การศึกษาการจัดกลุ่มเชื้อ *Candida parapsilosis* sensu stricto ที่แยกได้จากทางคลินิกและสิ่งแวดล้อม โดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

Microsatellite typing of of *Candida parapsilosis* sensu stricto clinical and environmental isolates

ณัฐธิดา ชลนาคเกษม[1], ศรีสุดา ปัณณานุสรณ์[2]
[1,2]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

Candida parapsilosis sensu stricto เป็นยีสต์ชนิดหนึ่งที่มักอาศัยในร่างกายมนุษย์ สามารถแยกได้บ่อยจากนิ้วมือ ฝ่ามือ ซอกเล็บ หรือตามเยื่อบุต่างๆ โดยปกติแล้วเชื้อแคนดิดาจะก่อโรคก็ต่อเมื่อมีสภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ในปริมาณที่มากเกิน และก่อให้เกิดเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ในปัจจุบันเครื่องหมาย microsatellite เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดกลุ่ม *C. parapsilosis* sensu stricto เนื่องจากเครื่องหมายนี้ให้ระดับ polymorphism สูง มีอยู่จำนวนมาก กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนมาก ซึ่งความยาวของของ microsatellite ในสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์จะมีไม่เท่ากัน ทำให้เกิด polymorphism ซึ่งจะทำให้เห็นความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของ *C. parapsilosis* sensu stricto ได้ วัตุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาการใช้เทคนิค microsatellite ในการวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ที่แยกได้จากทางคลินิกและสิ่งแวดล้อม จำนวน 74 ไอโซเลท ผลการจัดกลุ่มเชื้อด้วยเทคนิค microsatellite พบว่าเครื่องหมาย CP1 CP4 และ CP6 มี polymorphism สูง ค่า discriminatory powerเท่ากับ 0.9968 และสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ (ร้อยละ 77.78) ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในเชื้อที่มีรูปแบบจีโนไทป์ที่เหมือนกัน จะมีความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรค (การสร้างไบโอฟิล์ม และการผลิตเอนไซม์โปรตีเนส) ที่ใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: *C. parapsilosis* sensu stricto, ไมโครแซทเทลไลท์, การจัดกลุ่มเชื้อ

Abstract

Candida parapsilosis sensu stricto is a yeast that commonly lives in the human body. It can often be isolated from fingers, palms, nooks of nails, or mucous membranes. The infection mainly occurs in patients with immune defective individuals, causing *C. parapsilosis* sensu stricto to grow in excess and causing an opportunistic infection. At present, microsatellite marker is widely used to typing *C. parapsilosis* sensu stricto because of high polymorphism rates, high abundance and a broad distribution throughout the genome. Therefore, it can be

used as a molecular marker to differentiate *C. parapsilosis* sensu stricto. This research aims to study microsatellite techniques to analyze genetic diversity of 74 *C. parapsilosis* sensu stricto clinical and environmental isolates. The microsatellite markers CP1, CP4, and CP6 showed high polymorphism. The discriminatory value was 0.9968 and classified all *C. parapsilosis* sensu stricto into three groups. Most of the environmental isolates (77.78%) were grouped into the same group. *C. parapsilosis* sensu stricto. Isolates with the same genotype had similar biofilm forming and proteinase producing capabilities.

Keyword: *C. parapsilosis* sensu stricto, Microsatellite, Genotyping

บทนำ

Candida parapsilosis sensu stricto เป็นสายพันธุ์ non-albicans มีรายงานระบุว่าเป็นสายพันธุ์ Candida ที่แยกได้มากที่สุดเป็นอันดับสองโดยการแยกจากเลือด ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญของมนุษย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา พบการติดเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto มาก ในผู้ที่มีการให้อาหารผ่านทางหลอดเลือดดำ หรือมีการฝังอุปกรณ์ สายสวนไว้ในร่างกาย ตลอดจนการแพร่กระจายของเชื้อในโรงพยาบาลผ่านมือของบุคลากรทางการแพทย์ [1, 2] ถึงแม้ว่าในเบื้องต้นจะมีการระบุว่า *C. parapsilosis* sensu stricto เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค แต่ในปี 1940 มีผู้ป่วยที่ใช้ยาเสพติดทางหลอดเลือดดำเสียชีวิตด้วยเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ซึ่งก็ยังถือว่ามีความรุนแรงน้อยกว่า *C. albicans* แต่ก็เป็น *Candida* ที่มีอัตราการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดนับตั้งแต่ปี 2533 [3] *C. parapsilosis* sensu stricto ยังสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ในอากาศ และพื้นผิววัสดุต่างๆ เคยมีการรายงานว่า *C. parapsilosis* sensu stricto จากสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาลสามารถทนต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิสของโฮสต์ได้ดีกว่า *C. parapsilosis* sensu stricto ที่แยกได้จากเลือด และจากการไอโซเลทจากสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาลประเทศบราซิลพบ *C. parapsilosis* sensu stricto มากเป็นอันดับ3 (19.6%) ของเชื้อแคนดิดาทั้งหมด [4, 5] ส่วนในประเทศไทยนั้นพบเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ในกระแสเลือดของผู้ป่วยคิดเป็น 78.79% และพบว่าเชื้อนี้สามารถสร้างไบโอฟิล์ม และผลิตเอนไซม์โปรตีเนสและฟอสโฟไลเปสได้ ซึ่งเป็นปัจจุยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในผู้ป่วย [16] ในประเทศโปรตุเกสและฝรั่งเศสพบเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto จากสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล เช่น อากาศ เครื่องมือ รวมถึงมือของบุคลากรทางการแพทย์มากถึง 77.17% และ 35.14% ของ *C. parapsilosis* sensu stricto ทั้งหมดตามลำดับ [6] แม้แต่สิ่งแวดล้อมภายในบ้าน เคยมีการรายงานว่าพบ *C. parapsiloisis* sensu stricto ได้บ่อยจากพื้นผิวห้องครัว และอุปกรณ์เครื่องใช้ในครัว เช่น เครื่องซักผ้า ตู้เย็น และพบการก่อตัวบนซีลยางของเครื่องล้างจานซึ่งมีความเข้มข้นสูงถึง 102 CFU / cm2 โดยเชื้อเหล่านี้มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์เป็นหนึ่งในปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค [7]

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellites เป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากให้ระดับ polymorphism สูง ต้องการดีเอ็นเอในการทดสอบปริมาณน้อย มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด codominant สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัส และเฮทเทอโรไซกัสได้ ทั้งนี้เพราะ SSRs มีอยู่จำนวนมากกระจายทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนมาก ซึ่งความยาวของของ microsatellites ในสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์จะมีไม่เท่ากัน ทำให้เกิด polymorphism ซึ่งจะทำให้เห็นความแตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ [8]

มีหลายเทคนิคที่ใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อแคนดิดา เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ MultiLocus Sequence Typing (MLST) [9-11] แต่เทคนิคเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto แต่ละสายพันธุ์ได้ เนื่องจากจีโนมของ *C. parapsilosis* sensu strictoแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันน้อยมาก โดยเทคนิค microsatellite ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการแยกความแตกต่างของ *C. parapsilosis* sensu stricto [12, 13] ซึ่งสามารถใช้เทคนิคนี้เพื่อระบุแหล่งที่มาของการติดเชื้อ และการแพร่กระจายของเชื้อในโรงพยาบาล

วัตถุประสงค์

ศึกษาการใช้เทคนิค microsatellite ในการวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto แต่ละสายพันธุ์

ขอบเขตของการวิจัย

ใช้เทคนิค microsatellite ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto โดยทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำงานของ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ วิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR และวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto แต่ละสายพันธุ์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ที่ใช้การวิจัย

ตาราง 1: เชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto 76 isolates (สายพันธ์มาตรฐาน ATCC22019 1 ไอโซเลท)

Environmental isolates (n = 9)	Clinical isolates (n = 66)
NGV Bus TU 1 (5)	Blood (52)
LC.5 Entrance door knob (1)	Cerebrospinal fluid (2)
Pediatric ward (2)	Peritoneal dialysis fluid (8)
Hospital walkway handrail (1)	Catheter and tissues biopsy (4)

2. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto [17]

นำเซลล์ยีสต์ที่บริสุทธิ์ปริมาณ 1 loop full ใส่ลงใน ddH2O (Double distilled water)แล้วทำการ vortex เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทำการละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไป vortex เป็นเวลา 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษเซลล์ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาทีแล้วนำสารส่วนบนไปใช้เป็น DNA แม่แบบในการทำ PCR

2. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) [4]

ตาราง 2: Mircrosatellite primers

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ฟลูออเรสเซนต์
CP1	FWD : 5'-AAAGTGCTACACACGCATCG- 3' REV : 5' -GGCTTGCAATTTCATTTCCT- 3'	5'TAMRA
CP4	FWD : 5' -CAAATCATCCAGCTTCAAACC- 3' REV : 5' -CATCAAACAAGAATTCGATATCAC- 3'	5'HEX
CP6	FWD : 5' -CAGGAACAGGACAATGGTGA- 3' REV : 5' -TCTGGAGCCTCTAGGACGTTT- 3'	5'FAM

ตาราง 3: ความเข้มข้นและปริมาณสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

สารที่ใช้ทำปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร
DNA template (25ng/µl)	25 ng/µl	1 µl
10X PCR buffer	1X	2.5 µl
20 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	0.2 mM (each)	0.25 µl (each)
50 mM $MgCl_2$	1.5 mM	0.75 µl
10 µM Forward primer	0.25 µM	0.6 µl
10 µM Reverse primer	0.25 µM	0.6 µl
5U/µl Taq DNA polymerase	1U	0.2 µl
ddH_2O		18.35 µl

ตาราง 4: ขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยา PCR ด้วย Microsatellite primer

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre denaturation	95	2 min	1
Denaturation	94	30 s	28
Annealing	54-60	30 s	28
Extension	72	1 min	28
Final Extension	72	7 min	1

4. วิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR [7]

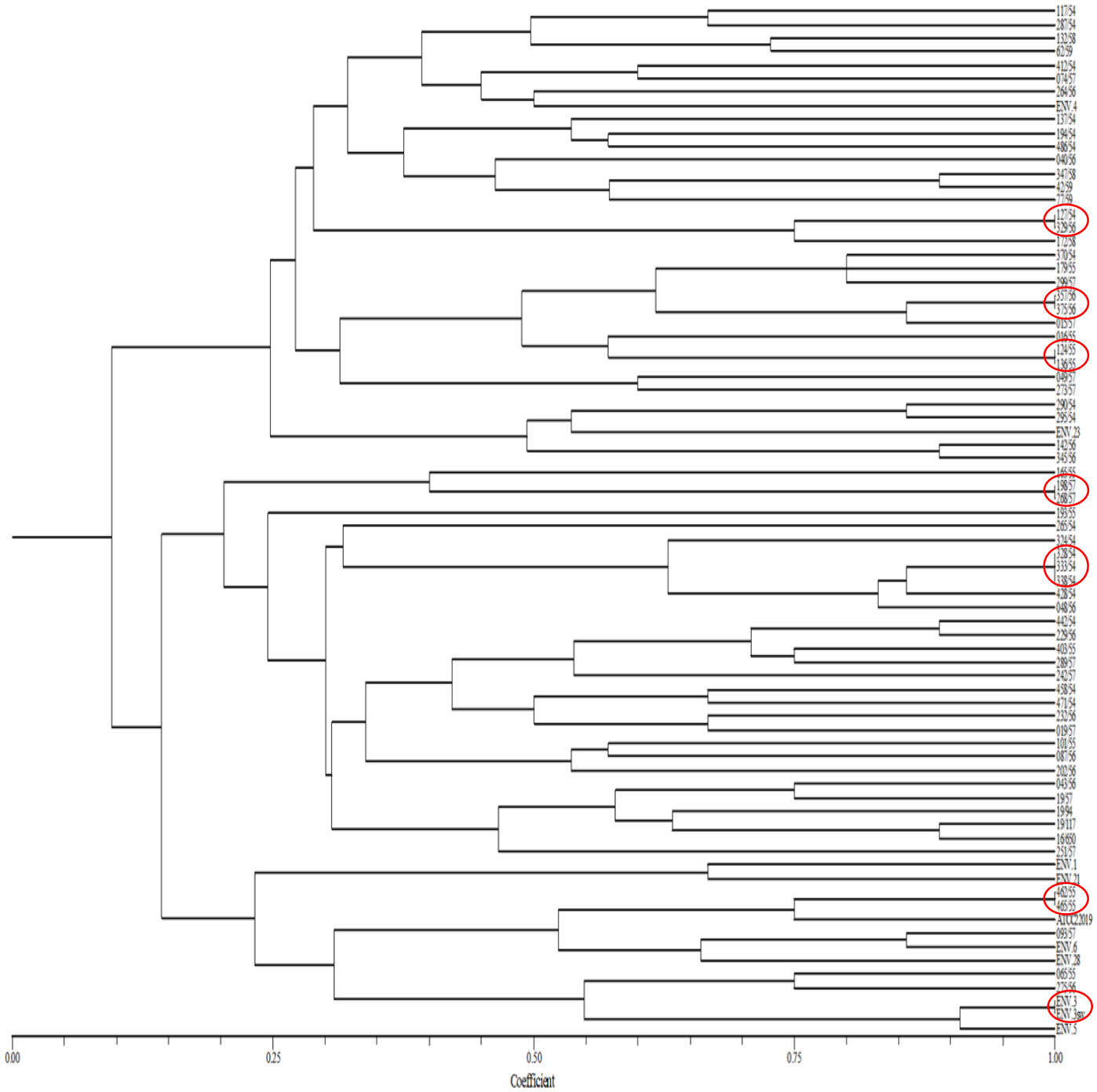
วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเครื่อง ABI310 Genetic Analyzer โดยนำ PCR product มาเจือจางความเข้มข้น 1:10 ด้วยน้ำกลั่น formamide 30 ไมโครลิตร และ 6-carboxytetramethylrhodamine size standards 0.7 ไมโครลิตร นำ PCR product ที่ได้มาทำให้เสียสภาพโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 8 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที นำ PCR product ที่ถูกทำให้เสียสภาพแล้วมาบรรจุลง ABI 310 genetic analyzer ทำการตั้งค่าพารามิเตอร์โดยตั้งค่า injection time ประมาณ 3 ถึง 8 วินาที injection voltage 15 kV อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และcollection time 29 นาที แล้ววิเคราะห์ข้อมูลขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยโปรแกรม GeneScan

ผลการวิจัย

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellites สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการแยกความแตกต่างของ *C. parapsilosis* sensu stricto จากผลจากทดลองพบว่า มีจำนวนจีโนไทป์ทั้งหมด 68 จีโนไทป์ ค่า discriminatory Power เท่ากับ 0.9968 และจากการจัดกลุ่มเชื้อ *C. parapsilosis sensu* stricto ด้วย ด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 7 ไอโซเลท จาก 9 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในงานวิจัยนี้มีเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 76 ไอโซเลท พบ มี 68 จีโนไทป์ที่แตกต่างกัน และมีจีโนไทป์ 7 รูปแบบที่เชื้อมีลักษณะจีโนไทป์รูปแบบเดียวกัน(ตาราง4)(รูป1 วงกลมสีแดง) รูปแบบที่ 1: 247/247 309/309 290/290 ได้แก่ เชื้อ no. 127/54 และ 329/56 รูปแบบที่ 2: 247/271 368/368 299/299 ได้แก่ no.357/56 และ 375/56 รูปแบบที่ 3: 247/247 302/302 299/299 ได้แก่ no. 124/55 และ 136/55 รูบแบบที่ 4: 226/244 325/350 260/260 ได้แก่ no. 198/57 และ 268/57 รูปแบบที่ 5: 244/244 353/353 273/273 ได้แก่ no. 328/54, 333/54 และ 338/54 รูปแบบที่ 6: 244/250 306/306 293/293 ได้แก่ no. 462/55 และ 465/55 รูปแบบที่ 7: 235/250 290/302 254/269 ได้แก่ ENV3 และ ENV3 switching ซึ่งเชื้อที่มีจีโนไทป์แบบเดียวกัน จะมีความสามารถในการจะมีความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรค (การสร้างไบโอฟิล์ม และการผลิตเอนไซม์โปรตีเนส) อยู่ในกลุ่มเดียวกัน

ตาราง 5: ตารางแสดงเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ที่มีจีโนไทป์แบบเดียวกัน

รูปแบบ genotype	Strains of *C. parapsilosis* sensu stricto	Multilocus genotype			Biofilm	Proteinase
		CP1	CP4	CP6		
1	127/54	247/247	309/309	290/290	Low	High
	329/56	247/247	309/309	290/290	Low	High
2	357/56	247/271	368/368	299/299	High	High
	375/56	247/271	368/368	299/299	High	High
3	124/55	247/247	302/302	299/299	Low	No
	136/55	247/247	302/302	299/299	Low	No
4	198/57	226/244	325/350	260/260	High	High
	268/57	226/244	325/350	260/260	High	High
5	328/54	244/244	353/353	273/273	Low	High
	333/54	244/244	353/353	273/273	Low	High
	338/54	244/244	353/353	273/273	Low	High
6	462/55	244/250	306/306	293/293	Low	High
	465/55	244/250	306/306	293/293	Low	High
7	ENV3	235/250	290/302	254/269	High	Medium
	ENV3switching	235/250	290/302	254/269	High	Medium



รูป1 : ภาพแสดงการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTsys

อภิปรายผลการวิจัย

เครื่องหมาย microsatellite ที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้แก่ CP1, CP4 และ CP6 พบว่ามี polymorphism สูง โดยเครื่องหมายเครื่องหมาย CP6 มีจำนวนอัลลีลสูงที่สุด จำนวน 21 อัลลีล รองลงมาได้แก่ CP4 และ CP1 โดยมีจำนวน 16 อัลลีล และ 12 อัลลีลตามลำดับ มีจำนวนทั้งหมด 68 จีโนไทป์ ค่า Discriminatory Power เท่ากับ 0.9968 ซึ่งสอดคล้องกับในหลายๆงานวิจัย ที่ใช้เครื่องหมายเหล่านี้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของเชื้อ *C. parapsilosis sensu* stricto ในงานวิจัยของ Sabino และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ *C. parapsilosis* sensu stricto จำนวน 236 ไอโซเลท พบว่าเครื่องหมาย CP1 มีจำนวน 20 อัลลีล CP4 และ CP6 มีจำนวนมากที่สุดถึง 42 อัลลีล และเครื่องหมาย B5 มี 22 อัลลีล ทั้ง 4 เครื่องหมายนี้สามารถจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อทั้งหมด 236 ไอโซเลท ได้ 192 จีโนไทป์ และมีค่า discriminatory power = 0.99 [4] ในอีกงานวิจัยได้ทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของ *C. parapsilosis* sensu stircto จำนวน 170 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากโรงพยาบาลในประเทศตุรกีระหว่างปีพ.ศ. 2549 -2557 โดยใช้ maker CP1, CP4, CP6 และ B5 นั้น พบว่า 4 marker นี้ มี polymorphism สูง โดยเครื่องหมาย CP6 มีจำนวนอัลลีลสูงที่สุด คือ 31 อัลลีล เครื่องหมาย CP4 18 อัลลีล เครื่องหมาย B5 17 อัลลีล และ CP1 7 อัลลีล [14] และงานวิจัยในประเทศสเปนทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของ C. parapsilosis sensu stircto จำนวน 35 ไอโซเลท พบจำนวนอัลลีลในเครื่องหมาย CP1 10 อัลลีล เครื่องหมาย CP4 19 อัลลีล เครื่องหมาย CP6 21 อัลลีล และ B5 18 อัลลีล [15] เครื่องหมาย microsatellite สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 3 กลุ่ม และเชื้อในสิ่งแวดล้อมร้อยละ 77.78 อาจเป็นเพราะเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม และเชื้อที่มีจีโนไทป์แบบเดียวกัน จะมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม และการผลิตเอนไซม์โปรตีเนสอยู่ในกลุ่มเดียวกันสามารถอธิบายได้ว่า เชื้อที่มีจีโนไทป์แบบเดียวกัน จะมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม หรือเป็นเชื้อสายพันธ์เดียวกัน จึงทำให้มีการแสดงออกของฟีโนไทป์ที่ใกล้เคียงกัน ส่วนเชื้อ ENV3 และ ENV3switching เป็นเชื้อสายพันธ์เดียวกันที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม แต่ ENV3swithcing เป็นเชื้อที่เกิด phenotypic switching เป็นแบบ crepe เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมาย microsatellite แล้วพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทนี้ มีจีโนไทป์แบบเดียวกัน เป็นไปได้ว่า การเกิด phenotypic switching ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าว ในหลายๆงานวิจัยจะใช้เครื่องหมาย microsatellite 4 เครื่องหมาย นั่นได้แก่ CP1, CP4, CP6 และ B5 แต่ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องหมาย microsatellite เพียงแค่ 3 เครื่องหมายเท่านั้นนั่นคือ CP1, CP4 และ CP6 เนื่องจากผู้วิจัยมีความเห็นว่า 3 เครื่องหมายนี้ ค่า discriminatory power (DP) ที่สูงเพียงพอในการจำแนกเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto โดยเครื่องหมาย CP1 ค่า DP= 0.85, CP4 ค่า DP= 0.89 และ CP6 ค่า DP= 0.96 [4] การศึกษาความหลายหลากทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ด้วยเครื่องหมาย microsatellite CP1, CP4 และ CP6 สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำการวิจัยเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรค รวมถึงการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ได้

สรุปผลการวิจัย

เครื่องหมาย microsatellite CP1, CP4 และ CP6 มี polymorphism สูง มี 68 จีโนไทป์ ค่า discriminatory power เท่ากับ 0.9968 โดยเครื่องหมายเครื่องหมาย CP6 มีจำนวนอัลลีลสูงที่สุด จำนวน 21 อัลลีล รองลงมาได้แก่ CP4 และ CP1 โดยมีจำนวน 16 อัลลีล และ 12 อัลลีลตามลำดับ การจัดกลุ่มเชื้อด้วยเครื่องหมาย microsatellite ของเชื้อ *C. parapsilosis* sensu stricto ทั้ง 76 ไอโซเลท พบว่าสามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน อาจเป็นเพราะเชื้อจากสิ่งแวดล้อมมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม ส่วนเชื้อที่มีรูปแบบจีโนไทป์ที่เหมือนกัน จะมีความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรค (การสร้างไบโอฟิล์มและการผลิตเอนไซม์โปรตีเนส) ที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากเชื้อมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม จึงทำให้มีการแสดงออกของฟีโนไทป์ที่ใกล้คล้ายคลึงกัน

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการไอโซเลทเชื้อจากสิ่งแวดล้อมเพิ่ม เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีเชื้อที่แยกได้จากทางคลินิก 66 ไอโซเลท ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีเพียง 9 ไอโซเลทเท่านั้น อาจทำให้ไม่สามารถสรุปการจัดกลุ่มเชื้อที่แยกสิ่งแวดล้อมได้อย่างชัดเจน

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, Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. Clinical microbiology reviews, 2008. 21(4): p. 606-625.
3. Joachim, H. and S.H. Polayes, Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). Journal of the American Medical Association, 1940. 115(3): p. 205-208.
4. Sabino, R., et al., New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among Candida parapsilosis sensu stricto isolates. Journal of clinical microbiology, 2010. 48(5): p. 1677-1682.
5. Sabino, R., et al., Isolates from hospital environments are the most virulent of the Candida parapsilosiscomplex. 2011. 11(1): p. 180.
6. Storti, L.R., et al., Candida spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the Universitary Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. 2012. 45(2): p. 225-231.
7. Sabino, R., et al., Analysis of clinical and environmental Candida parapsilosis isolates by microsatellite genotyping—a tool for hospital infection surveillance. 2015. 21(10): p. 954. e1-954. e8.

8. Miah, G., et al., A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. International journal of molecular sciences, 2013. 14(11): p. 22499-22528.
9. Tavanti, A., et al., Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. Journal of clinical microbiology, 2005. 43(1): p. 284-292.
10. Tavanti, A., et al., Genotyping of Candida orthopsilosis clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. Journal of clinical microbiology, 2007. 45(5): p. 1455-1462.
11. Bonfim-Mendonça, P.d.S., et al., Molecular typing of Candida albicans isolates from hospitalized patients. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2013. 55(6): p. 385-391.
12. van Asbeck, E.C., K.V. Clemons, and D.A. Stevens, Candida parapsilosis: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Critical reviews in microbiology, 2009. 35(4): p. 283-309.
13. Pulcrano, G., et al., MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate Candida parapsilosis transmission in neonatal intensive care units. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 2012. 31(11): p. 2919-2928.
14. Hilmioğlu-Polat, S., et al., Genetic diversity and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis sensu stricto isolated from bloodstream infections in Turkish patients. Mycopathologia, 2018. 183(4): p. 701-708.
15. Trobajo-Sanmartín, C., et al., Design and validation of a multiplex PCR protocol for microsatellite typing of Candida parapsilosis sensu stricto isolates. BMC genomics, 2018. 19(1): p. 718.
16. Pharkjaksu, S., Chongtrakool, P., Suwannakarn, K., & Ngamskulrungroj, P. (2018). Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among Candida parapsilosis complex isolates from clinical specimens at Siriraj Hospital, Thailand, from 2011 to 2015. *Medical mycology*, *56*(4), 426-433.
17. Pannanusorn, S., et al., *Pyrosequencing of a hypervariable region in the internal transcribed spacer 2 to identify clinical yeast isolates.* 2012. **55**(2): p. 172-180.