



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12  
"Global Goals, Local Actions: Looking Back and Moving Forward 2021"

## การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มและการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ *Candida parapsilosis* ที่แยกได้จากทางคลินิกและสิ่งแวดล้อม

### Biofilm formation and proteinase production of *Candida parapsilosis* clinical and environmental isolates

ณัฐธิดา ชลนาคเกษม<sup>1</sup>, ศรีสุตา ปิณฑานุสรณ์<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

#### บทคัดย่อ

*Candida parapsilosis* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่มีอาศัยในร่างกายมนุษย์ ซึ่ง *C. parapsilosis* เป็นสายพันธุ์ *Candida* ที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสองรองจาก *C. albicans* โดยปกติแล้วเชื้อแคนดิดาจะก่อโรคก็ต่อเมื่อมีสภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ *C. parapsilosis* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่ประกอบด้วยสารโพลีเมอร์ต่างๆ มาห่อหุ้มเซลล์ไว้ ทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ส่งผลให้เซลล์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สารเคมี ยาต้านจุลชีพ รวมทั้งมีกลไกการป้องกันตนเองมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส ซึ่งมีส่วนช่วยในการทำให้เกิดโรคของจุลินทรีย์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัย คือ ศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* ที่แยกได้จากทางคลินิกและสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 74 ไอโซเลท เพื่อศึกษาความรุนแรงในการก่อโรค ซึ่งในการศึกษานี้สามารถแบ่งความสามารถการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ที่แยกได้จากทางคลินิกแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มต่ำจำนวน 51 ไอโซเลท (77.27%) กลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง 6 ไอโซเลท (9.09%) และกลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสูง 9 ไอโซเลท (13.64%) ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง 3 ไอโซเลท (37.5%) และกลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสูง 5 ไอโซเลท (62.5%) ซึ่งพบว่ากลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสูงสร้างเส้นใยเทียมมากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม และกลุ่มที่สร้างไบโอฟิล์มน้อยเมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ การผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* ที่แยกได้จากทางคลินิกแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส 8 ไอโซเลท (12.12%) กลุ่มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสปานกลาง 4 ไอโซเลท (6.06%) และกลุ่มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสสูง 54 ไอโซเลท (81.82%) ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสปานกลาง 2 ไอโซเลท (25%) และกลุ่มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสสูง 6 ไอโซเลท (75%)

คำสำคัญ: *C. parapsilosis*, ไบโอฟิล์ม, เอนไซม์โปรตีนเอส

#### Abstract

*Candida parapsilosis* thesecond most common cause of fungal infections in humans.The infection mainly occurs in patients with immune defective individuals.*C. parapsilosis* has an ability to form biofilm whichcontributing to the critical infection.



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12  
"Global Goals, Local Actions: Looking Back and Moving Forward 2021"

Architectural structure of biofilm having extracellular matrix as a protecting layer can prevent internal cells from antimicrobial agents as well as host immunity. Furthermore, *C. parapsilosis* can produce proteinase enzyme which is additionally related to the pathogenesis. This research aims to study biofilm formation and proteinase production of the 74 *C. parapsilosis* clinical and environmental isolates. The results found that biofilm of *C. parapsilosis* clinical isolates were divided into 3 groups; low biofilm (n=51, 77.27%), medium biofilm (n=6, 9.09%) and high biofilm (n=9, 13.64%). The isolates from environment mostly show medium biofilm formation (n=3, 37.5%) and high biofilm formation (n=5, 62.5%). In addition, biofilm was determined qualitatively by observation under inverted microscope. The result showed that pseudohyphae were the main component in high biofilm. Proteinase production of *C. parapsilosis* clinical isolates was divided into 3 groups; low proteinase (n=8, 12.12%), medium proteinase (n=4, 6.06%) and high proteinase (n=54, 81.82%). Proteinase production of *C. parapsilosis* environmental isolates was divided into 2 groups; medium proteinase (n=2, 25%) and high proteinase (n=6, 75%)

**Keywords:** *C. parapsilosis*, biofilm, proteinase,

## บทนำ

ในร่างกายมนุษย์มีเชื้อราหลายชนิดที่อาศัยอยู่หนึ่งในนั้นคือเชื้อแคนดิดาซึ่งเป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่มีอาศัยในที่ต่างๆ เช่นช่องปากหรือผิวหนังโดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาใดๆ ซึ่งเชื้อแคนดิดาจะก่อโรครักต่อเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม นั่นคือ การมีภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคติดเชื้อเอชไอวีหรือโรคเอดส์ ผู้ที่ใช้ยากลุ่มคอร์ติโคสเตอรอยด์หรือยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามะเร็งด้วยรังสีบำบัดหรือเคมีบำบัด ผู้ที่ใช้สายสวนเป็นเวลานาน [1, 2] ถ้าเกิดการเสียสมดุลระหว่างเชื้อรากับแบคทีเรียประจำถิ่น หรือจากร่างกายมีภูมิต้านทานโรครักที่ต่ำลง จะส่งผลให้เชื้อราทวีจำนวนขึ้นเป็นอย่างมากจนก่อให้เกิดการติดเชื้อหรือเป็นโรคได้ [3, 4] ในปัจจุบันมีผู้ป่วยจำนวนมากที่รักษาตัวในโรงพยาบาล ซึ่งแคนดิดาทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่ร้ายแรง และเป็นเชื้อที่พบบ่อยที่สุด 4 อันดับแรกที่แยกได้จากการติดเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วย [1, 2]

*C. parapsilosis* เป็นเชื้อ *Candida* ที่พบได้มากที่สุดเป็นอันดับสองมีหลายปัจจัยที่มีส่วนช่วยในการทำให้ *C. parapsilosis* ทวีความรุนแรงมากขึ้น โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยทำให้เซลล์ของเชื้อสามารถหลบหนีหรือต้านทานต่อการป้องกันของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อก่อความรุนแรงของโรคได้มากขึ้น [5] ไบโอฟิล์มจะประกอบด้วยสารโพลีเมอร์ต่างๆ เชื้อสร้างมาห่อหุ้มเซลล์ไว้ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน ทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก ส่งผลให้เซลล์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สารเคมี ยาต้านจุลชีพ รวมทั้งมีกลไกการป้องกันตนเองมากขึ้นด้วย [6] ดังนั้นการรักษาโรครักติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากการติดเชื้อขณะรับการ



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12  
"Global Goals, Local Actions: Looking Back and Moving Forward 2021"

รักษาตามสถานพยาบาลส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการที่ไบโอฟิล์มก่อตัวบนอุปกรณ์ทางการแพทย์ โดยเฉพาะอุปกรณ์ที่ฝังอยู่ในร่างกายผู้ป่วยและยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสโดยจะช่วยให้เชื้อก่อโรคบุกรุกเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้สะดวกขึ้น โดยเน้นการยึดเกาะ ทำความเสียหาย ต่อเนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้าน และหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน [7]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม รวมถึงการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* ที่แยกได้จากทางคลินิกและสิ่งแวดล้อม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำการวิจัยเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. parapsilosis* และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรค รวมถึงการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ *C. parapsilosis* ได้

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis*
2. ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis*

### ขอบเขตของการวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ในจานเพาะเชื้อ 96 หลุม วัดปริมาณไบโอฟิล์มโดยการย้อมเซลล์ด้วย crystal violet วัดค่าการดูดกลืนแสง และ บันทึกผล
2. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* โดยการใช้ spot assay บนอาหารแข็ง และคำนวณหาค่า precipitation zone

### วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis*
  - 1.1 เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อแอกทีฟ
  - 1.2 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน
  - 1.3 ถ่ายสารละลายแขวนลอยเซลล์จากหลอดทดลองมาใส่ใน centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
  - 1.4 ปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยทำซ้ำอีก 2 ครั้ง
  - 1.5 Resuspended เซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB
  - 1.6 ปรับค่าความขุ่นของสารละลายแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB ให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้สารละลายแขวนลอยเซลล์พร้อมใช้
  - 1.7 ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 200 ไมโครลิตร มาใส่ในจานเพาะเชื้อ 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เพื่อให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ (adhesion) กับบริเวณพื้นผิวจานเพาะเชื้อ
  - 1.8 ปิเปตสารละลายทิ้ง ล้างด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 รอบ



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12  
"Global Goals, Local Actions: Looking Back and Moving Forward 2021"

1.9 เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.10 ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วล้างด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 รอบ

1.11 วางทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ซับสารละลายส่วนเกินโดยคว่ำจานเพาะเชื้อลงบนกระดาษทิชชู แล้วซับให้แห้ง

1.12 ย้อมด้วยสีย้อม 0.1% crystal violet ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

1.13 ปิเปตสีย้อมทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 2 รอบ

1.14 ชะสีย้อมด้วย 95% เอทานอล ปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 45 นาที

1.15 ปิเปตสารละลายลงในจานเพาะเชื้อ 96 หลุม

1.16 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

1.17 บันทึกและวิเคราะห์ผล

2. การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ *C. parapsilosis*

2.1 เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อแฉกที่ฟ

2.2 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.3 ถ่ายสารละลายแขวนลอยเซลล์จากหลอดทดลองมาใส่ใน centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.4 ปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีโดยทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.5 Resuspended เซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth

2.6 ปรับค่าความขุ่นของสารละลายแขวนลอยเซลล์ด้วย NaCl ให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้สารละลายแขวนลอยเซลล์พร้อมใช้

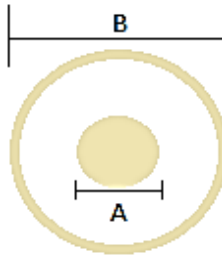
2.7 หยดสารละลายแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง YCB ที่เสริมด้วย 0.1% BSA โดยทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.8 ย้อมด้วยสีย้อม 0.1% amido black โดยการหยดทับให้ท่วมหน้าโคโลนีเป็นเวลา 15 นาที

2.9 ชะสีย้อมด้วยน้ำ

2.10 ชะสีย้อมด้วยสารละลายชะล้างให้ท่วมจานเพาะเชื้อ และปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 1 คืน

2.11 วิเคราะห์ผลที่ได้และคำนวณหา Precipitation zone (Pz) ดังนี้

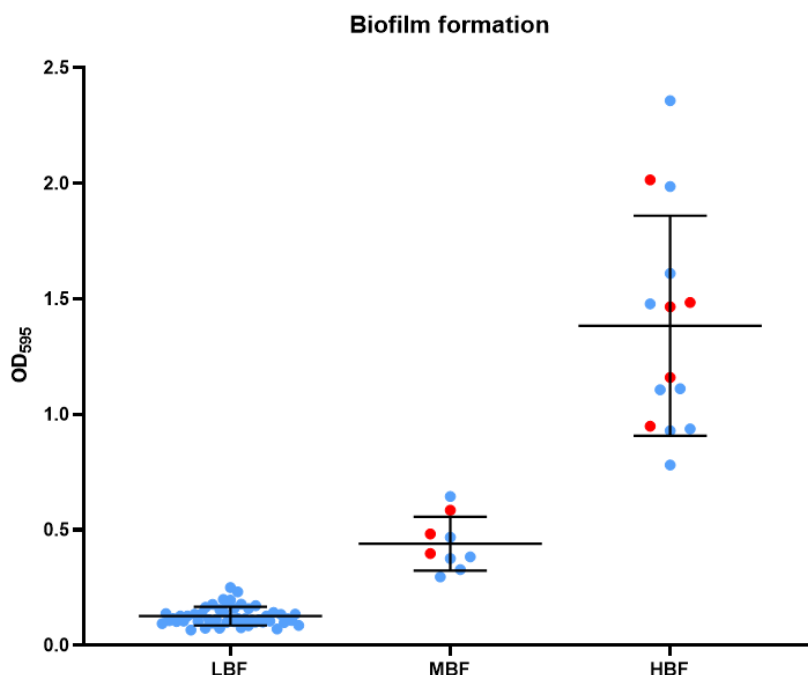


$$Pz = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางกลางของโคโลนี (A)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (B)}}$$

โดย $Pz = 1$	หมายถึง	ไม่มีการผลิตเอนไซม์
$1 > Pz \geq 0.64$	หมายถึง	มีการผลิตเอนไซม์ปานกลาง
$Pz < 0.64$	หมายถึง	มีการผลิตเอนไซม์มาก

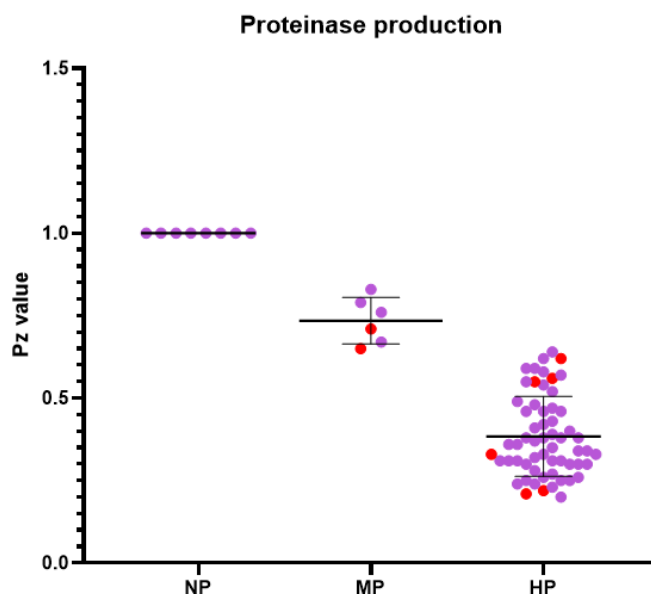
### ผลการวิจัย

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มต่ำ กลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง และกลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสูง ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 74 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 8 ไอโซเลท และ เชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 66 ไอโซเลท พบว่า *C. parapsilosis* จำนวน 51 ไอโซเลท มีการสร้างไบโอฟิล์มต่ำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.127 ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก เชื้อที่มีการสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง จำนวน 9 ไอโซเลทค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.44 แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 6 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 3 ไอโซเลท ส่วนเชื้อที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสูงมีจำนวน 14 ไอโซเลทค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 1.384 แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 9 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 5 ไอโซเลทโดยความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 1) และเมื่อมีการสังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับพบว่า เชื้อกลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มสูงจะมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudohyphae) กลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มปานกลางประกอบไปด้วยเซลล์ยีสที่เกาะกลุ่มกัน และกลุ่มที่มีการสร้างไบโอฟิล์มต่ำประกอบไปด้วยเซลล์ยีสที่กระจายตัว



ภาพที่ 1: ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* 74 ไอโซเลท สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม: การสร้างไบโอฟิล์มต่ำ (LBF), การสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง (MBF) และการสร้างไบโอฟิล์มสูง (HBF) จุดสีแดงคือเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม จุดสีน้ำเงินคือเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก

การผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ *C. parapsilosis* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีน กลุ่มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนปานกลาง และกลุ่มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนสูง ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 74 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 8 ไอโซเลท และ เชื้อที่แยกได้จากคลินิก 66 ไอโซเลท พบว่า *C. parapsilosis* จำนวน 8 ไอโซเลท ไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีน ค่า Pz เฉลี่ยเท่ากับ 1 ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก เชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนปานกลาง จำนวน 6 ไอโซเลท ค่า Pz เฉลี่ยเท่ากับ 0.73 แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 4 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 2 ไอโซเลท ส่วนเชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนสูงมีจำนวน 60 ไอโซเลท ค่า Pz เท่ากับ 0.38 แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 54 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม 6 ไอโซเลท โดยเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2: ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ *C. parapsilosis* 74 ไอโซเลท สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม: ไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีน (NP), การผลิตเอนไซม์โปรตีนปานกลาง (MP) และการผลิตเอนไซม์โปรตีนสูง (HP) จุดสีแดงคือเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม จุดสีน้ำเงินคือเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก

### อภิปรายผลการวิจัย

การสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อทั้งนี้เนื่องจากไบโอฟิล์มมักเกิดบนบริเวณพื้นผิวของวัสดุทางการแพทย์ที่อยู่ภายในร่างกายผู้ป่วย และสามารถทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วร่างกายจากผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 74 ไอโซเลท (เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 66 ไอโซเลทและเชื้อจากสิ่งแวดล้อมจำนวน 8 ไอโซเลท) พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ร้อยละ 68.92 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Silva-Dias และคณะ [6] ที่ได้ทำการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดาหลายสายพันธุ์ พบว่า *C. parapsilosis* มีการสร้างไบโอฟิล์มต่ำที่สุดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Tumbarello และคณะ [5] พบว่า ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *C. parapsilosis* สัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 71.4% และถึงแม้ว่าโครงสร้างไบโอฟิล์มของ *C. parapsilosis* จะซับซ้อนน้อยกว่า *C. albicans* แต่ก็สามารถทนต่อยาต้านเชื้อราทั่วไป เช่น amphotericin B และ สารประกอบ azole ดังนั้นการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* จึงเป็นปัญหาสำคัญในผู้ป่วยที่ใส่วัสดุเทียมในร่างกายในส่วนของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมร้อยละ 37.5 มีการสร้างไบโอฟิล์มปานกลาง และร้อยละ 62.5 มีการสร้างไบโอฟิล์มสูง

เอนไซม์โปรตีน มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนหรือลดประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีนที่ห่อหุ้มเซลล์ ทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านได้ง่ายขึ้น ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 74 ไอโซเลท พบว่าเชื้อส่วนมาก ร้อยละ 81.08 มีการผลิตเอนไซม์โปรตีน



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12  
"Global Goals, Local Actions: Looking Back and Moving Forward 2021"

สสูงจากหลายๆงานศึกษาพบว่า *C. albicans*, *C. tropicalis* และ *C. parapsilosis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆและเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสมากจะสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มได้ดีกว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสได้น้อยอย่างมีนัยสำคัญงานวิจัยของ Rossoni และคณะ [9] ได้ทำการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *Candida* ในหลอดทดลอง และความสัมพันธ์กับการก่อโรค โดยใช้ *Galleria mellonella* เป็นแบบจำลองในการศึกษา การสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *Candida* มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของ *G. mellonella* โดยมีค่า Pearson correlation = -0.571 ซึ่งพบว่าค่า Pz ของเชื้อ *C. parapsilosis* เฉลี่ยอยู่ที่ 0.47 (Pz < 0.64 หมายถึง มีการผลิตเอนไซม์มาก) และ *G. mellonella* ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *C. parapsilosis* มีอัตราการตายสูงถึง 56.28% ภายใน 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการสร้างไบโอฟิล์ม และการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* พบว่า ทั้ง 2 ปัจจัยไม่มีความสัมพันธ์กัน ทั้งนี้ ในงานวิจัยนี้ มีจำนวนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมน้อย จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อยืนยันผลการทดลองดังกล่าว

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มและการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 74 ไอโซเลท ซึ่งแบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิกและสิ่งแวดล้อม พบว่าเชื้อ *C. parapsilosis* ร้อยละ 68.92 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มต่ำ แต่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มปานกลางและมาก ส่วนการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อ *C. parapsilosis* ร้อยละ 81.08 มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสสูง และพบว่าเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสปานกลางและสูง จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสปานกลางและสูง จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นไปว่าการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสมีความสำคัญในการก่อโรค และไบโอฟิล์มอาจมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อในสิ่งแวดล้อม

### ข้อเสนอแนะ

ควรทำการไอโซเลทเชื้อจากสิ่งแวดล้อมเพิ่ม เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 66 ไอโซเลท ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้น อาจทำให้ไม่สามารถสรุป หรือเปรียบเทียบปัจจัยความรุนแรงของเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้ได้อย่างชัดเจน

### เอกสารอ้างอิง

1. Kuhn, D.M., et al. (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging infectious diseases*. 10(6): p. 1074.
2. Trofa, D., A. Gácser, and J.D. Nosanchuk. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 21(4): p. 606-625.
3. Greenspan, D. (1994). Treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 31(3): p. S51-S55.



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12  
"Global Goals, Local Actions: Looking Back and Moving Forward 2021"

4. Van, F.M., et al. (1994). A study of oral candidiasis in HIV-positive patients. Journal of dental hygiene: JDH. 68(1): p. 30-34.
5. Tumbarello, M., et al. (2007). Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. Journal of clinical microbiology. 45(6): p. 1843-1850.
6. Silva-Dias, A., Miranda, I. M., Branco, J., Monteiro-Soares, M., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. Frontiers in microbiology, 6, 205.
7. Naglik, J.R., et al. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. The Journal of infectious diseases,. 188(3): p. 469-479.
8. Rchel, R. (1992). Proteinase. New strategies in fungal disease. Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland,p. 17-31.
9. Rossoni, R.D., et al. (2013). Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. Brazilian Journal of Oral Sciences. 12(3): p. 199-204.