Microbiol. 12: 713532. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713532.

[17] Getso, M.I., Hashemi, S.J., Ghazvini, R.D., Yusuf, S.M., Khodavaisy, S., Gerami-Shoar, M., Kibiya, F.S., Aliyu, U.T., Sarvestani, H.K. and Aliyu, M., 2021, Determination of dermatophytes isolated from tinea capitis using conventional and ITS-based sequencing methods in Kano, Nigeria, J. Mycol. Med. 31(3): 101157. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101157.

[18] Jacobs, S.E., Wengenack, N.L. and Walsh, T.J., 2020, Non-*Aspergillus* Hyaline Molds: Emerging Causes of Sino-Pulmonary Fungal Infections and Other Invasive Mycoses, Semin. Respir. Crit. Care Med. 41(1): 115-30. https://doi.org/10.1055/s-0039-3401989.

[19] Morrissey, C.O., Kim, H.Y., Duong, T.N., Moran, E., Alastruey-Izquierdo, A., Denning, D.W., Perfect, J.R., Nucci, M., Chakrabarti, A., Rickerts, V., Chiller, T.M., Wahyuningsih, R., Hamers, R.L., Cassini, A., Gigante, V., Sati, H., Alffenaar, J.W. and Beardsley, J., 2024, *Aspergillus fumigatus*-a systematic review to inform the World Health Organization priority list of fungal pathogens, Med. Mycol. 62(6): myad129. https://doi.org/10.1093/mmy/myad129.

[20] Hoenigl, M., Salmanton-García, J., Walsh, T.J., Nucci, M., Neoh, C.F., Jenks, J.D., Lackner, M., Sprute, R., Al-Hatmi, A.M.S., Bassetti, M., Carlesse, F., Freiberger, T., Koehler, P., Lehrnbecher, T., Kumar, A., Prattes, J., Richardson, M., Revankar, S., Slavin, M.A., Stemler, J., Spiess B., Taj-Aldeen, S.J., Warris, A., Woo, P.C.Y., Young, J.H., Albus, K., Arenz, D., Arsic-Arsenijevic, V., Bouchara, J.P., Chinniah, T.R., Chowdhary, A., de Hoog, G.S., Dimopoulos, G.,, Duarte R.F., Hamal, P., Meis, J.F., Mfinanga, S., Queiroz-Telles, F., Patterson, T.F., Rahav, G., Rogers, T.R., Rotstein, C., Wahyuningsih, R., Seidel, D. and Cornely OA., 2021, Global guideline for the diagnosis and management of rare mould infections: an initiative of the

European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the American Society for Microbiology, Lancet. Infect. Dis. 21(8): e246-e57. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30784-2.

[21] Hoenigl, M., Levitz, S.M., Schuetz, A.N., Zhang, S.X. and Cornely, O.A., 2021, All You Need to Know and More about the Diagnosis and Management of Rare Mold Infections, mBio. 12(1): e02920-20. https://doi.org/10.1128/mBio.02920-20.

[22] Skiada, A., Pavleas, I. and Drogari-Apiranthitou, M., 2020, Epidemiology and Diagnosis of Mucormycosis: An Update, J. Fungi. (Basel, Switzerland). 6(4): 265. https://doi.org/10.3390/jof6040265f6040265.

[23] Pham, D., Howard-Jones, A.R., Sparks, R., Stefani, M., Sivalingam, V., Halliday, C.L., Beardsley, J. and Chen, S.C, 2023, Epidemiology, Modern Diagnostics, and the Management of Mucorales Infections, J. Fungi (Basel, Switzerland). *9*(6): 659. https://doi.org/10.3390/jof9060659.

[24] Abdillah, A., Khelaifia, S., Raoult, D., Bittar, F. and Ranque, S., 2020, Comparison of Three Skin Sampling Methods and Two Media for Culturing *Malassezia* Yeast, J. Fungi (Basel, Switzerland). 6(4): 350. https://doi.org/10.3390/jof6040350.

[25] Abdillah, A. and Ranque, S., 2021, *MalaSelect*: A Selective Culture Medium for *Malassezia* Species. J. Fungi. (Basel, Switzerland). *7*(10): 824. https://doi.org/10.3390/jof7100824.

[26] Atsü, N., Ergin, Ç., Caf, N., Türkoğlu, Z., Döğen, A. and İlkit, M., 2022, Effectiveness of FastFung agar in the isolation of *Malassezia furfur* from skin samples, Mycoses. 65(7): 704-8. https://doi.org/10.1111/myc.13450.

[27] Roth, M., Daas, L., MacKenzie, C.R., Balasiu, A., Stachon, T., Neumann, I., Steindor, F., Seitz, B. and Geerling, G., 2020, Development and Assessment of a Simulator for *in Vivo* Confocal Microscopy in Fungal and *Acanthamoeba Keratitis*, Curr. Eye Res. 45(12): 1484-9. https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1772830.

[28] Chandler, D., 2022, Direct microscopy in the dermatology clinic: enhancing the management of skin infections and infestations, Clin. Exp. Dermatol. 47(6): 1023-9. https://doi.org/10.1111/ced.151185118.

[29] Cornely, O.A., Sprute, R., Bassetti, M., Chen, S.C., Groll, A.H., Kurzai, O., Lass-Flörl, C., Ostrosky-Zeichner, L., Rautemaa-Richardson, R., Revathi, G., Santolaya, M.E., White, P.L., Alastruey-Izquierdo, A., Arendrup, M.C., Baddley, J., Barac, A., Ben-Ami, R., Brink, A.J., Grothe, J.H., Guinea, J., Hagen, F., Hochhegger, B., Hoenigl, M., Husain, S., Jabeen, K., Jensen, H.E., Kanj, S.S., Koehler, P., Lehrnbecher, T., Lewis, R.E., Meis, J.F., Nguyen, M.H.,

Pana, Z.D., Rath, P.M., Reinhold, I., Seidel, D., Takazono, T., Vinh, D.C., Zhang, S.X., Afeltra, J., Al-Hatmi, A.M.S., Arastehfar, A., Arikan-Akdagli, S., Bongomin, F., Carlesse, F., Chayakulkeeree, M., Chai, L.Y.A., Chamani-Tabriz, L., Chiller, T., Chowdhary, A., Clancy, C.J., Colombo, A.L., Cortegiani, A., Corzo Leon, D.E., Drgona, L., Dudakova, A., Farooqi, J., Gago, S., Ilkit, M., Jenks, J.D., Klimko, N., Krause, R., Kumar, A., Lagrou, K., Lionakis, MS., Lmimouni, B.E., Mansour, M.K., Meletiadis, J., Mellinghoff, S.C., Mer, M, Mikulska, M., Montravers, P., Neoh, C.F., Ozenci, V., Pagano, L., Pappas, P., Patterson, T.F., Puerta-Alcalde, P., Rahimli, L., Rahn, S., Roilides, E., Rotstein, C., Ruegamer, T., Sabino, R., Salmanton-García, J., Schwartz, I.S., Segal, E., Sidharthan, N., Singhal, T., Sinko, J., Soman, R., Spec, A., Steinmann, J., Stemler, J., Taj-Aldeen, S.J., Talento, A.F., Thompson, G.R. 3rd, Toebben, C., Villanueva-Lozano, H., Wahyuningsih, R., Weinbergerová, B., Wiederhold, N., Willinger, B., Woo, P.C.Y., Zhu, L.P., 2025, Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM, Lancet. Infect. Dis. 25(5): e280-93. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00749-7.

[30] Kruithoff, C., Gamal, A., McCormick, T.S. and Ghannoum, M.A, 2023, Dermatophyte Infections Worldwide: Increase in Incidence and Associated Antifungal Resistance, Life (Basel, Switzerland). 14(1): 1. https://doi.org/10.3390/life14010001.