การจำแนกชนิดของ *Candida* ที่เพาะแยกจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ด้วยเทคนิค ITS PCR-RFLP

Identification of Clinical Isolated *Candida* Using ITS PCR-RFLP Method

เอนก ภู่ทอง* อรฤดี ขันติสิทธิพร และสุวรรณา โควะวินทวีวัฒน์

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจจำแนกชนิดของ *Candida* spp. ด้วยวิธี ITS PCR-RFLP และเปรียบเทียบกับวิธีทางจุลชีววิทยา (germ tube test, chromogenic agar และ carbon assimilation test) จากการศึกษาพบว่าวิธี ITS PCR-RFLP สามารถจำแนกชนิดของ *Candida* spp. จำนวน 54 ไอโซเลต ที่เพาะแยกจากสิ่งส่งตรวจได้เป็น *C. albicans* 32 ไอโซเลต (59%) *C. tropicalis* 13 ไอโซเลต (24%) *C. glabrata* 6 ไอโซเลต (11%) และ *C. krusei* 3 ไอโซเลต (6%) ในขณะที่วิธีการทางจุลชีววิทยาสามารถจำแนกชนิดเป็น *C. albicans*, *C. glabrata* และ *C. tropicalis* ได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่สามารถจำแนก *C. krusei* ได้ วิธี ITS PCR-RFLP จึงเหมาะสำหรับนำไปพัฒนาหรือประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของเชื้อดังกล่าวในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และการศึกษาทางระบาดวิทยาต่อไป

คำสำคัญ : *Candida* spp. การจำแนกชนิด ITS PCR-RFLP

Abstract

The aims of this study were to identify the clinical isolated *Candida* spp. using ITS PCR-RFLP method and to compare the method with the conventionally microbiological methods (germ tube test, chromogenic agar method and carbon assimilation test). Of 54 clinical isolates of *Candida* spp. using ITS PCR-RFLP for identification, 32 (59%), 13 (24%), 6 (11%) and 3 (6%) were *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*, respectively. The results from microbiological methods were the same as ones from ITS PCR-RFLP method except *C. krusei* which could not be identified. This study suggests that ITS PCR-RFLP should be further developed for identification of *Candida* spp. in medical microbiology laboratory and for epidemiology study.

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** tae0047@hotmail.com

Keywords: *Candida* spp., identification method, ITS PCR-RFLP

1. บทนำ

Candida spp. เป็นยีสต์ (yeast) ที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในร่างกายมนุษย์บริเวณผิวหนัง ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ แต่เชื้อดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดโรค candidiosis หรือ candidiasis ซึ่งเป็นการติดเชื้อในบริเวณเยื่อบุตามร่างกายและสามารถลุกลามไปสู่อวัยวะภายในรวมทั้งสามารถกระจายสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต การติดเชื้อ *Candida* spp. ในกระแสเลือด (systemic candidiasis หรือ candidiamia) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิต ในปัจจุบันการติดเชื้อดังกล่าวมีอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยโรคมะเร็ง เป็นต้น [1]

Candida albicans เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อดังกล่าว [2] อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อ non-*albicans Candida* spp. มีอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้น และพบว่าความไวในการตอบสนองต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม Azole ลดลง โดยเฉพาะ *C. krusei* ซึ่งปัจจุบันจัดเป็นเชื้อดื้อต่อยา Azole โดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) [3] ดังนั้นการวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิด (species) ของ *Candida* จึงมีความจำเป็นในการรักษาโรค Candidiasis ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ปัจจุบันการจำแนกชนิดของเชื้อในสกุล *Candida* ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ได้แก่ germ tube test และ chromogenic agar ซึ่งเป็นวิธีการเบื้องต้น (presumptive identification method) ในการจำแนกชนิดของ *Candida* และเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติ วิธี carbon assimilation เป็นวิธีอ้างอิง (reference method) ในการจำแนก *Candida* อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวอาจให้ผลการจำแนกชนิดที่ผิดพลาดได้และยังเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก มีระยะเวลาในการอ่านผลการทดสอบที่ไม่แน่นอน ทำให้การจำแนกชนิด *Candida* เป็นไปอย่างล่าช้า [4]

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา โดยการประยุกต์ใช้เทคนิค polymerase chain reaction ร่วมกับ restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [5-7] สำหรับการจำแนกชนิดของ *Candida* โดยทำการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I พบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *Candida* spp. สายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ 6 ชนิด ได้ [8]

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการจำแนกชนิดของ *Candida* ที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจด้วยเทคนิค ITS PCR-RFLP กับเทคนิคทางจุลชีววิทยา

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 *Candida* spp.

Candida spp. จำนวน 54 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่พักรักษา ณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 ชนิดสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ ปัสสาวะ เลือด เสมหะ และหนอง จำนวน 35, 11, 5 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน sabouraud dextrose agar (SDA; 2% peptone, 4% dextrose, 1.5% agar) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ

2.2 การทดสอบทางจุลชีววิทยา (microbiological method)

2.2.1 การทดสอบการสร้างท่องอก (germ tube test)

เขี่ยเชื้อที่เจริญอยู่บน SDA ผสมกับซีรั่ม ปริมาตร 10 µl ใน microtiter well plate จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และอ่านผลการสร้างท่องอกภายในเวลา 2 ชั่วโมง

2.2.2 การทดสอบสีโคโลนีของ *Candida* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliance™ *Candida* agar

ขีดเชื้อลงบน Brilliance™ *Candida* agar (Oxiods, USA) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตสีโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นตามที่มีรายงานใน Brilliance™ *Candida* agar data sheet [9] ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สีโคโลนีของ *Candida* spp. เมื่อเพาะเลี้ยงบน Brilliance™ *Candida* agar

Organism	Typical colony appearance
C. tropicalis	dark blue
C. albicans, *C. dubliniensis*	green
C. krusei	dry, irregular pink-brown
C. glabrata, C. kefyr, *C. parapsilosis,* *C. lusitaniae*	beige/yellow/ brown

2.2.3 การทดสอบการใช้สารประกอบคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน (carbon assimilation test)

การทดสอบ carbon assimilation ในอาหารเหลวชนิด OF basal medium (0.2% pancreatic digest of casein, 0.5% sodium chloride, 0.03% dipotassium phosphate, 0.008% bromthymol blue) ปริมาตร 2 ml ซึ่งมี dextose, maltose, sucrose, lactose, galactose, melibiose, cellibiose, inositol, xylose, raffinose, trehalose และ dulcitol ชนิดใดชนิดหนึ่ง ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1% (w/v) เป็นส่วนประกอบ

ทดสอบโดยผสมโคโลนีของเชื้อหลังจากเพาะบน SDA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เติมเชื้อปริมาตร 100 µl ใส่ลงในหลอด OF medium ที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน หากผิวหน้าของอาหารทดสอบที่เติมสารประกอบคาร์บอนชนิดใดเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อสามารถใช้สารประกอบคาร์บอนชนิดนั้นได้ ให้อ่านผลการทดสอบเป็นบวก แต่หากผิวหน้าของอาหารทดสอบไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้สารประกอบคาร์บอนชนิดนั้นได้ ให้อ่านผลการทดสอบเป็นลบ แปลผลชนิดของเชื้อตามหลักการของ yeast biochemical characteristics [10]

2.3 การจำแนกชนิดของ *Candida* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

2.3.1 การสกัด genomic DNA

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ของ *Candida* spp. ลงใน sabouraud dextrose broth (SDB; 2% peptone, 4% dextrose) ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ

เขย่าแบบ orbital ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 250 rpm นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อปริมาตร 0.5 ml ใส่ใน microtube และนำไปปั่นที่ 1,100 *x g* เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์โดยเติม TES buffer ปริมาตร 1,000 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 1,100 *x g* เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง หลังจากนั้นเติม TE buffer (5 mM, pH 7.6) ปริมาตร 375 µl แล้วเติม lysis solution (5% sarcosyl ที่ละลายใน TE buffer) ปริมาตร 125 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10 mg/ml proteinase K ปริมาตร 5 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าให้เข้ากันทุกๆ 15 นาที จากนั้น เติม chloroform ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 *x g* เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้นที่เป็นส่วนของเหลวด้านบน (aqueous phase) ใส่ลงใน microtube ใหม่ เติม chloroform ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนของเหลว ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 8,000 *x g* เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดชั้นส่วนของเหลวด้านบนใส่ลงใน microtube ใหม่ เติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนของเหลว ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 *x g* เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol แล้วปั่นที่ 8,000 *x g* เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ตากตะกอน DNA ให้แห้งแล้วละลายด้วย TE buffer, pH 7.4 ที่มี 20 µg/ml RNase A ปริมาตร 50 µl จากนั้นนำไปวิเคราะห์ DNA ที่สกัดได้ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ 4°C

2.3.2 การเพิ่มจำนวน ITS DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction

เพิ่มจำนวน DNA ของ ITS gene region ของ *Candida* spp. โดยใช้ specific primers ซึ่งประกอบด้วย forward primer ITS1; 5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′ และ reverse primer ITS4; 5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′ [8] ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 µl มีส่วนประกอบดังนี้ 0.8 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 µM ITS primers, 1 unit *Tag* DNA Polymerase (Fermentas, USA), 1x *Tag* buffer และ 0.1 µl template DNA โดยใช้โปรแกรมสำหรับการเพิ่มจำนวน ITS DNA ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ G-STROM GS1 thermal cycler (United Kingdom) ดังนี้ (1) primary denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที (2) PCR cycle ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ จำนวน 30 รอบ และ (3) final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

2.3.3 การตัด ITS DNA amplicon ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I

ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วน ITS DNA ด้วยเอนไซม์ *Msp*I ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย 2 units *MspI* enzyme (Fermentas, USA), 1x *MspI* buffer และ 5 µl PCR product จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวิเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

2.3.4 การแปลผลการทดสอบ ITS PCR-RFLP ของ *Candida*

เปรียบเทียบขนาดและจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ที่ตัดด้วย *Msp*I กับ RFLP ของ *Candida* spp. ทั้ง 6 ชนิดกับผลการทดลองของ Mirhendi และคณะ [8] ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดของ ITS DNA amplicons กับขนาดและ RFLP pattern ของ ITS DNA ที่ตัดด้วย *Msp*I ของ *Candida* ทั้ง 6 species

Candida spp.	Size of ITS1-ITS4 amplicon	Size of RFLP products (base pair)
C. albicans	534	297, 238
C. glabata	871	557, 314
C. tropicalis	524	340, 184
C. krusei	510	261, 249
C. guilliermondii	608	371, 155, 82
C. parapsilosis	520	520

4. ผลการทดลอง

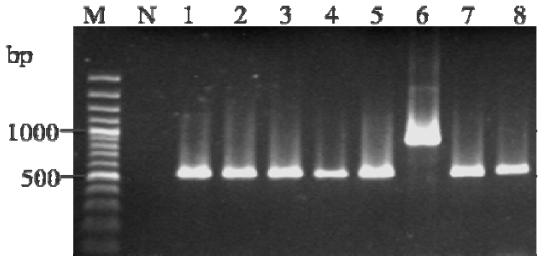
4.1 การจำแนกชนิดของ *Candida* ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา

ผลการทดสอบการสร้าง germ tube ลักษณะสีของโคโลนีบน Brilliance™ *Candida* agar และการใช้คาร์โบไฮเดรตในภาวะที่มีออกซิเจน (carbon assimilation test) ของเชื้อทั้ง 54 ไอโซเลต พบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *Candida* spp. ได้ 51 ไอโซเลต โดยให้ผลเป็น *C. albicans* 32 ไอโซเลต (59%) *C. glabrata* 6 ไอโซเลต (11%) และ *C. tropicalis* 13 ไอโซเลต (24%) ในขณะที่อีก 3 ไอโซเลต (6%)ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยวิธีดังกล่าว

4.2 การจำแนกชนิดของ *Candida* ด้วย PCR-RFLP

4.2.1 การเพิ่มจำนวน ITS DNA ของ *Candida* ด้วยวิธี polymerase chain reaction

เมื่อนำ genomic DNA ที่สกัดได้ไปใช้เป็น template ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน ITS DNA โดยใช้ ITS specific primers และนำ DNA amplicon มาวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electro-phoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) พบว่า *Candida* ทั้ง 54 ไอโซเลต มี DNA amplicon ขนาดประมาณ ตั้งแต่ 500 ถึง 800 bp (รูปที่ 1)

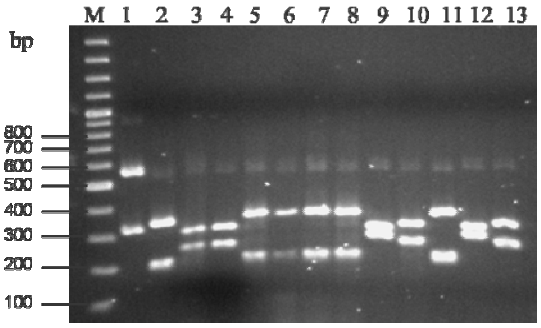


รูปที่ 1 ITS DNA amplicon ที่ได้จากการปฏิกริยา PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้เป็น templates [lane M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA), lane N: negative control, lane 1-8: ITS DNA ของ *Candida* จากแยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

4.2.2 ITS PCR-RFLP ของ *Candida* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I

เมื่อตัด ITS DNA amplicon ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis และเปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับ 100 bp DNA Ladder

(Fermentas, USA) พบว่าแบบแผน ของ DNA (RFLP pattern) มีทั้งหมด 4 แบบ ด้วยกัน (รูปที่ 2) โดยที่แต่ละแบบมีขนาดและจำนวนชิ้นส่วน DNA แตกต่างกัน ดังนี้ (1) DNA ขนาดประมาณ 290 และ 240 bp (2) 560 และ 310 bp (3) 340 และ 180 bp และ (4) 260 และ 250 bp และเมื่อเปรียบเทียบกับ RFLP pattern ของเชื้ออ้างอิงจากการทดลองของ Mirhendi และคณะ [8] พบว่าเป็น RFLP pattern ของ *C. albicans* (ITS RFLP1: 297 และ 238 bp), *C. glabrata* (ITS RFLP2: 557 และ 314 bp), *C. tropicalis* (ITS RFLP3: 340 และ 184 bp) และ *C. krusei* (ITS RFLP4: 261 และ 249 bp) ตามลำดับ



รูปที่ 2 RFLP pattern ของ ITS DNA ของ *Candida* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I [lane M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA), lane 1: ITS RFLP 2, lanes 2, 5, 6, 7, 8 และ11: ITS RFLP 3, lanes 3, 4, 10 และ 13: ITS RFLP 1, lanes 9 และ 12: ITS RFLP 4]

จากการจำแนกชนิด *Candida* spp. ด้วย ITS PCR-RFLP พบว่าเชื้อ 54 ไอโซเลต เป็น *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* จำนวน 32 (59%), 13 (24%), 6 (11%) และ 3 ไอโซเลต (6%) ตามลำดับ

4.3 การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของ *Candida* ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยากับวิธี ITS PCR-RFLP

จากการทดสอบด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา (Germ tube test, Chromogenic agar และ Carbon assimilation test) และ ITS PCR-RFLP พบว่าผลจากการจำแนกชนิดของ *C. albicans*, *C. glabrata* และ *C. tropicalis* จากตัวอย่าง 51 ไอโซเลต มีความสอดคล้องกัน แต่เชื้ออีก 3 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยานั้น มี RFLP pattern ตรงกับของ *C. krusei*

5. วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถของ *Candida* spp. ในการสร้าง germ tube ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีซีรั่มเป็นส่วนประกอบ เป็น presumptive identification method ที่สามารถจำแนก *C. albicans* ได้ภายในเวลา 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ไม่มีความจำเพาะ เนื่องจาก *C. duplinensis* สามารถสร้างท่องอกภายในเวลา 2 ชั่วโมงได้เช่นเดียวกัน [11] นอกจากนี้ *Candida* spp. อื่นๆ สามารถสร้างท่องอกได้ หากเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ในซีรั่มนานเกิน 2 ชั่วโมง

การทดสอบการสร้างสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliance™ *Candida* agar เป็นวิธีที่ให้ผลการทดสอบค่อนข้างรวดเร็ว การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ยุ่งยาก ทำได้ง่ายและสะดวก สามารถอ่านผลทดสอบเบื้องต้นในระดับ species ได้ และเป็นวิธีที่นิยมใช้ในโรงพยาบาลทั่วไป จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสีโคโลนีที่เกิดขึ้นแบ่งได้เป็น 4 สี คือ สีเขียว (green) สีน้ำเงินเข้ม (dark blue) สีน้ำเงิน (blue) และสีเหลือง (beige/yellow/brown) และพบว่าบาง

ตัวอย่างมีสีโคโลนีใกล้เคียงกันมาก เช่น เชื้อที่เพาะแยกได้จากปัสสาวะจำนวน 3 ไอโซเลต (U10B, U12 และ U15) มีโคโลนีสีน้ำเงินคล้ายกับโคโลนีของ *C. tropicalis* แต่จากการจำแนกด้วย ITS PCR-RFLP พบว่าเป็น *C. krusi* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบนอาหารทดสอบดังกล่าว *C. glabrata* สามารถให้สีโคโลนีคล้ายกับของ *C. parapsilosis* และเชื้อทั้งสองชนิดนี้ยังสามารถให้โคโลนีเป็นสีม่วง สีขาว สีชมพู และสีเทาได้อีกด้วย [12] ดังนั้นการใช้ Brilliance™ *Candida* agar เพียงการทดสอบเดียวจึงไม่เหมาะสมในการจำแนกชนิดของ *Candida* spp.

การทดสอบ carbon assimilation จัดเป็นวิธีอ้างอิง (reference method) ที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อราชนิดยีสต์ [10] ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบอย่างน้อย 7 วัน และการศึกษาก่อนหน้านี้ รายงานว่า *Candida* บางชนิด เช่น *C. tropicalis* ใช้เวลาบ่มนานกว่า 7 วัน จึงให้ผล carbon assimilation ที่ถูกต้อง ดังนั้นจำเป็นต้องใช้เวลาในการทดสอบดังกล่าวเพิ่มขึ้น [13] สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าจากการทดสอบ carbon assimilation ของเชื้อ U10B, U12 และ U15 เป็นเวลา 7 วัน ไม่สามารถแปลผลการทดสอบได้ เนื่องจากเชื้อดังกล่าวให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับ dextrose, maltose, sucrose, lactose, galactose, xylose, trehalose และ dulcitol ซึ่งไม่ตรงกับเชื้อยีสต์ชนิดใดเลย นอกจากนี้การทดสอบ carbon assimilation มีความยุ่งยากและใช้เวลานานและแปลผลการทดสอบได้ค่อนข้างยาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [13-14]

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาทั้ง 3 วิธี คือ germ tube formation test ลักษณะสีของโคโลนีบน Brilliance™ *Candida* agar และการทดสอบ carbon assimilation พบว่าสามารถจำแนกชนิดเชื้อได้ 51 ไอโซเลต คือ *C. albicans* 32 ไอโซเลต (59%) *C. tropicalis* 13 ไอโซเลต (24%) และ *C. glabrata* 6 ไอโซเลต (11%) ในขณะที่ เชื้ออีก 3 ไอโซเลต ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

การจำแนกชนิดของ *Candida* spp. ด้วยเทคนิค ITS PCR-RFLP ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วย universal primer (ITS1 และ ITS4) จาก genomic DNA และเมื่อทำการตัดชิ้นส่วน ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเอนไซม์ *MspI* สามารถจำแนกชนิดของ *Candida* สายพันธุ์อ้างอิงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ทั้ง 6 species ได้แก่ *C. albicans*, *C. glabata, C. tropicalis, C. krusei, C. guilliermondii* และ *C. parapsilosis* [8] จากการศึกษาสามารถจำแนกเชื้อทั้ง 54 ไอโซเลตได้เป็น *C. albicans* 32 ไอโซเลต (59%) *C. tropicalis* 13 ไอโซเลต (24%) *C. glabrata* 6 ไอโซเลต (11%) และ *C. krusei* 3 ไอโซเลต (6%) ซึ่งวิธีการทางจุลชีววิทยาไม่สามารถจำแนก *C. krusei* ทั้ง 3 ไอโซเลต นี้ได้

6. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการจำแนกชนิดของ *Candida* ด้วย ITS PCR-RFLP มีความรวดเร็วเพราะใช้เวลาเพียง 2-3 วัน ซึ่งน้อยกว่าวิธีทางจุลชีววิทยาซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 7 วัน และยังสามารถแปรผลการวิเคราะห์ได้ง่ายและครอบคลุมชนิดของ *Candida* ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ นอกจากนี้หากสามารถพัฒนาวิธีการดังกล่าวและนำมาประยุกต์ใช้เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ในสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ได้โดยตรง เช่น ในตัวอย่างเลือด จะสามารถลดระยะเวลาการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งได้ ทำให้การรักษาผู้ป่วยติดเชื้อเป็นไปอย่าง

รวดเร็วและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น อีกทั้งสามารถนำ ITS-PCR RFLPไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาได้อีกด้วย

7. เอกสารอ้างอิง

[1] Freydiere, A. and Guinet, R., 1997, Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts, Rev. Iberoam. Micol. 14: 85-89.

[2] Hoppe, J. and Frey, P., 1999, Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*, J. Clin. Microbiol. 18: 188-191.

[3] Dermoumi, H., 1992, *In vitro* susceptibility of yeast isolates from the blood to fluconazole and amphotericin B, Chemotherapy 38: 112-117.

[4] Dooley, D., Beckius, M. and Jeffrey, B., 1994, Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated vitek yeast biochemical card, J. Clin. Microbiol. 32: 2889-2892.

[5] Morace, G., Sanguinetti, M., Posteraro B., Lo Cascio, G., Fadda, G., 1997, Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis, J. Clin. Microbiol. 35: 667-672.

[6] Zhenyu, Q., Shaoxi, W., Guixia, L., Hopfer, R.L., Hong, Z. and Ningru, G., 2000, Identification of *Candida, Aspergillus* and *Cryptococcus* by using PCR- RFLP, J. Clin. Dermatol. 29: 76-78.

[7] Xu, J., Millar, B.C., Molre, J.E. and Mcmullan, R., 2002, Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* spp. isolated from blood stream infections, J. Clin. Pathol. 52: 774-777.

[8] Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M. and Yamaguchi, H., 2006, A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species, J. Med. Mycol. 47: 225-229.

[9] Brilliance™ *Candida* agar data sheet, Available Source: http://www.oxoid.com/pdf/24085_oxoid_brilliance_candida.pdf, May 05, 2011.

[10] Gary, P.W. and Charles, S., 2007, Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed, ASM Press, Inc., Washington, DC, 2488 p.

[11] Sweih, N., Ahmad, S., Khan, Z., Khan, S. and Chandy, R., 2005, Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a Maternity Hospital in Kuwait, Mycoses 48: 347-351.

[12] Cooke, V., Miles, R., Price, R., Midgley, G., Khamri, W. and Richard, A., 2002, New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp., Appl. Environ. Microbiol. 68: 3622-3627.

[13] Preechasuth, K., Kabchan, P. and Khamwan, C., 2007, Use of an oxidation-fermentation medium for identification of clinical yeast isolated, J. Med. Tech. Assoc. 35: 2107-2114.

[14] Fenn, J., Billetdeaux, E., Segal, H., Skodack-Jones, L., Padilla, P., Bale, M. and Carroll, K., 1999, Comparison of four methodologies for rapid and cost-effective identification of *Candida glabrata*, J. Clin. Microbiol. 37: 3387-3389.