บทที่ 3

แคนดิดา

1. ประวัติ

ตั้งแต่สมัยฮิปโปเครติส ได้มีการบรรยายลักษณะทางคลินิกที่เข้าได้กับโรคราจากเชื้อ *Candida* ในปี ค.ศ. 1839 Langenbeck ได้พบเชื้อราตัวนี้จากฝ้าขาวในปาก (Thrush) ในปี ค.ศ. 1841 Berg และ ในปี ค.ศ. 1844 Bennett ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราตัวนี้เป็นสาเหตุของฝ้าขาวในปาก (Thrush) ในปี ค.ศ. 1877 Grawitz ได้บรรยายลักษณะของเชื้อรานี้ว่าเป็น dimorphic ช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 18และต้นคริสต์ศตวรรษที่ 19 มีการบรรยายลักษณะทางคลินิกต่าง ๆ ของโรคราที่เกิดจากเชื้อ *Candida* ในระหว่างนี้มีการสับสนของเชื้อนี้กับเชื้อราที่เพาะขึ้นจากพืชผักเน่าเปื่อยจึงได้มีการเรียกเชื้อนี้ว่า Monilia ต่อมาในปี ค.ศ. 1923 Berkhout ได้ตั้งชื่อเชื้อราตัวนี้ว่า *Candida*[40]

2. คำจำกัดความ

Yeasts จัดเป็นเชื้อราที่มีเซลล์เดียว (unicellular) colony มีลักษณะเปียกชื้นคล้ายเนย หรือ colony ของแบคทีเรีย ไม่สร้างสายราอากาศ (aerial hyphae) ดังนั้นcolonyจึงไม่ฟู แต่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสายราดูดอาหารทั้งที่เป็นสายราแท้และสายราเทียม (true และ pseudohyphae)[41]

เซลล์ของ yeasts มีรูปร่างกลม รี หรือรูปอื่น ๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 ไมโครเมตร สีของ yeastsมีได้ต่าง ๆกันขึ้นกับสายพันธุ์ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (blastoconidia) หรือโดยการแบ่งสอง (binary fission) yeasts ที่มีความสำคัญทางการแพทย์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ หน่อที่เกิดใหม่ (daughter cell) สามารถติดกับเซลล์พ่อแม่ (parents cell)และแตกหน่อต่อเนื่องกันเป็นสาย สายที่เกิดขึ้นแบบนี้เรียกว่าสายราเทียม (pseudohyphae) ส่วนสายราแท้เกิดจากการสร้างท่องอก (germ tube) ออกจากเซลล์

ในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งจะยาวเรื่อยๆและสร้างผนังกั้น การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ yeasts สร้างสปอร์ 2 ชนิด คือ ascospore และ basidiospore[41]

เชื้อ *Candida* เป็นเชื้อ yeasts ซึ่งอยู่ใน Phylum Deuteromycota (Fungi Imperfecti) ซึ่งยังไม่พบว่ามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ อยู่ใน Class Blastomycetes และอยู่ใน Family Cryptococcaceae[40]

ตารางที่ 5 แสดง Genus ของ yeasts ใน Family Cryptococcaceae[40]

Family Cryptococcaceae
Genus 1 : *Cryptococcus*
Genus 2 : *Malassezia*
Genus 3: *Rhodotorula*
Genus 4: *Candida*
Genus 5 : *Trichosporon*
Genus 6 : *Torulopsis*

เชื้อ *Candida* มีรูปร่างกลม หรือรี มีการแตกหน่อ (budding, blastoconidia) เซลล์มีขนาดกว้างประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 1-4 ไมโครเมตร อยู่โดดเดี่ยว หรือเป็นสาย มีทั้งสายราแท้และสายราเทียม ดังนั้น จึงจัดเป็น dimorphic fungi คือสามารถมีลักษณะได้ทั้ง yeasts และราสาย ภายในร่างกายมีปัจจัยหลายประการที่ทำให้เชื้อ *Candida* เปลี่ยนรูปจาก yeasts เป็นราสาย เช่น อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศา เซลเซียส ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ลดลง ภาวะที่เป็นน้ำ กรดอะมิโนที่ไม่มีกำมะถัน ซีรั่มและในอวัยวะอื่น ๆที่มี pH 7.5[41]

3. นิเวศน์วิทยา

เชื้อ *Candida* สามารถพบได้ในคนปกติโดยไม่ทำให้เกิดโรค โดยอาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร ตั้งแต่ปาก หลอดอาหาร และลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบที่ช่องคลอดด้วย เชื้อนี้

พบได้บ้างในดิน พืชผัก และอากาศ เชื้อ *Candida albicans* เพาะขึ้นได้น้อยมากจากผิวหนังของคนปกติ ยกเว้น บริเวณซอกพับ (intertriginous area) อาจเพาะเชื้อขึ้นได้บ้าง [40,41]

4. โรคที่เกิดจากเชื้อ *Candida*

เชื้อ *Candida* ก่อโรคได้ทั้งที่ผิวหนังและอวัยวะภายใน ลักษณะทางคลินิกของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Candida* [40] แบ่งได้ดังนี้ คือ

1. โรคติดเชื้อ

1.1 โรคติดเชื้อของเยื่อบุผิวหนัง

1.1.1 โรคติดเชื้อในช่องปาก ได้แก่ thrush , antibiotic candidiasis, denture stomatitis , perleche , median rhomboid glossitis และ black hairy tongue

1.1.2 โรคติดเชื้อของทางเดินอาหาร ได้แก่ หลอดอาหารอักเสบ (esophagitis) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) โรคติดเชื้อ*Candida* บริเวณลำไส้ และทวารหนัก

1.1.3 โรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอดและอวัยวะเพศ ได้แก่ vaginitis , balanitis

1.1.4 Chronic mucocutaneous candidiasis เป็นโรคติดเชื้อจาก*Candida* ที่เยื่อบุ และผิวหนัง มักเกิดการติดเชื้อที่หน้า ลิ้น เยื่อบุช่องปาก และผิวหนัง เกิดเป็น granulomatous candidiasis ทั่วตัว พบในคนที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมหลายอย่าง มักพบในเด็ก ผู้ป่วยจะมีความผิดปกติของการทำงานของเม็ดเลือดขาว และความผิดปกติของต่อมไร้ท่อร่วมด้วย โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่1 ต่อมไทมัส (thymus)ไม่เจริญ ทำให้มีความผิดปกติของภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity และ กลุ่มที่ 2 เป็นพวกที่มีความผิดปกติของต่อมไร้ท่อหลายอย่าง ได้แก่ familial juvenile hypoparathyroidism , hypoadrenocorticism และ thymoma ในผู้ใหญ่

1.2 โรคติดเชื้อของผิวหนัง

1.2.1 การติดเชื้อราจาก *Candida* บริเวณข้อพับ (intertriginous candidiasis)

1.2.2 การติดเชื้อราจาก *Candida* บริเวณที่ใส่ผ้าอ้อมเด็ก (diaper dermatitis)

1.2.3 โรคราที่เล็บ และ paronychia

1.2.4 Candidal granuloma มักเกิดในเด็ก พบได้น้อยมาก เป็นตุ่มแข็ง มีเส้นเลือดมาเลี้ยงมากมาย มีตุ่มหนองและสะเก็ดน้ำเหลือง ตุ่มแข็งแต่ละกลุ่มอาจรวมตัวกันทำให้เกิดก้อนสะเก็ดน้ำเหลือง เมื่อเอาสะเก็ดออกจะพบ granuloma อยู่ข้างใต้ และมีเลือดออก พบที่ศีรษะ หน้า ปลายนิ้ว ลำตัว ขา ถ้าเป็นรุนแรงจะพบที่ปาก ลำคอ กล่องเสียง และเป็นทั้งตัวได้ เกิดจากความบกพร่องของภูมิคุ้มกัน ได้แก่ delayed cutaneous anergy , เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ต่ำ , ไม่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ *Candida* antigen

1.3 โรคติดเชื้อตามระบบต่างๆในร่างกาย

1.3.1 โรคติดเชื้อบริเวณหลอดลมและปอด

1.3.2 โรคติดเชื้อบริเวณทางเดินปัสสาวะ

1.3.3 ลิ้นหัวใจอักเสบ

1.3.4 เยื่อหุ้มสมองอักเสบ

1.3.5 การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia)

1.3.6 การติดเชื้อ *Candida* แบบแพร่กระจาย (disseminated candidiasis)

2. โรคภูมิแพ้

2.1 โรคหอบหืด

2.2 gastritis

2.3 eczema

2.4 candidids

เชื้อ *Candida* ทุกสายพันธุ์สามารถก่อโรคราที่เกิดจาก*Candida* ได้ทุกโรค อย่างไรก็ตาม แต่ละสายพันธุ์อาจพบบ่อยในแต่ละโรคต่างกันไป ในขณะที่ *Candida albicans* เป็นตัวที่สำคัญที่สุดในการก่อโรคทุกโรคจาก*Candida* เชื้อ *Candida* สายพันธุ์อื่นพบได้บ่อยในโรคต่างๆ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสายพันธุ์ของเชื้อ *Candida* ที่พบได้บ่อยในโรคต่างๆ[42]

สายพันธุ์ของเชื้อ *Candida*	โรค
C. parapsilosis	Paronychia , ลิ้นหัวใจอักเสบ , หูชั้นนอกอักเสบ
C. tropicalis	โรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอด , ลำไส้, หลอดลมและปอด, กระดูกและข้อ, ระบบประสาทส่วนกลาง, การติดเชื้อตามระบบอื่นๆในร่างกาย , โรคราที่เล็บ
C. stellatoidea	โรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอด ,กระดูกและข้อ, การติดเชื้อตามระบบอื่นๆในร่างกาย
C. guilliermondii	ลิ้นหัวใจอักเสบ , โรคราที่เล็บ , โรคราที่ผิวหนัง, โรคติดเชื้อของกระดูกและข้อ
C. kefyr	โรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอด , ทางเดินปัสสาวะ
C. (Torulopsis) glabrata	โรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอด , ลิ้นหัวใจอักเสบ , การอักเสบของหลอดอาหาร
C. krusei	โรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอด , ลิ้นหัวใจอักเสบ
C. zeylanoides	โรคราที่เล็บ
C. viswanathi	โรคติดเชื้อบริเวณระบบประสาทส่วนกลาง
C. lusttaniae	การติดเชื้อตามระบบอื่นๆในร่างกาย

5. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ และ การจำแนกสายพันธุ์

จากตำแหน่งที่เป็นโรค ทำการขูดหรือป้ายมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยหยดน้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10-20 ลงบนสิ่งที่นำมาตรวจ หรือ ย้อมด้วยสีกรัม (gram stain) เชื้อ *Candida* จะติดสีกรัมบวก ปรากฏเซลล์ yeasts และสายรา สิ่งที่ส่งมาตรวจที่มาจากเสมหะ ช่องคลอด ปัสสาวะ หรือ อุจจาระ ถ้าพบเชื้อ *Candida* อย่าเพิ่งแน่ใจว่าเป็นสาเหตุก่อโรค เพราะบริเวณดังกล่าวพบเชื้อ *Candida* ได้อยู่แล้ว ถ้าพบเชื้อ *Candida* จำนวนมากและสร้างสายราให้สงสัยว่าน่าจะเป็นสาเหตุก่อโรค[41]

เชื้อ *Candida* ขึ้นง่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา วุ้นเพาะเลี้ยงควรผสมยาปฏิชีวนะลงไปเพื่อฆ่าแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมากับสิ่งส่งตรวจ เชื้อ *C. tropicalis* , *C. krusei* และ *C. parapsilosis* จะไวต่อ cycloheximide (actidione) เชื้อ *Candida* จะปรากฏcolony

ภายใน 24 -48 ชั่วโมง เมื่อปรากฏ colonyแล้วให้เขี่ยออกมาและหยด lactophenol cotton blue ลงไปเพื่อดูลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่าจะพบเซลล์ yeasts รูปกลม หรือ รี[40]

การทดสอบอื่น ๆที่จำเป็นในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Candida* คือ

1. การสร้างท่องอก (germ tube test)[41,43,44]

ใช้ซีรั่มกระต่าย ม้า แกะหรือของหนูตะเภา นอกจากนี้อาจใช้ peptone หรือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น tissue culture 199, trypticase soy broth หรือ ไข่ขาวก็ได้ ถ้าจำเป็นต้องใช้ซีรั่มของคน ควรคำนึงด้วยว่าซีรั่มของคนมี transferrin (เหล็กรวมกับโปรตีน) สามารถกดการสร้างท่องอกของเชื้อ *Candida* ได้ นำซีรั่มดังกล่าวมาประมาณ 0.3 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง เขี่ย yeasts ลงในซีรั่มประมาณ 1 วง (loop) หรือ 10^5- 10^6 เซลล์/มล. เกลี่ยให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1.5-3 ชั่วโมง จากนั้นทำ wet mount สังเกต germ tube ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 x หรือ 40 x

ประมาณร้อยละ 95 ของ *C. albicans* และ *C. stellatoidea* จะสร้างท่องอกได้ *C. tropicalis* สร้างท่องอกได้ร้อยละ 2.4 ยังมีเชื้อ *Candida* อื่นที่สร้างท่องอกได้แต่ไม่ใช่ในเวลา 1.5-3 ชั่วโมง ได้แก่ *C. utilis* , *C. rugosa* , *C. shizosaccharomyces fragilis* , *C. australis* , *C. clausenii*

2. ทดสอบการสร้าง chlamydoconidia [41,43,44]

2.1 เตรียมวุ้นแป้งข้าวเหนียว glutinous rice ซึ่งผสมด้วย Tween 80 วุ้นเพาะนี้จัดว่าเป็นอาหารที่ขาดแคลนสำหรับเชื้อ*Candida* กระตุ้นให้เชื้อบางสายพันธุ์สร้าง chlamydoconidia ขึ้น

ส่วนประกอบของ Glutinous rice agar

Glutinous rice powder	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
Agar	10	กรัม
Tween	2.5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 หลังจากนั้นจึงนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาทีแล้วจึงเทใส่จาน (plate)

2.2 streak เชื้อลงบนวุ้นดังกล่าว ปิดทับรอย streak ด้วย coverslip บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 x หรือ 40 x เพื่อตรวจหา chlamydoconidia

C. albicans , C. australis, C. clausenii, บางสายพันธุ์ของ *C. stellatoidea* และ *C. tropicalis* สามารถสร้าง chlamydoconidia ได้

3. การทดสอบการหมักน้ำตาล (Fermentation test)[41,43,44]

เพื่อดูความสามารถของเชื้อ ในการใช้น้ำตาลในสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งแต่ละเชื้อจะมีคุณสมบัติเฉพาะในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในสภาพไร้ออกซิเจนได้ไม่เหมือนกัน อาศัยหลักการที่ว่าเชื้อ *Candida* สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนลดลง และมีเอนไซม์ เช่น alcohol dehydrogenase และ pyruvate decarboxylase ประกอบกับกลไกชักนำคาร์โบไฮเดรตผ่านเนื้อเยื่อในภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนจึงสามารถนำน้ำตาลมาใช้ได้ตามสมการนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$
(ethanol)

3.1 เตรียม fermentation broth

ส่วนประกอบของ fermentation broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.
Bromcresol purple	1	มล.

(stock solution ซึ่งประกอบด้วย Bromcresol purple1.6 มล. ในน้ำ 100 มล.)

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 แล้วใส่หลอดทดลองที่มี Durham tube หลอดละ 4.5 มล. หลังจากนั้นจึงนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.2 เตรียมสารละลายน้ำตาล 6 ชนิด ได้แก่ glucose , maltose , sucrose, lactose, galactose, trehalose ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยวิธีปราศจากเชื้อ

3.3 เตรียมเชื้อ *Candida* ที่ active โดยการ subculture เชื้อใน Saboraud' s dextrose broth (ซึ่งเตรียมจาก Neopeptone 10 กรัม , Bacto- dextrose 20 กรัม และ น้ำกลั่น 1,000 มล. นำไปนึ่งที่ 121 องศา เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที) 3 มล. แล้วเขย่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นล้างด้วยเครื่อง centrifuge ความถี่ 4,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง แล้วนำเชื้อมาใส่ในน้ำกลั่นด้วยวิธีปราศจากเชื้อให้มีความขุ่น 4 McFarland ซึ่งประมาณได้เท่ากับ 12 X 10^8 เซลล์/ มล. ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดง McFarland nephelometer standards

McFarland	0.5	1	2	3	4	5	6	7
Barium chloride (มล.)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Sulfuric acid (มล.)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3
ความหนาแน่นของเซลล์ (X 10^8 เซลล์/ มล.)	1	3	6	9	12	15	18	21

3.4 ใช้ปิเปตดูดสารละลายน้ำตาล 6 ชนิดๆละ 0.5 มล. และเชื้อ *Candida* ที่เตรียมไว้ 0.5 มล.ใส่ในแต่ละหลอด แล้วใช้ sterile liquid paraffin 1.5 มล. ปิดทับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตก๊าซใน Durham tube และสีของ Bromcresol purple (ถ้าเป็นกรดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) ในวันที่ 3, 5, 7 และ 14 วัน การแปลผลดูได้ตามตารางที่ 8

4. การทดสอบการใช้น้ำตาล (Carbon assimilation test)[41,43,44]

การทดสอบนี้อาศัยหลักการที่ว่า yeasts บางสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลเพื่อการสร้างพลังงานและการเจริญในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน การทดสอบการใช้น้ำตาลจะต้องเลี้ยงเชื้อ yeasts ในภาวะที่มีอาหารอื่นครบถ้วนนอกจากน้ำตาล แล้วจึงเติมน้ำตาลที่จะทดสอบแต่ละชนิด การอ่านผลดูจากการเจริญของเชื้อ

4.1 Auxanographic method

4.1.1 เตรียม Yeast nitrogen base (YNB) agar

ส่วนประกอบของ Yeast nitrogen base (YNB) agar

Yeast nitrogen base	0.67	กรัม
Noble Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลาย Noble Agarในน้ำกลั่น 980 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.2 หลังจากนั้นจึงนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสม Yeast nitrogen base ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 20 มล. แล้วจึงเทใส่จานทิ้งไว้ให้แข็งตัว

4.1.2 เตรียมสารละลายน้ำตาล 12 ชนิด ได้แก่ glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose, melibiose, cellobiose, inositol, xylose, raffinose, trehalose, dulcitol ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยวิธีปราศจากเชื้อ หยดน้ำตาลแต่ละชนิดๆละ 50 µl ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 8x 8 มม. ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส

4.1.3 วางกระดาษกรองที่มีน้ำตาล 12 ชนิดบน Yeast nitrogen base (YNB) agar แล้วหยดเชื้อ *Candida* ที่ active ความขุ่น 4 McFarland 50 µl ลงบนกระดาษกรองแต่ละอัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-5 วัน ให้สังเกตการเจริญของเชื้อรอบกระดาษกรอง ถ้าพบรอยขุ่นของเชื้อรอบกระดาษกรองนั้น แสดงว่า สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นในการเจริญได้ การแปลผลดูได้ตามตารางที่ 8

4.2 API test kit (API 20 C AUX Meditop^{R})

เป็นชุดสำเร็จรูปที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ yeasts ประกอบไปด้วย

4.2.1 ถาดที่มีช่อง 20 ช่องซึ่งมีน้ำตาล 19 ช่อง ๆละ 1 ชนิดดังตารางที่ 9 และช่องที่ไม่มีน้ำตาล 1 ช่องไว้เป็นตัวควบคุม (negative control)

4.2.2 C Medium ซึ่งประกอบด้วย

ammonium sulphate	5	กรัม
monopotassium phosphate	0.31	กรัม
dipotassium phosphate	0.45	กรัม
disodium phosphate	0.92	กรัม

sodium chloride	0.1	กรัม
calcium chloride	0.05	กรัม
magnesium sulphate	0.2	กรัม
histidine	0.005	กรัม
tryptophan	0.02	กรัม
methionine	0.02	กรัม
agar	0.5	กรัม
สารละลายวิตามิน	1	มล.
trace elements	10	มล.
น้ำกลั่น	1,000	มล.

pH 6.5-6.7

เตรียมเชื้อ *Candida* ที่ active ให้มีความขุ่น 2 McFarland แล้วนำเชื้อที่เตรียม 100 µl ใส่ใน C medium ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปหยอดในถาดแต่ละช่องทั้ง 20 ช่อง ให้เต็มพอดีโดยไม่มีฟองก๊าซ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความขุ่นในแต่ละช่องของน้ำตาลเมื่อเปรียบเทียบกับช่องควบคุมที่ไม่มีน้ำตาล แปลผลตามตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แสดงการดูดแบคทีเรียของ yeasts โดย Assimilation และ Fermentation test

Organism	Surface Growth on Sabouraud Broth	Sugar Assimilation												Sugar Fermentation					
		Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Melibiose	Cellobiose	Inositol	Xylose	Raffinose	Trehalose	Dulcitol	Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Trehalose
C. albicans	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	AG	AG	A	0	AG or A	AG or A
C. stellatoidea	0	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+*	0	AG	AG	0	0	0	0
C. tropicalis	+ (film)	+	+	+	0	+	0	+*	0	+	0	+	0	AG	AG	AG	0	AG	AG
C. pseudo-tropicalis	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+*	+	0	0	AG	0	AG	AG	AG	AG
C. krusei	+ (film)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	AG	0	0	0	0	0
C. parapsilosis	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	AG	0	0	0	AG	AG or A
C. guilliermondii	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	AG	0	AG	0	AG or A	AG or A
C. rugosa	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0*	0	0	0	0	0
Saccharomyces cerevisiae	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	+	+*	0	AG	AG	AG	0	AG	AG*
Geotrichum candidum	0	+	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Torulopsis glabrata	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	AG	0	0	0	0	+
Trichosporon cutaneum	0	+	+*	+*	+	+	+*	+	+*	+	+*	++*	+*	0 or A	0 or A	0 or A	0 or A	0 or A	0 or A

* Strain variation.
A = acid; G = gas; + = reaction; 0 = no reaction.

ตารางที่ 9 แสดงการจำแนกสายพันธุ์ของ yeasts โดย API test kit

api 20 C AUX V 1.0

	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH
Candida albicans	0	100	14	100	2	95	94	96	100	0	94	85	99	0	0	100	97	97	4	0	100
Candida ciferrii	0	100	80	80	100	100	70	60	100	100	50	0	100	60	0	95	100	100	0	100	100
Candida guilliermondii	0	100	100	88	90	93	94	99	99	0	97	96	99	99	0	94	100	99	94	95	46
Candida humicola	0	100	82	100	100	100	36	64	100	100	95	100	100	91	100	100	82	99	95	100	100
Candida krusei	0	100	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0	0	95
Candida lambica	0	100	70	0	0	97	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	100
Candida lipolytica	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	28	0	40	0	0	0	0	0	0	0	93
Candida lusitaniae	0	100	95	95	1	80	95	40	40	0	99	60	95	80	0	100	99	100	99	0	100
Candida norvegensis	0	100	75	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	98	0	0	0	0	0	0	100
Candida parapsilosis	0	100	95	91	98	98	95	3	99	0	99	93	99	0	0	100	100	97	99	0	99
Candida paratropicalis	0	100	6	100	0	100	100	4	100	0	100	0	100	0	0	48	4	100	0	0	100
Candida pseudotropicalis	0	100	69	0	31	91	4	47	100	0	39	0	0	8	99	0	100	1	0	100	89
Candida rugosa	0	100	74	0	5	79	5	44	100	0	99	0	55	0	0	0	0	0	0	0	100
Candida stellatoidea	0	100	0	100	0	90	1	75	100	0	70	0	100	0	0	90	0	5	0	0	90
Candida tropicalis	0	100	32	100	0	98	99	23	99	1	100	96	99	24	0	100	100	99	99	0	100
Candida zeylanoides	0	100	100	95	0	0	5	0	1	0	100	0	100	0	0	0	0	74	0	0	100
Torulopsis candida	0	100	98	100	60	80	100	90	100	0	100	99	100	98	70	100	100	99	80	95	1
Torulopsis glabrata	0	100	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	94	0	0	1
Torulopsis inconspicua	0	100	77	57	0	0	0	0	2	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0	0	3
Torulopsis magnoliae	0	100	100	50	0	0	0	33	0	0	99	0	0	0	0	0	100	0	0	84	0
Torulopsis maris	0	100	66	0	0	60	16	83	100	0	83	0	16	0	0	0	0	0	0	0	16
Cryptococcus albidus var albidus	0	100	0	98	96	100	6	12	18	81	93	81	18	100	43	100	100	82	98	43	0
Cryptococcus albidus var diffluens	0	100	0	97	96	100	0	6	0	68	75	50	0	100	0	100	100	93	93	68	0
Cryptococcus laurentii	0	100	15	92	100	100	69	76	100	84	53	76	92	96	99	92	99	92	96	99	0
Cryptococcus neoformans	0	100	1	100	24	95	71	1	97	97	100	99	88	40	0	100	100	75	97	88	0
Cryptococcus terreus	0	100	0	100	76	100	0	0	45	36	100	0	90	95	36	9	9	54	0	0	0
Cryptococcus uniguttulatus	0	100	12	100	100	100	12	0	1	99	50	87	95	0	0	100	100	62	100	25	0
Rhodotorula glutinis	0	100	50	12	87	87	50	37	62	0	37	25	0	0	0	87	100	87	87	100	4
Rhodotorula minuta	0	100	100	100	99	95	15	1	0	0	40	0	95	60	0	0	95	95	95	0	0
Rhodotorula pilimanae	0	100	50	1	90	100	80	50	30	0	30	0	0	0	0	0	100	75	0	100	0
Rhodotorula rubra	0	100	50	0	66	87	58	41	78	0	29	1	0	1	0	99	100	98	95	95	8
Trichosporon beigelii	0	100	45	98	95	100	32	35	93	53	26	76	95	98	99	93	80	76	63	46	100
Trichosporon capitatum	0	100	90	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	100
Trichosporon penicillatum	0	100	100	0	0	100	0	0	83	0	88	0	5	0	0	0	0	0	0	0	100
Geotrichum spp	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Hanseniaspora uvarum/ guill.	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	66
Hanseniaspora valbyiensis	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	66
Hansenula anomala	0	100	100	0	0	67	2	9	56	0	89	100	2	78	0	93	100	97	98	48	86
Kluyveromyces lactis	0	100	86	7	0	7	0	71	100	0	100	88	0	71	84	100	100	93	100	84	40
Saccharomyces cerevisiae	0	100	15	0	0	0	0	0	92	0	6	30	0	0	0	92	100	61	30	92	15
Saccharomyces rosei	0	100	60	100	0	0	0	20	1	0	90	0	0	0	0	0	100	85	0	75	0
Saccharomyces uvarum	0	100	75	0	0	0	0	0	100	0	99	75	0	0	0	100	100	33	66	100	12
Sporobolomyces salmonicolor	0	100	5	0	0	0	33	0	5	0	92	0	0	0	0	0	100	100	0	95	100

6. พยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อจาก *Candida* และโรคราที่เล็บจากเชื้อ *Candida*

เนื่องจากเชื้อ *Candida* สามารถพบได้ในคนปกติโดยไม่ทำให้เกิดโรค ภาวะที่มีการถลอก ชื้น ขาดอาหาร ตั้งครรภ์ มีประจำเดือน มีโรคประจำตัวหรือใช้ยาบางอย่างจะมีโอกาสเกิดโรคติดเชื้อจาก *Candida* เพิ่มขึ้น ดังนั้นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคติดเชื้อ *Candida* นอกจากขึ้นกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยทางร่างกายมนุษย์[45]

1. ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ (Pathogenicity determinants)[46]

ขึ้นกับความสามารถในการเกาะติด (adhesion) และการทะลุทะลวง (invasion) ของเชื้อ โดยเชื้อ *Candida* ที่เชื่อว่าสามารถก่อโรคได้ในขณะนี้มีอยู่ 15 สายพันธุ์ แต่ต่อไปน่าจะมีรายงานเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์ที่ก่อโรคเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ยากดภูมิคุ้มกัน ตลอดจนโรคเอดส์เพิ่มมากขึ้น เชื้อ *Candida* ที่เชื่อว่าสามารถก่อโรคได้แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงเชื้อ *Candida* ที่เชื่อว่าสามารถก่อโรคได้[46]

Candida albicans (รวมถึง *Candida stellatoidea*)	*Candida dattila*
Candida catenulata	*Candida famata*
Candida guilliermondii	*Candida glabrata*
Candida kefyr (เดิมชื่อ *Candida pseudotropicalis*)	*Candida inconspicua*
Candida krusei	*Candida lusitaniae*
Candida parapsilosis	*Candida pulcherrima*
Candida tropicalis	*Candida zeylanoides*

1.1 ความสามารถในการเกาะติด (adhesion)[46,47,48]

ความสามารถในการเกาะติด (adhesion)จะแตกต่างกันไปในเชื้อ *Candida* แต่ละสายพันธุ์ ในปี ค.ศ. 1980 King และคณะ พบว่าความสามารถในการเกาะติด (adhesion) เป็นจุดเริ่มต้นในการเกิดการติดเชื้อ โดย *Candida albicans* มีความสามารถมากที่สุด รองลงมาคือ *Candida tropicalis* และ *Candida stellatoidea* ส่วน *Candida parapsilosis* พบความ

สามารถนี้ได้น้อย นอกจากนี้ในสภาวะที่อยู่ในรูปราสาย จะมีความสามารถนี้มากกว่าในรูป germ tube และรูป yeast ตามลำดับ

1.2 ความสามารถในการทะลุทะลวง (invasion)

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนพบว่า pseudohyphae จะสามารถเข้าสู่ corneocyte และเซลล์ epithelium ได้ และมีช่องว่างรอบเชื้อแสดงถึงมีการย่อยสลายเกิดขึ้น โดยในรูปราสาย จะมีความสามารถนี้มากกว่าในyeast แต่เชื่อว่าในการติดเชื้อแรก ๆจะอยู่ในรูป yeast ที่ colonize อยู่ก่อนจึงค่อยเปลี่ยนเป็น pseudohyphae เนื่องจากในรูป yeast จะทนต่อการถูกจับกิน(phagocyte) มากกว่า กลไกในการทะลุทะลวงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเกี่ยวกับเอนไซม์ acid protease และ phospholipase ความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ protease ของ *Candida albicans* มีมากที่สุด รองลงมา คือ *Candida tropicalis* และ *Candida parapsilosis* ตามลำดับ[46,49,50,51,52]

นอกจากนี้ Mannan ซึ่งเป็นสารพวก polysaccharides ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ก็เชื่อว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อ *Candida* โดยสามารถกระตุ้นระบบ complement ผ่าน alternative pathway ทำให้เกิด C5a ดึงเม็ดเลือดขาวมาบริเวณนั้น และ Mannan ยังมีคุณสมบัติเหมือน endotoxin ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ กลไกนี้ใช้อธิบายลักษณะรอยโรคติดเชื้อ *Candida* ที่ผิวหนังซึ่งเป็น pustules และ โรคติดเชื้อ *Candida* ตามระบบต่างๆของร่างกายได้[42]

2. ปัจจัยทางร่างกายมนุษย์[46]

2.1 ปัจจัยที่ไม่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน (non-immune system)

ได้แก่ microflora ซึ่งจะแย่งอาหาร และ แย่งที่ในการเกาะติด หรือสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อ *Candida* การแบ่งตัวและลอกหลุดออกไปของเซลล์ซึ่งจะช่วยขับเชื้อออกไปด้วย เม็ดเลือดขาวหรือ macrophage ซึ่งจับกินเชื้อ และ serum factor ได้แก่ transferrin และ lactoferrin จะจับกับเหล็กซึ่งเป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ *Candida*

2.2 ปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกัน

I 19CC2ABC3

cellular immunity จะมีความสำคัญมากกว่า humoral immunity ดังที่พบในผู้ป่วยเอดส์ และ chronic mucocutaneous candidiasis ซึ่งมีความผิดปกติของ cellular immunity จะมีการติดเชื้อที่รุนแรงกว่าคนปกติ

พยาธิกำเนิดของโรคราที่เล็บจากเชื้อ *Candida*

เท่าที่ปรากฏจนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีหลักฐานยืนยันพยาธิกำเนิดที่แน่ชัดของโรคราที่เล็บจาก *Candida* การติดเชื้อเชื่อว่าเริ่มจากการทำลายของ cuticle จากปัจจัยทางกายภาพ หรือทางเคมี หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าทาง proximal nail fold ทำให้เกิดการอักเสบของ proximal nail fold และ lateral nail fold มีอาการบวมแดง เมื่อมีการอักเสบนานเข้า จะมีผลทำให้ nail matrix ในบริเวณนั้นมีการอักเสบตามไปด้วย และมีการแยกของ nail plate จาก nail bed ทำให้เชื้อราสามารถเข้าไปเจริญเติบโตและก่อพยาธิสภาพขึ้น (secondary pathogen) [8] จากการศึกษาใหม่ ๆ บางคนเชื่อว่าเชื้อ *Candida* สามารถกินเข้าไปในเล็บได้โดยตรง (primary pathogen) กลไกที่ *Candida* สามารถกินเข้าไปในเนื้อเล็บและก่อให้เกิดพยาธิสภาพขึ้น เชื่อว่าเกิดจากการย่อยสลาย keratin โดยอาศัยเอนไซม์ keratinolytic proteinase (KPase) [15,53] ซึ่งในปี ค.ศ. 1984 Ogawa และคณะได้พบว่า *Candida albicans* สามารถหลั่งเอนไซม์ keratinolytic proteinase (KPase)ย่อยสลาย keratin ในหลอดทดลอง เมื่อถูกบ่มรวมกับสาร keratin ที่เป็น stratum corneum ของคนมากที่สุด รองลงมา คือเล็บ ส่วน keratin จากเส้นผมไม่ทำให้ *Candida albicans* หลั่งเอนไซม์นี้ จึงเชื่อว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีบทบาทในการก่อโรคของเชื้อ *Candida* ที่ผิวหนังและที่เล็บ[15]