

องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและผลกระทบบของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาหลักใน
เชื้อ fluconazole-resistant *Candida albicans* ที่แยกได้ทางคลินิก



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHYTOCHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGAL EFFECT OF CAJUPUT OIL ON
EXPRESSION OF MAJOR RESISTANCE GENES IN FLUCONAZOLE-RESISTANT *CANDIDA*
ALBICANS CLINICAL ISOLATES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและผลกระทบบของน้ำมันส้ม็ดขาว ต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาหลักในเชื้อ fluconazole- resistant <i>Candida albicans</i> ที่แยกได้ทางคลินิก
โดย	นายพิชญพงศ์ ศิริเดช
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และ วิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.กาญจนา หริมเพ็ง

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาทัน รัชวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.กาญจนา หริมเพ็ง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รัชนิพร ตริยะวิสุทธิ์ศรี)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิมล จันทร์แจ่ม)

พิชญพงศ์ ศิริเดช : องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและผลกระทบต่อการทำงานของยีนดื้อยาหลักในเชื้อ fluconazole-resistant *Candida albicans* ที่แยกได้ทางคลินิก. (PHYTOCHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGAL EFFECT OF CAJUPUT OIL ON EXPRESSION OF MAJOR RESISTANCE GENES IN FLUCONAZOLE-RESISTANT *CANDIDA ALBICANS* CLINICAL ISOLATES) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.กาญจนา หริมเพ็ง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ของน้ำมันเมล็ดชาจากใบและกิ่งอ่อนของ *Melaleuca cajuputi* Powell ที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย รวมทั้งประเมินผลกระทบของน้ำมันเมล็ดชาต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาฟลูโคนาโซลในเชื้อราทดสอบ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) พบว่าน้ำมันเมล็ดชาประกอบด้วย 6 ชนิด ได้แก่ 1,8-Naphthyridine derivatives (ร้อยละ 10.46), alpha-Pyrone (ร้อยละ 10.11), Terpinolene (ร้อยละ 9.26), gamma-Terpinene (ร้อยละ 8.00), trans-Caryophyllene (ร้อยละ 6.36) และ beta-Elementene (ร้อยละ 5.09) จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดชาในการยับยั้ง *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าดีสก์บรรจุน้ำมันเมล็ดชา ขนาด 1 ไมโครลิตรต่อดีสก์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.67 ± 0.58 ถึง 10.00 ± 0.00 มิลลิเมตร เมื่อทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันเมล็ดชาที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (minimal inhibitory concentration, MIC) และ ค่า เชื้อ ท ด ส อ บ (minimum fungicidal concentration, MFC) ด้วยวิธี Broth macrodilution พบว่าน้ำมันเมล็ดชาแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อราทดสอบทุกไอโซเลท โดยมีค่า MIC และ MFC อยู่ในช่วง 0.31-1.25 และ 0.63-2.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของสารผสมน้ำมันเมล็ดชาและยาฟลูโคนาโซลในการต้านเชื้อราทดสอบด้วยวิธี Checkerboard microdilution พบว่าสารผสมดังกล่าวมีการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อราทดสอบส่วนใหญ่ (ร้อยละ 60) โดยค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชาจะลดลงประมาณ 8-64 และ 8-16 เท่า ตามลำดับ และมีค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพพร้อม (fractional inhibitory concentration index, FICI) อยู่ในช่วง 0.144 ถึง 0.189 ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าน้ำมันเมล็ดชาน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการปรับเปลี่ยนกลไกการดื้อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อรา ซึ่งจากการประเมินผลกระทบของน้ำมันเมล็ดชาต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาฟลูโคนาโซล ได้แก่ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ด้วยวิธี qRT-PCR และวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณสัมพันธ์ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ พบว่าน้ำมันเมล็ดชาที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทที่มียีนดื้อยีนนี้ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันเมล็ดชาไปใช้ในการรักษาแบบผสมผสาน เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาของ *C. albicans* อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
	ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5976758937 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: CAJUPUT OIL, ANTIFUNGAL, CANDIDA ALBICANS, FLUCONAZOLE RESISTANT

Pitchayaphong Keereedach : PHYTOCHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIFUNGAL EFFECT OF CAJUPUT OIL ON EXPRESSION OF MAJOR RESISTANCE GENES IN FLUCONAZOLE-RESISTANT *CANDIDA ALBICANS* CLINICAL ISOLATES. Advisor: Asst. Prof. Dr. KHAEMAPORN BOONBUMRUNG, Ph.D. Co-advisor: Dr. Karnjana Hrimpeng, Ph.D.

The purposes of this research were to investigate the phytochemical constituents and antifungal effect of Cajuput oil, from leave and twigs of *Melaleuca cajuputi* Powell naturally growing in the East of Thailand, against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans*. Initially, the Cajuput oil constituents were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed the presence of 6 major components including 1,8-Naphthyridine derivatives (10.46%), alpha-Pyrone (10.11%), Terpinolene (9.26%), gamma-Terpinene (8.00%), trans-Caryophyllene (6.36%) and beta-Elementene (5.09%). The antifungal activities of Cajuput oil against 16 clinical isolates of fluconazole-resistant *C. albicans* were screened by the disc diffusion method. An inhibitory result showed that the discs impregnated with the oil 1 μ l/disc could reveal an inhibitory effect against all tested isolates with inhibition zone diameter in range of 6.67 ± 0.58 to 10.00 ± 0.00 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the oil against the tested fungi were further determined through the broth macrodilution technique. The Cajuput oil exerted a fungicidal effect against all the tested microorganisms with the MIC and the MFC values in the range of 0.31 to 1.25 and 0.63 to 2.5 μ l/mL, respectively. Besides, the synergistic effect of the combination mixture of the Cajuput oil and fluconazole against the tested fungi were also explored by the checkerboard microdilution technique. As a result, the combined use of fluconazole and Cajuput oil exhibited a synergy effect on majority (60%) of the tested isolates with the fractional inhibitory concentration indexes (FICI) in range of 0.144 to 0.189. This data suggests that the Cajuput oil may involve at least in part in the modulation of fluconazole-resistant mechanism of *C. albicans*. Hence, the effect of cajuput oil on the mRNA expression of the drug-resistant associated genes, namely *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *ERG11*, was quantified by qRT-PCR technique and analyzed relative gene expression data with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Interestingly, it was found that the sub-MIC was statistic significantly reduced the *MDR1* expression levels among the *MDR1*-bearing *C. albicans* ($p < 0.05$). This study brought to light new information about the potential use of Cajuput oil in combination with the existing non-effective antifungal agent to combat the drug resistance in *C. albicans*.

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ทุกประการ เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ทั้งการให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ สนับสนุนด้านวิชาการและด้านปฏิบัติการ ตลอดจนการแก้ไขข้อบกพร่องและให้คำปรึกษาด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความทุ่มเทและความตั้งใจจริง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ประธานกรรมการ อาจารย์ ดร.รัชนิพร ดิยะวิสุทธิศรี กรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิมล จันทร์แจ่ม กรรมการ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ พร้อมทั้งการตรวจสอบ ให้ข้อเสนอแนะและข้อสังเกตต่าง ๆ ทำให้ผู้วิจัยได้พัฒนาแนวความคิดและไตร่ตรองปัญหาต่าง ๆ ได้อย่างรอบคอบมากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์อันผู้วิจัยมิได้เอ่ยนาม ที่กรุณาอบรมสั่งสอนและให้ความรู้แก่ผู้วิจัย รวมถึงผู้แต่งหนังสือตำราให้ผู้วิจัยได้ใช้ค้นคว้าและอ้างอิง จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเพื่อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์สำหรับใช้ในปฏิบัติการทดลอง และขอขอบพระคุณ คุณคำรณ เลียดประดม หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ กรมป่าไม้ คุณสกลรัตน์ เมืองโคตรคุณวรรณภา จงโยธา และคุณเกศวลี อุดมเดช ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์นี้จะป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสังคมและประเทศชาติ จึงขอมอบความดีทั้งหมดนี้แก่คณาจารย์ผู้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ และขอมอบความกตัญญูแก่เวทิตาคณแต่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขออ้อมรับผิดแต่เพียงผู้เดียว พร้อมทั้งยินดีรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้ศึกษาเพื่อประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยที่มีคุณภาพสูงสืบต่อไป

พิชญพงศ์ คีรีเดช

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	8
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	8
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	8
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	9
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	11
2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อ <i>C. albicans</i>	11
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>C. albicans</i>	11
2.3 ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ <i>C. albicans</i>	13
2.4 พยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อแคนดิดา.....	14
2.5 โรคติดเชื้อแคนดิดาที่สำคัญและพบได้บ่อยในปัจจุบัน.....	16
2.6 ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อแคนดิดา	22
2.7 ยาต้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบันและข้อจำกัด	24

2.8 ปัญหาการดื้อยาของเชื้อ <i>C. albicans</i>	37
2.9 กลไกการดื้อยาของเชื้อ <i>C. albicans</i>	41
2.10 เสม็ดขาว (Cajuput tree).....	48
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย	53
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	53
3.2 เชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิจัย.....	58
3.2.1 แหล่งที่มาและการเก็บรักษาเชื้อทดสอบ	58
3.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา.....	58
3.3 วิธีการวิจัย.....	59
3.3.1 การเตรียมน้ำมันเสม็ดขาวโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation).....	59
3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี (chemical composition) ของน้ำมันเสม็ดขาวโดยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).....	60
3.3.3 การตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและอณูชีววิทยา.....	60
3.3.4 การศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก โดยวิธี Broth microdilution ตามมาตรฐานของ CLSI 2017 (อ้างอิงจากเอกสาร CLSI M60, M27-A3 และ M27-S4).....	64
3.3.5 การตรวจหายีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> และ <i>ERG11</i> ในเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	65
3.3.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล	67
3.3.6.1 ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Disk diffusion ตามมาตรฐานของ CLSI 2017 (อ้างอิงจากเอกสาร CLSI M60, M44-A2 และ M44-S3).....	67

3.3.6.2	ศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (minimum fungicidal concentration, MFC) ของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Broth microdilution ตามมาตรฐานของ CLSI 2017 (อ้างอิงจากเอกสาร CLSI M60, M27-A3 และ M27-S4).....	68
3.3.7	การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดข้าวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Checkerboard microdilution	70
3.3.8	การศึกษาผลกระทบของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อการแสดงออกของยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> และ <i>ERG11</i> ในเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบเรียลไทม์ย้อนกลับ (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)	72
บทที่ 4	ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล	76
4.1	ผลการเตรียมน้ำมันเมล็ดข้าวโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ	76
4.2	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเมล็ดข้าว โดยเทคนิค GC-MS.....	77
4.3	ผลการตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา และอนุชีววิทยา	83
4.4	ผลการศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก โดยวิธี Broth microdilution	86
4.5	ผลการตรวจหายีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> และ <i>ERG11</i> ในเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	87
4.6	ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันเมล็ดข้าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล.....	92
4.6.1	ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดข้าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Disc diffusion	92

4.6.2 ผลการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (MFC) ของน้ำมันเมล็ดขาวต่อเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Broth macrodilution.....	94
4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Checkerboard microdilution	96
4.8 ผลการศึกษาผลกระทบของน้ำมันเมล็ดขาวต่อการแสดงออกของยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> และ <i>ERG11</i> ในเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ย้อนกลับ (qRT-PCR).....	98
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ	102
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	102
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	104
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	120
บรรณานุกรม.....	121
ภาคผนวก ก เอกสารรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และ ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ	135
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	137
ภาคผนวก ค ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>26SrRNA</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> , <i>ERG11</i> และ <i>ACT1</i>	140
ภาคผนวก ง ผลการตรวจสอบขนาดของกล้าเชื้อทดสอบ	144
ภาคผนวก จ ผลการตรวจสอบชนิดของ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา..	145
ภาคผนวก ฉ ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก	150
ภาคผนวก ช ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดขาว.....	153
ภาคผนวก ซ ผลการศึกษาหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเมล็ดขาว และ ประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล.....	156
ภาคผนวก ณ ผลการตรวจสอบยืนยันผลผลิตผล PCR ของยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> และ <i>ERG11</i> ที่ได้จากปฏิกิริยา qRT-PCR	159

ภาคผนวก ญ ผลการทดสอบทางสถิติ	160
ประวัติผู้เขียน	171



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การจำแนกชั้นทางชีววิทยาของเชื้อ <i>C. albicans</i> (36).....	11
ตารางที่ 2 ยาด้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน (66, 67).....	24
ตารางที่ 3 รูปแบบและชนิดของยาด้านเชื้อราที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน (67, 73).....	37
ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้.....	76
ตารางที่ 5 องค์ประกอบหลักทางเคมีในน้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้.....	78
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้จากใบและกิ่งอ่อนของ <i>M. cajuputi</i> Powell กับน้ำมันที่รีที่สกัดได้จากใบของ <i>M. alternifolia</i> ตามมาตรฐานสากล (International Organization for Standardization, ISO 4730:2017).....	78
ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้.....	79
ตารางที่ 8 ความถี่ในการตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล.....	91
ตารางที่ 9 รูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล	91
ตารางที่ 10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อของน้ำมันเมล็ดชาและยาฟลูโคนาโซลในการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล	93
ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเมล็ดชาต่อเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล	95
ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดชาในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล	97

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <i>C. albicans</i> (36).....	12
ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>C. albicans</i> บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (35)	13
ภาพที่ 3 เป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน (68)	25
ภาพที่ 4 โครงสร้างของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม polyenes (64).....	26
ภาพที่ 5 โครงสร้างของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม polyenes ที่มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic molecule ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำ (64).....	27
ภาพที่ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม polyenes (64).....	27
ภาพที่ 7 โครงสร้างของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม azoles (64).....	29
ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของ เยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา โดยการทำงานของเอนไซม์ 14 α -demethylase (64).....	30
ภาพที่ 9 กลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 14 α -demethylase (64).....	31
ภาพที่ 10 การพัฒนาโครงสร้างยากลุ่มอนุพันธ์ของ imidazole (64).....	31
ภาพที่ 11 โครงสร้างยากลุ่มอนุพันธ์ของ imidazole (64).....	32
ภาพที่ 12 โครงสร้างของยา ketoconazole (64).....	33
ภาพที่ 13 โครงสร้างยากลุ่มอนุพันธ์ของ triazoles (64).....	35
ภาพที่ 14 กลไกการดื้อยากลุ่ม azoles ของเชื้อ <i>C. albicans</i> (16, 76).....	42
ภาพที่ 15 โครงสร้างของ ATP-binding cassette (ABC) transporters (85).....	44
ภาพที่ 16 โครงสร้างของ Major facilitator superfamily (MFS) transporters (85).....	45
ภาพที่ 17 ลักษณะทั่วไปของเสม็ดขาว (92).....	49
ภาพที่ 18 ลักษณะน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้.....	76
ภาพที่ 19 GC fingerprint ของน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้.....	77
ภาพที่ 20 ลักษณะจุลสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก.....	83

ภาพที่ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก.....	84
ภาพที่ 22 ผลิตผล PCR ของยีน <i>26S rRNA</i> ในเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก	85
ภาพที่ 23 ผลิตผล PCR ของยีน <i>26S rRNA</i> ในเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก	86
ภาพที่ 24 รูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิก.....	87
ภาพที่ 25 ผลิตผล PCR ของยีน <i>CDR1</i> ใน <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล	88
ภาพที่ 26 ผลิตผล PCR ของยีน <i>CDR2</i> ใน <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล	89
ภาพที่ 27 ผลิตผล PCR ของยีน <i>MDR1</i> ใน <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล....	89
ภาพที่ 28 ผลิตผล PCR ของยีน <i>ERG11</i> ใน <i>C. albicans</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล... 90	
ภาพที่ 29 ผลการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาว โดยวิธี Disc diffusion ...	94
ภาพที่ 30 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> S7/1 .99	
ภาพที่ 31 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> U6/2.99	
ภาพที่ 32 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> U15/1	
.....	100
ภาพที่ 33 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> U8/1	
.....	100
ภาพที่ 34 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน <i>C. albicans</i> U19/1 .101	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

“โรคติดเชื้อแคนดิดา (Candidiasis)” จัดเป็นกลุ่มของโรคติดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของภาวะความเจ็บป่วยและเสียชีวิตในมนุษย์ที่สำคัญมากชนิดหนึ่ง มีอาการและอาการแสดงที่หลากหลาย ตั้งแต่การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง เยื่อบุ อวัยวะภายใน และการติดเชื้อในกระแสเลือด (1) มักก่อให้เกิดพยาธิสภาพในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เป็นระยะเวลานาน ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ หรือไขกระดูก รวมถึงผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี นอกจากนี้ยังสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติได้เมื่อมีปัจจัยโน้มนำรับโรคบางอย่าง เช่น การได้รับอุบัติเหตุมีบาดแผล ปนเปื้อนดินหรือสูดสูดน้ำสกปรก (2) สภาพแวดล้อมบริเวณอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีการอับชื้นสะสมของผิวหนังบริเวณซอกพับ ขาหนีบ เล็บ ช่องคลอด และอวัยวะเพศ หรือ มีสิ่งสกปรกหมักหมมบริเวณช่องปาก เป็นต้น (3)

สาเหตุหลักของโรคติดเชื้อแคนดิดาเกิดจากการติดเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกในระบบทางเดินหายใจส่วนบน ระบบทางเดินอาหาร ระบบย่อยอาหาร และระบบสืบพันธุ์ (3) ในผู้ที่มีปัจจัยโน้มนำรับโรค *C. albicans* สามารถบุกรุกเข้าไปเจริญและก่อให้เกิดพยาธิสภาพในบริเวณต่าง ๆ ของร่างกายได้หลากหลาย โดยอาจเจริญเฉพาะบริเวณผิวหนังหรือบุกรุกเข้าสู่อวัยวะภายในได้ จึงจัดเป็นเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาส ลักษณะทางคลินิกของโรคติดเชื้อแคนดิดาสามารถแบ่งตามตำแหน่งที่มีการติดเชื้อได้ 3 ชนิด คือ 1) โรคผิวหนังจากเชื้อแคนดิดา ได้แก่ การติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่เปื่อยขึ้นและมีการเสียดสี เช่น ซอกรักแร้ ใต้ราวนม ขาหนีบ ก้น และการติดเชื้อบริเวณเล็บมือเล็บเท้า (4) 2) โรคติดเชื้อแคนดิดาของเยื่อบุผิวและชั้นใต้เยื่อบุผิว ได้แก่ การติดเชื้อบริเวณช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และช่องคลอด เป็นต้น และ 3) โรคติดเชื้อแคนดิดาของอวัยวะภายใน ได้แก่ การติดเชื้อบริเวณทางเดินปัสสาวะ เยื่อบุช่องท้อง และการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมทั้งการติดเชื้อชนิดแพร่กระจายเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง สมองและเยื่อหุ้มสมอง เยื่อบุและลิ้นหัวใจ ข้อ กระดูก และกล้ามเนื้อ เป็นต้น (1)

การติดเชื้อแคนดิดาบริเวณเนื้อเยื่อภายนอกร่างกาย เช่น ผิวหนังและเยื่อหู นอกจากจะส่งผลโดยตรงต่อรูปลักษณ์แล้ว ยังมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ติดเชื้อจากอาการคัน เจ็บ หรือแสบร้อน และอาจเกิดการติดเชื้อชนิดอื่นแทรกซ้อนในตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพได้ แม้ว่าจะเป็นการติดเชื้อที่ไม่รุนแรง สามารถรักษาให้หายได้ แต่อาจใช้ระยะเวลาการรักษาอย่างน้อย 4 สัปดาห์ หรือบางชนิดอาจต้องได้รับการรักษาต่อเนื่องนานหลายเดือน และมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้เสมอเมื่อไม่สามารถควบคุมปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ สำหรับการติดเชื้อแคนดิดาที่ลุกลามสู่อวัยวะภายใน เป็นการติดเชื้อที่รุนแรง เชื้อตอบสนองต่อยาได้น้อย และมีข้อจำกัดในการใช้ยาฆ่าเชื้อราที่ปริมาณสูง เนื่องจากผลข้างเคียงของยา จึงทำให้ผู้ติดเชื้อมีโอกาสเสียชีวิตได้สูงมาก อย่างไรก็ตาม แม้ว่าโรคติดเชื้อแคนดิดาจะมีความสำคัญด้านการแพทย์และการสาธารณสุขเป็นอย่างมาก เนื่องจากการรักษาต้องใช้ระยะเวลาและใช้ยาที่มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีภาวะสุขภาพ สถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคม และวิถีการดำเนินชีวิตที่เสื่อมถอยลง แต่เชื้อรากลับเป็นกลุ่มจุลชีพที่มีรายงานการศึกษาค่อนข้างน้อยและโรคติดเชื้อราที่มักถูกมองข้าม พบว่ารายงานสถานการณ์โรคติดเชื้อราส่วนใหญ่มาจากข้อมูลการวิจัยภายในสถาบัน (single center study) หรือข้อมูลการเฝ้าระวังเฉพาะกลุ่มเฉพาะพื้นที่ (sentinel surveillance) ซึ่งอาจไม่ครอบคลุมในวงกว้าง (3)

อุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อแคนดิดามีแนวโน้มสูงขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา สำหรับในทวีปเอเชียมีรายงานความชุกของการติดเชื้อแคนดิดาสูง โดยเฉพาะกลุ่มประเทศในภูมิภาคเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากปัจจัยด้านสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา ประกอบกับปัจจัยด้านสภาพสังคมในปัจจุบันอยู่ในช่วงเปลี่ยนผ่านเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ และกลุ่มประชากรส่วนใหญ่มีภาวะยากจนและขาดแคลน ไม่มีความมั่นคงทางเศรษฐกิจ ขาดโอกาสทางการศึกษา ขาดการดูแลสุขภาพ และไม่สามารถเข้าถึงการบริการทางการแพทย์และการพยาบาลที่เหมาะสมได้ อีกทั้งพบการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่สมเหตุสมผลและการใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ผิดวัตถุประสงค์ของการรักษา และผู้ให้บริการด้านการแพทย์และการพยาบาลไม่ตระหนักถึงการใช้อย่างถูกต้องและเหมาะสมกับโรค ส่งผลให้ประชากรมีความไวต่อการติดเชื้อราเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การเกิดภัยพิบัติทางธรรมชาติยังก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อราก่อโรค และทำให้อัตราการเกิดโรคติดเชื้อราที่มีแนวโน้มสูงขึ้นในอนาคต ทั้งการติดเชื้อราบริเวณผิวหนังและการติดเชื้อราแบบลุกลามสู่อวัยวะภายใน ที่พบว่ามีอัตราการป่วยและการเสียชีวิตสูงสุด (4)

สมาคมโรคติดเชื้อแห่งสหรัฐอเมริกาหรือ Infectious Diseases Society of America (IDSA) ระบุว่าโรคติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือด (Candidemia) มีอุบัติการณ์เป็นอันดับ 3 หรือ 4 ของการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลหลายแห่งของสหรัฐอเมริกา (5) และมีรายงานว่าภาวะติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือดที่เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* เป็นโรคติดเชื้อราที่เป็นปัญหาหนักที่สุดเป็นอันดับ 1 ในหลายประเทศทั่วโลก และมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 46-75 และ *C. albicans* ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะพิษจากการติดเชื้อรา (Septicemia) ที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 80 ของโรคติดเชื้อราภายในโรงพยาบาล (2, 6) สำหรับในทวีปเอเชีย จากการศึกษาของ Tan B และคณะในปี พ.ศ. 2558 พบว่ามีรายงานอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อแคนดิดาสูงกว่าประเทศฝั่งซีกโลกตะวันตก โดยในประเทศอินเดีย สิงคโปร์ และไทย พบอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อแคนดิดาแบบลูกกลมคิดเป็นสัดส่วน 4.53, 2.93 และ 1.31 รายต่อหนึ่งพันประชากรในโรงพยาบาล ตามลำดับ และคาดว่าจะมีความรุนแรงมากขึ้นในอนาคต (7) สำหรับประเทศไทย โรคติดเชื้อแคนดิดาเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อแทรกซ้อนในโรงพยาบาล โดยเฉพาะการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของผู้ใส่สายสวนปัสสาวะ (8) และส่วนมากพบการติดเชื้อ *C. albicans* ของอวัยวะภายในที่ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 40 (2) นอกจากนี้ พบว่าโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแคนดิดา และโรคติดเชื้อแคนดิดาของเยื่อหู และชั้นใต้เยื่อหู เป็นโรคที่สามารถพบได้บ่อยที่สุดในประเทศไทย โดยมีการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นและมีการติดเชื้อซ้ำซากได้เรื่อย ๆ (4) จากการศึกษาาระบาดวิทยาของการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเยื่อหูในคลินิกโรคผิวหนัง โรงพยาบาลศิริราช ในปี พ.ศ. 2559 พบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนัง เล็บ และเยื่อช่องปาก ร้อยละ 59.6 เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* และต้องใช้เวลาในการรักษาจนหาย เฉลี่ยประมาณ 211 วัน (9) และพบว่าผู้ป่วยหญิงที่เข้ารับการรักษาในคลินิกสูตินรีเวชกรรม ร้อยละ 75 เคยประสบอาการคันบริเวณช่องคลอดหรือการอักเสบของช่องคลอดอย่างน้อยหนึ่งครั้งในชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่ร้อยละ 80-92 เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* (10) โดยร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยดังกล่าว สามารถกลับมาติดเชื้อราแคนดิดาซ้ำได้ตั้งแต่ 4 ครั้งต่อปีขึ้นไป ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาการรักษาและควบคุมในระยะยาว (11) จากการศึกษาความชุกของการติดเชื้อราที่เล็บเท้าในผู้ป่วยเบาหวาน ที่แผนกผู้ป่วยนอกและเวชปฏิบัติทั่วไป โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา ในปี พ.ศ. 2557 พบว่าร้อยละ 20.9 ของผู้ป่วยเบาหวานที่มีลักษณะเล็บเท้าผิดปกติจะมีภาวะติดเชื้อราที่เล็บเท้า และร้อยละ 22.2 เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* (12)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าโรคติดเชื้อแคนดิดาส่งผลให้ผู้ป่วยมีภาวะสุขภาพสถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคม และวิถีการดำเนินชีวิตที่เสื่อมถอยลง เนื่องจากการรักษาโรคต้องใช้ระยะเวลาและต้องใช้ยาที่มีราคาค่อนข้างสูง จึงมักพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เข้ารับการรักษาเฉพาะช่วงแรก ๆ หรือเข้ารับการรักษาไม่สม่ำเสมอ ทำให้การใช้จ่ายไม่ต่อเนื่อง จนเกิดการติดเชื้อเรื้อรังที่รักษาได้ยากขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดาอีกจำนวนมากที่เมื่อมีการติดเชื้อแล้ว นิยมซื้อยาทาหรือรับประทานเองโดยไม่ได้เข้ารับการรักษาอย่างถูกต้อง อาจเกิดอาการแพ้ยา เกิดการติดเชื้อเรื้อรัง หรือการแพร่กระจายไปสู่บุคคลอื่นได้ และยิ่งส่งผลให้ข้อมูลระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อแคนดิดาไม่ครอบคลุมในวงกว้างและมีอยู่อย่างจำกัดต่อกลุ่มประชากร (13)

ยาในกลุ่ม polyenes และกลุ่ม azoles เป็นยาต้านเชื้อราที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาบ่อยที่สุด แต่เนื่องด้วยขีดจำกัดของยาในกลุ่ม polyenes ในการบริหารยา การดูดซึม และผลข้างเคียงของยา ทำให้ปัจจุบันนิยมใช้ยากกลุ่ม azoles ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดา ยากลุ่ม azoles มีการพัฒนาเป็นลำดับเริ่มจากกลุ่ม imidazoles ได้แก่ clotrimazole, miconazole และ ketoconazole ต่อมาเป็นกลุ่ม triazoles ได้แก่ fluconazole, itraconazole และ voriconazole ยากลุ่มนี้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย มีข้อดีคือ ประสิทธิภาพสูง มีความปลอดภัยในการบริหารยา มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยกว่ายากลุ่ม polyenes และยังสามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางการรับประทานและการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ทำให้อัตราการใช้ยากกลุ่ม azoles ในการรักษาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะยา fluconazole และพบว่าการใช้ยาต้านเชื้อราในปัจจุบัน เป็นไปอย่างไม่ถูกต้องและไม่สมเหตุสมผล ไม่ว่าจะเป็ระยะเวลาและจำนวนครั้งของการให้ยา เนื่องจากผู้ป่วยมักเข้ารับการรักษาไม่สม่ำเสมอหรือไม่ต่อเนื่อง และผู้ป่วยติดเชื้อนิยมนิยมนซื้อยาทาหรือรับประทานเองโดยไม่ได้เข้ารับการรักษาอย่างถูกต้อง ทำให้เชื้อ *C. albicans* มีการพัฒนาการดื้อยาต้านเชื้อราขึ้น (13)

การดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* เป็นปัญหาที่พบมากขึ้นในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดา โดยเฉพาะการดื้อยากกลุ่ม azoles เช่น ketoconazole, itraconazole และ fluconazole การดื้อยาส่งผลโดยตรงให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น ทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้น ระยะเวลาในการรักษานานขึ้น โดยไม่สามารถเพิ่มปริมาณยาได้ เนื่องจากความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ และเนื่องจากชนิดของยาต้านเชื้อรามีจำกัด การดื้อยาก็ทำให้การรักษาล้มเหลวและอาจรักษาไม่หายด้วยยาปฏิชีวนะเดิม และด้วยวิธีการบริหารยา fluconazole มีความหลากหลายในแต่ละประเทศ จึงพบว่า *C. albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีแนวโน้มดื้อยา fluconazole เพิ่มขึ้นและอาจมีการแพร่กระจายคุณสมบัติการดื้อยาไปสู่ *Candida* spp. สปีชีส์อื่น ๆ ได้ (2) ในปี พ.ศ. 2560 Uppuluri P และคณะ

รายงานผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปากที่ดื้อต่อยา fluconazole มีระยะเวลาที่เคยได้รับยาต้านเชื้อราในกลุ่ม azoles มานาน และมีการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปากแบบเป็น ๆ หาย ๆ ซึ่งสัมพันธ์กับการรักษาที่ล้มเหลวด้วยยา fluconazole (1) และในปี พ.ศ. 2562 ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหรัฐฯ หรือ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ได้จัดอันดับ drug-resistant *Candida* spp. อยู่ในระดับภัยคุกคามร้ายแรง ที่เป็นปัญหาสำคัญและต้องดำเนินการแก้ไขอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการลุกลาม เช่นเดียวกับแบคทีเรียดื้อยาชนิดอื่น (14) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าจุดตัดความไวของยา (clinical breakpoints, CBP) ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) พบว่าในปี พ.ศ. 2551 CLSI ได้กำหนดค่า CBP ของยา fluconazole ต่อเชื้อ *Candida* spp. ทุกสปีชีส์อยู่ที่ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาในปี พ.ศ. 2555 CLSI ได้กำหนดค่า CBP ของยา fluconazole ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Candida* spp. แต่ละสปีชีส์ สำหรับเชื้อ *C. albicans* อยู่ที่ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (15) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการวินิจฉัยเชื้อ *Candida* ในระดับสปีชีส์ โดยเฉพาะเชื้อ *C. albicans* ที่มีการกำหนดค่า CBP ของยา fluconazole ที่บ่งชี้ว่าเชื้อไวต่อยาลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการดื้อยาที่สำคัญที่อาจเพิ่มมากขึ้นต่อไปในอนาคต

กลไกการดื้อยา fluconazole ของเชื้อ *C. albicans* ที่สำคัญและมีรายงานการศึกษามากที่สุดคือการลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของยาไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อได้ ส่วนใหญ่เกิดจากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่ส่งผลถึงการเพิ่มผลิตผลของยีนด้วย (16) โดย *CDR1* และ *CDR2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน Cdr1 และ Cdr2 ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีน ATP-binding cassette (ABC) transporters บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีหน้าที่ขนส่งสารเข้าและออกจากเซลล์ และ *MDR1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน Mdr1 คือ Major facilitator superfamily (MFS) transporters ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่แทรกอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีหน้าที่ขนส่งสารเข้าและออกจากเซลล์เช่นเดียวกัน และพบว่าเชื้อ fluconazole-resistance *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกมีการแสดงออกของโปรตีน Cdr1, Cdr2 และ Mdr1 ในระดับสูง (17-19) สำหรับ *ERG11* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ 14 α -demethylase ใช้ในการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นบริเวณเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม azoles และพบว่าเมื่อเชื้อ *C. albicans* มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *ERG11* มากขึ้นจึงทำให้เกิดโปรตีนที่เป็น 14 α -demethylase เพิ่มขึ้น และจำเป็นต้องใช้ยาในปริมาณมากขึ้น เพื่อให้การจับกันระหว่างยากับเอนไซม์มีความสมดุล (17, 18)

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนความไวต่อยาในกลุ่ม azoles กับการแสดงออกของยีนดื้อยา พบว่าเชื้อ azole-resistance *C. albicans* มีการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ azole-susceptible *C. albicans* (20) และมีหลายรายงานการศึกษาที่ให้ผลสอดคล้องกัน (21-26)

จากข้อมูลข้างต้น พบว่ามีข้อจำกัดในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาหลายประการ เช่น ยาด้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมีจำกัดและมีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง การรักษาโรคใช้ระยะเวลานานสามารถเกิดการกลับซ้ำได้ และอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาที่เพิ่มสูงขึ้น รวมถึงการเข้าถึงยาด้านเชื้อราชนิดใหม่ของผู้ป่วยยังมีข้อจำกัดด้านสิทธิการรักษาและเป็นยาที่มีราคาสูง ดังนั้น การคิดค้นสารจากธรรมชาติชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ที่ถอดรหัสเป็น transporter proteins บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา และยีน *ERG11* ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ 14 α -demethylase ในกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ของเชื้อรา จึงอาจนำไปสู่ความสำเร็จในการจัดการปัญหาเชื้อดื้อยาและการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาต่อไปในอนาคต

“พืชสมุนไพร” มีความสำคัญควบคู่กับสังคมไทยมาอย่างยาวนาน คนไทยมีการสั่งสมภูมิปัญญาและองค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้สมุนไพรเพื่อวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย ตั้งแต่เครื่องประกอบในอาหาร ผลิตภัณฑ์ดูแลความงาม ยารักษาโรค และการดูแลสุขภาพของคนในชุมชนด้วยศาสตร์การแพทย์พื้นบ้าน ในปัจจุบันพบว่าความต้องการใช้สมุนไพรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งการบริโภคเพื่อสร้างเสริมและดูแลสุขภาพ การแปรรูปเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท อาทิ อุตสาหกรรมเกษตรแปรรูป อุตสาหกรรมผลิตยาแผนไทย และอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพรรูปแบบต่าง ๆ เช่น สารสกัดจากสมุนไพร เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สปา (27) โดยมีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่พบว่าสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพได้กว้าง ซึ่งอาจไม่ได้เกิดจากสารพิษเคมีที่สำคัญเพียงชนิดเดียว แต่อาจเกิดจากการทำงานของสารประกอบหลายชนิดร่วมกัน และพบว่าสารพิษเคมีในสมุนไพรนั้นเป็นแหล่งของสารต้านจุลชีพที่สำคัญ (28)

ภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นภูมิภาคที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เนื่องจากลักษณะภูมิประเทศที่ประกอบด้วยพื้นที่ชายฝั่งทะเล ภูเขา ป่าดิบชื้น และที่ราบการเกษตร ทำให้มีความหลากหลายของพันธุ์พืชในพื้นที่ต่าง ๆ โดยพบว่าเสม็ดขาวหรือ Cajuput tree เป็นไม้ต้นชนิดหนึ่งที่พบกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ บริเวณขอบป่าพรุ ป่าชายทะเล หรือป่าชายเลน รวมพื้นที่ประมาณ 3,578.18 ไร่ (29) เสม็ดขาวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่

หลากหลาย ทั้งดินกรด ดินเค็ม น้ำท่วมขัง และแห้งแล้ง ขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยการเพาะเมล็ด สามารถปลูกในที่น้ำท่วมไม่ถึง พื้นที่พุ่มเสื่อมโทรม หรือพื้นที่ที่มีน้ำขังได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพื้นที่รกร้างว่างเปล่าที่พืชเกษตรและไม้ป่าชนิดอื่นเจริญเติบโตได้ไม่ดีหรือให้ผลผลิตที่ไม่คุ้มค่า การใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นการใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ เนื่องจากเนื้อไม้เสม็ดขาวมีความคงทนต่อสภาพเปียกชื้นและน้ำเค็มได้ดี และใบสดนำมากลั่นเป็นน้ำมันหอมระเหยได้ มีกลิ่นคล้ายการบูร เรียกว่า น้ำมันเสม็ดหรือ น้ำมันเขียว (Cajuput oil) มีคุณสมบัติทางยาคลายน้ำมันยูคาลิปตัส นิยมใช้ในการรักษาโรคแบบพื้นบ้าน แก้อาการปวดเมื่อย ไซ้ข้ออักเสบ ปวดหัว ปวดหู ปวดฟัน ยารักษาโรคผิวหนัง รักษาสิว ใช้ฆ่าเชื้อโรค ฆ่าแมลง ใช้ภายในเป็นยากระตุ้นขับลม แก้อาการเกร็งของกล้ามเนื้อในกระเพาะและลำไส้ จุกเสียด ท้องอืด ขับเสมหะ หลอดลมอักเสบ และขับพยาธิ เป็นต้น (30) พบว่าองค์ประกอบ หลายชนิดของน้ำมันเสม็ดขาว มีฤทธิ์ไล่หรือฆ่าแมลง เช่น มด ยุง ปลวก และเพลี้ยได้ดี และมีรายงานว่าสามารถฆ่าแบคทีเรียหลายชนิดได้ดี นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทำลายไม้ร่วมกับกลุ่มสารป้องกันรักษาเนื้อไม้ พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราทำลายไม้ไม่ได้ดี (31, 32) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันเสม็ดขาวในประเทศอินเดีย พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้ทางคลินิกหลายชนิด ได้แก่ *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น (33)

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดาของน้ำมันเสม็ดขาวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย เพื่อโอกาสในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พื้นบ้านและพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนที่สอดคล้องกับโครงการพัฒนาระเบียงเศรษฐกิจพิเศษภาคตะวันออกหรือ Eastern Economic Corridor (EEC) ภายใต้นโยบายไทยแลนด์ 4.0 ตามวัตถุประสงค์หลักของ EECi คือส่งเสริมให้เกิดการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรม โดยมุ่งเน้นการวิจัยเพื่อต่อยอดไปสู่การใช้งานจริง และยังสอดคล้องกับแผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 ที่เน้นการพัฒนางานวิจัยสมุนไพรไทย เพื่อสร้างการยอมรับและความมั่นใจเชื่อมต่อสู่การนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงอย่างกว้างขวาง รวมทั้งการน้อมนำแนวพระราชดำริของสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ว่า “ไม้เสม็ด คนอื่นเขามองว่า เป็นไม้เสื่งเครื่อง แต่ข้อเท็จจริงเป็นไม้ที่มีประโยชน์มาก หากทำดี ๆ จะเป็นการเพิ่มมูลค่า สร้างงาน สร้างรายได้ ในราษฎรได้มาก ” มาปฏิบัติ เพื่อให้การใช้ประโยชน์ป่าเสม็ดขาวในภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทยเป็นไปอย่างคุ้มค่าและยั่งยืนสืบต่อไป

1.2 คำถามของการวิจัย

- (1) เชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลหรือไม่ และเชื้อดื้อยาดังกล่าวมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลหรือไม่
- (2) น้ำมันเสม็ดขาวจากใบและกิ่งอ่อนของ *Melaleuca cajuputi* Powell ที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีชนิดใดและมีสารใดเป็นองค์ประกอบหลัก
- (3) น้ำมันเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและมีการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลหรือไม่ และน้ำมันเสม็ดขาวส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลมากน้อยเพียงใด

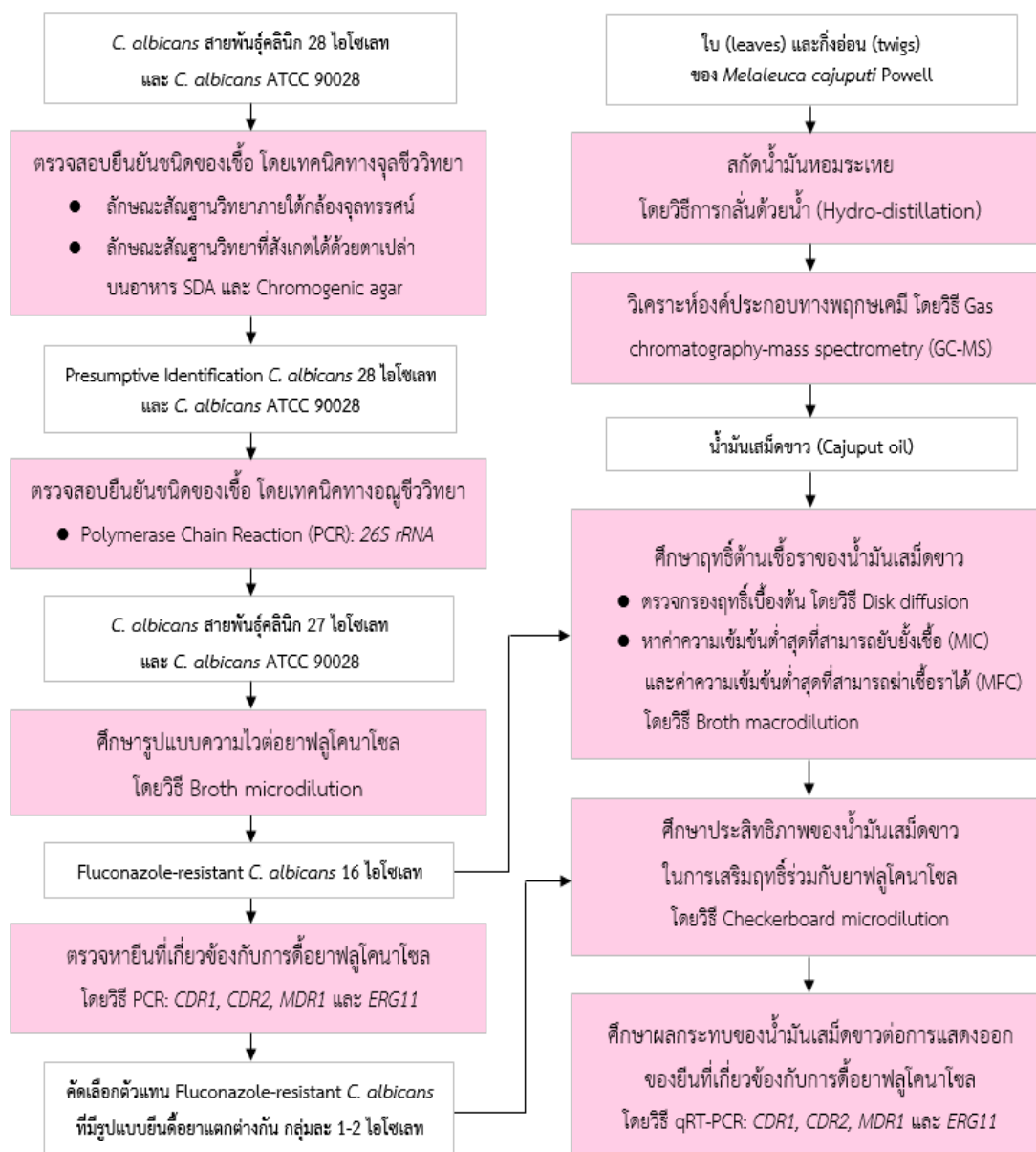
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- (1) ศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก และยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล
- (2) ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวจากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell ที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
- (3) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันเสม็ดขาว ประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล และประเมินผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

- (1) เชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ใช้ทดสอบร้อยละ 50 ดื้อยาฟลูโคนาโซล และเชื้อดื้อยาดังกล่าวมียีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล
- (2) น้ำมันเสม็ดขาวจากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell ที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักไม่แตกต่างจากน้ำมันเสม็ดขาวจากแหล่งอื่น
- (3) น้ำมันเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา มีการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล และมีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) ทราบรูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก และรูปแบบการมียีนที่เกี่ยวกับการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล
- (2) ทราบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวจากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell ที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ

- (3) น้ำมันเมล็ดขาวจากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อแคนดิดาในระดับสูง โดยอาจส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล ซึ่งอาจนำไปสู่ความสำเร็จในการจัดการปัญหาเชื้อดื้อยาและการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาต่อไปในอนาคต
- (4) ทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของน้ำมันเมล็ดขาวจากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell เพื่อโอกาสในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พื้นบ้านและพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนที่สอดคล้องกับโครงการพัฒนาระเบียงเศรษฐกิจพิเศษภาคตะวันออก (EEC) ภายใต้นโยบาย ไทยแลนด์ 4.0 และแผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 รวมทั้งเพื่อให้การใช้ประโยชน์ป่าเสม็ดขาวในภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นไปอย่างคุ้มค่าและยั่งยืนสืบต่อไป



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อ *C. albicans*

เชื้อ *C. albicans* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2382 โดย Bernhard von Langenbeck ศัลยแพทย์ชาวเยอรมันได้ค้นพบจุลชีพที่มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ในบริเวณชั้นเยื่อเมือกของหลอดอาหารในผู้ป่วยที่เป็นไข้ไทฟอยด์หรือไข้รากสาดน้อย และได้ตั้งสมมติฐานว่าภาวะที่มีการติดเชื้อราดังกล่าว อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคด้วย เมื่อมีการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณต่าง ๆ ของร่างกายจะทำให้เกิดฝ้าขาวในบริเวณที่มีการติดเชื้อ จึงเรียกจุลชีพนี้ว่า *C. albicans* โดย candida/ candidus (Latin) หมายถึง สีขาวแพรวพราว และ albicans/ albicare (Latin) หมายถึง ทำให้ขาว (34) ทั้งนี้สามารถจำแนกชั้นทางชีววิทยาของเชื้อ *C. albicans* ได้ดังตารางที่ 1

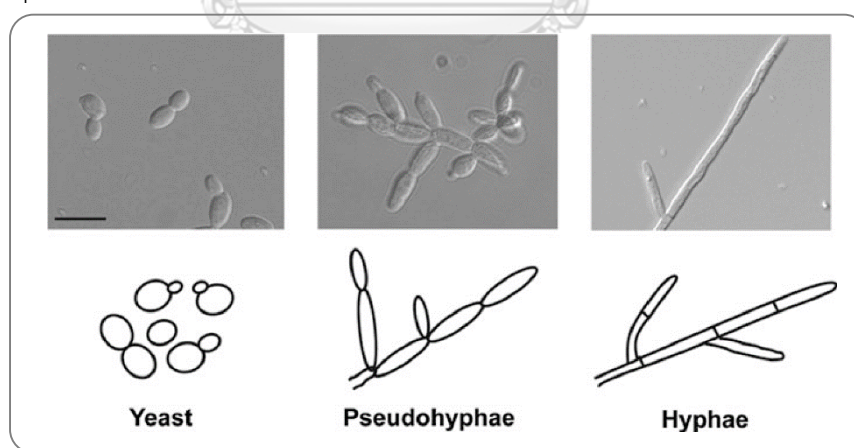
ตารางที่ 1 การจำแนกชั้นทางชีววิทยาของเชื้อ *C. albicans* (36)

โดเมน (domain)	Eukaryote
อาณาจักร (kingdom)	Fungi
อาณาจักรย่อย (subkingdom)	Dikarya
ไฟลัม (phylum)	Ascomycota
ไฟลัมย่อย (subphylum)	Saccharomycotina
ชั้น (class)	Saccharomycetes
ชั้นย่อย (subclass)	Saccharomycetidae
อันดับ (order)	Saccharomycetales
วงศ์ (family)	Metschnikowiaceae
สกุล (genus)	<i>Candida</i>
ชนิด (species)	albicans

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *C. albicans*

C. albicans จัดเป็นเชื้อราเซลล์เดี่ยว จำพวกยีสต์ ที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้หลากหลาย (ภาพที่ 1) ตั้งแต่ยีสต์เซลล์ (yeast cell) รูปร่างกลมรี คล้ายรูปไข่ (oval shaped) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 ไมโครเมตร มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding)

พบเป็นเซลล์เล็ก ๆ ติดกับเซลล์แม่ เรียกว่า เซลล์หน่อ (budding yeast cells/ blastospores/ blastoconidia) ซึ่งเซลล์ที่แตกหน่อออกไปจะหลุดออกจากเซลล์แม่และเจริญแตกหน่อต่อไปอีก ในบางสภาวะยังพบการสร้างสายราเทียม (pseudohyphae) และสายราแท้ (true hyphae) โดยสายราเทียมเกิดจากเซลล์หน่อที่ยืดยาวออกและเรียงต่อกันในลักษณะคล้ายสายรา ไม่มีผนังกั้น (septum) แต่มีรอยคอด (constriction) ที่ชัดเจนบริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์หรือบริเวณที่มีการแตกหน่อด้านข้าง (side budding) และสายราแท้เกิดจากการสร้างท่ออก (germ tube) ของเซลล์ยีสต์ที่ยืดยาวออกและมีผนังกั้นเซลล์เกิดขึ้น สายราแท้มีขนาดความกว้างประมาณ 2-10 ไมโครเมตร ความยาวไม่จำกัด โดยเมื่อสายรายาวขึ้นจะไขว้รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่ากลุ่มสายรา (mycelium) นอกจากนี้ *C. albicans* ยังสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่มีลักษณะเฉพาะ เรียกว่า คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีผนังหนากว่ายีสต์เซลล์ และเกิดบริเวณกลางเซลล์หรือปลายเส้นใย (3, 37) ทั้งนี้สมบัติในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้หลากหลายของ *C. albicans* ดังกล่าว เป็นการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือภาวะต่าง ๆ ในร่างกายของโฮสต์ เช่น อุณหภูมิในร่างกาย (37 องศาเซลเซียส) ซิรั้ม อัตราการแลกเปลี่ยนแก๊สในร่างกายที่สูงขึ้น สภาพความเป็นด่างที่สูงกว่า 6.5 ภาวะขาดแคลนสารอาหาร และฮอร์โมนต่าง ๆ ในร่างกาย เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลให้ *C. albicans* สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีและเป็นปัจจัยความรุนแรงจนสามารถก่อโรคได้ (35)

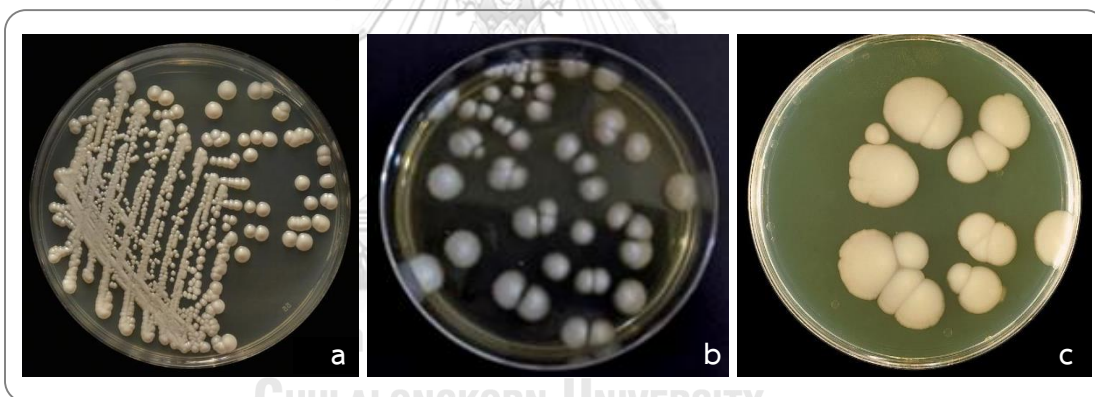


ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *C. albicans* (36)

C. albicans เป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถพบได้ทั่วไป บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกในระบบทางเดินหายใจส่วนบน ระบบทางเดินอาหาร ระบบย่อยอาหาร และระบบสืบพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) เนื่องจากในภาวะร่างกายมีภูมิคุ้มกันปกติ เชื้อจะมีชีวิตอยู่

อย่างสมดุลร่วมกับจุลชีพชนิดอื่นโดยไม่ก่อโรคในรูปยีสต์เซลล์ แต่ถ้ามีปัจจัยที่ทำให้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปและทำลายสมดุลธรรมชาติ เช่น ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำลง (ในกลุ่มผู้ป่วยที่ทานยาประเภทคอร์ติโซนและสเตียรอยด์ หรือยารักษามะเร็ง ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง) มีการเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่าง (สตรีมีครรภ์หรือผู้ป่วยที่ทานยาปฏิชีวนะ) หรือมีการอัปเดตขึ้นสะสมบริเวณอวัยวะต่าง ๆ เป็นต้น เชื่อจะเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าปกติหรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยการสร้างท่อออก คล้ายสาหร่ายเทียม และฉวยโอกาสก่อโรคได้ (3)

C. albicans สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิประมาณ 20-40 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2-8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง มีสีขาวขุ่นหรือสีขาวครีม ทึบแสง ผิวมันวาว รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลาหลายวัน เชื้ออาจเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นหรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ทำให้ลักษณะของโคโลนีแผ่ขยายออกหรือเปลี่ยนแปลงไป ดังภาพที่ 2 (35)



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *C. albicans* บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (35)

a) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง b) และ c) ระยะเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง

2.3 ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans*

C. albicans มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้หลากหลาย ตั้งแต่ยีสต์เซลล์ สาหร่ายเทียม และสาหร่ายแท้ ซึ่งจัดเป็นภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ทางพันธุกรรมที่ทำให้ภายในประชากรเดียวกันของสปีชีส์ สามารถมีฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันได้ตั้งแต่สองฟีโนไทป์ขึ้นไป และพบว่า การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นยีสต์เซลล์และสาหร่ายแท้จัดเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *C. albicans* ทำให้เชื้อมีความสามารถในการก่อโรคเพิ่มขึ้น โดยเชื้อจะสามารถบุกรุกเข้าสู่ชั้น

ผิวหนังและเยื่อเมือกและก่อให้เกิดการติดเชื้อได้เพิ่มขึ้น เมื่ออยู่ในรูปสายราแท้ และเชื้อจะสามารถแพร่กระจายได้ดีกว่าในรูปยีสต์เซลล์ นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสายราเทียมได้ในบางสภาวะที่มีสารอาหารอยู่อย่างจำกัดหรือสภาวะที่มีการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (37) และพบว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผลให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ได้แก่ มีการเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณสารอาหาร หรือเมื่อมีการสัมผัสกับสารเคมีบางประเภท เช่น farnesol, tyrosol และ dodecanol เป็นต้น (38)

สำหรับปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคที่สำคัญที่ช่วยให้เชื้อสามารถเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์หรือพื้นผิวอื่นได้ดี พบว่าบนผิวเซลล์ของ *C. albicans* จะประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีน adhesins ได้แก่ agglutinin-like sequence (ALS) protein ที่ประกอบด้วย Als1-7 และ Als9 จากรายงานการศึกษาพบว่าการแสดงออกของโปรตีน Als3 ที่ถูกถอดรหัสโดยยีน *ALS3* ในสายราแท้ระหว่างการติดเชื้อบริเวณเยื่อช่องปากและเยื่อช่องคลอด ทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น (39) ซึ่งนอกจากโปรตีน Als3 จะมีคุณสมบัติเป็น adhesins แล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็น invasins ช่วยให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อภายในและก่อโรคที่รุนแรงขึ้นได้ โดยโปรตีน Als3 และ invasins ชนิดอื่น เช่น Ssa1 จะจับกับ E-cadherin บน epithelial cells และ N-cadherin บน endothelial cells แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการกลืนกินเชื้อเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ (40) และพบว่าเชื้อ *C. albicans* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases ได้แก่ proteases, phospholipases และ lipases ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคที่สำคัญ ทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์และดูดซึมสารอาหารจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ (41) นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าว *C. albicans* ยังมีคุณสมบัติในการก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนผิวเยื่อ บริเวณสายสวนหรือพื้นผิววัสดุอื่นได้ ซึ่งจัดเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคชนิดหนึ่งของการติดเชื้อ เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ภายในชั้นของไบโอฟิล์มจะมีความทนทานต่อยาต้านเชื้อราชนิดต่าง ๆ มากกว่าเซลล์อิสระ เช่น amphotericin B, fluconazole, itraconazole และ ketoconazole เป็นต้น (42)

2.4 พยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อแคนดิดา

C. albicans เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีชีวิตอยู่อย่างสมดุลร่วมกับแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่นบนผิวหนังและเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายใด ๆ แต่ถ้ามีปัจจัยที่ทำให้สมดุลตามธรรมชาติถูกทำลาย เชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วและทำให้เกิดโรคติดเชื้อแคนดิดาได้ (3) สำหรับแนวทางการแพร่กระจายของเชื้อ *C. albicans* จากแหล่งต่าง ๆ ไปสู่ตำแหน่งของการติดเชื้อที่สำคัญ ได้แก่

1. การแพร่กระจายของเชื้อจากภายใน (endogenous source) คือการแพร่ของเชื้อจากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่งในร่างกาย เกิดขึ้นเมื่อมีปัจจัยที่เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนหรือการเคลื่อนย้ายของเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อในระบบทางเดินอาหารหรืออวัยวะสืบพันธุ์ เช่น เมื่อผู้ป่วยได้รับยาต้านแบคทีเรียที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างเป็นระยะเวลานานจะทำให้สภาวะสมดุลของเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ทำให้เชื้อราเพิ่มจำนวนมากขึ้น หรือเมื่อผู้ป่วยได้รับยาเคมีบำบัดจนเกิดผลทะลุบริเวณเยื่อบุลำไส้ ทำให้เชื้อสามารถเคลื่อนย้ายจากลำไส้ไปสู่เยื่อบุช่องท้องหรือกระแสเลือดได้ (43)

2. การแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งภายนอก (exogenous source) มักเป็นการแพร่ของเชื้อจากคนไปสู่คนโดยการสัมผัส คล้ายกับการแพร่กระจายของแบคทีเรียในโรงพยาบาล เช่น จากผู้ป่วยรายหนึ่งไปสู่อีกรายหนึ่งผ่านสิ่งของที่สัมผัสผู้ป่วยร่วมกัน หรือโดยมือของบุคลากรทางการแพทย์ที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยเชื้อจะเจริญบนผิวหนังหรือเยื่อและก่อโรคในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยง หรือกรณีโรคติดเชื้อราแคนดิดาในทารกแรกเกิดที่ได้รับเชื้อจากช่องคลอดของมารดา เป็นต้น (44, 45)

ภายหลังจากมีการแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะภายในร่างกาย สำหรับผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ ร่างกายจะมีกลไกในการป้องกันหรือทำลายเชื้อ เช่น แนวกันต่าง ๆ (barriers) ของร่างกายทั้งผิวหนังและเยื่อเมือกของระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์ รวมทั้งเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล และโมโนไซต์ ที่สามารถทำลายสายราเทียมและเซลล์หนองได้ดี (46) จึงไม่อาจก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้ แต่เมื่อมีปัจจัยที่เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนหรือการเคลื่อนย้ายของเชื้อก็อาจเกิดโรคได้ เช่น ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติที่มีแผล บริเวณผิวหนังหรือเยื่อเมือก ร่วมกับความชื้น ทำให้เกิดการเปียกหรือหลุดลอกของเนื้อเยื่อปกคลุม นำไปสู่โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณรักแร้ ขาหนีบ ช่องปาก และช่องคลอดได้ สำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือผิดปกติจะทำให้กลไกการป้องกันดังกล่าวบกพร่อง จึงเกิดการติดเชื้อหรือเกิดโรคร้ายขึ้น เช่น ภาวะติดเชื้อราแคนดิดาในกระแสเลือดในผู้ป่วยมะเร็งที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำจากการได้รับยาเคมีบำบัด หรือภาวะหลอดอาหารอักเสบติดเชื้อรุนแรงในผู้ป่วยเอดส์ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น โรคติดเชื้อแคนดิดาจึงจัดเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากมีขอบเขตการเกิดโรคได้กว้างมาก เกิดได้ทั้งโรคที่ไม่รุนแรง โรคเฉพาะที่ โรคของอวัยวะภายนอก โรคติดเชื้อฉวยโอกาสของอวัยวะภายใน และโรคติดเชื้อชนิดลุกลามที่รุนแรงถึงชีวิต รวมถึงสามารถเกิดได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติด้วย (2) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* ประกอบด้วย

1. ลักษณะทางกายวิภาคของผิวหนังในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายที่ต่างกัน เช่น ผิวหนังบริเวณที่อับชื้น ซอกพับของผิวหนังและเยื่อหู เป็นบริเวณที่มักพบการติดเชื้อราแคนดิดามากกว่าบริเวณที่แห้ง
2. ภูมิต้านทานของร่างกาย จัดเป็นส่วนสำคัญในการก่อโรค ผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคติดเชื้อเอชไอวีหรือโรคเอดส์ ผู้ที่ใช้ยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์หรือยาฆ่าเชื้อติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามะเร็งด้วยรังสีบำบัดหรือเคมีบำบัด ซึ่งส่งผลให้ภูมิคุ้มกันต่ำลงและเกิดการติดเชื้อแคนดิดาได้มากขึ้น
3. ลักษณะของผู้ป่วย เช่น เด็กทารกและผู้สูงอายุ สตรีตั้งครรภ์ ผู้ที่มีน้ำหนักมาก และผู้ที่สวมใส่เสื้อผ้ารัดแน่นอับชื้น จะมีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อแคนดิดา (47)

2.5 โรคติดเชื้อแคนดิดาที่สำคัญและพบได้บ่อยในปัจจุบัน

C. albicans เป็นเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อแคนดิดา สามารถบุกรุกเข้าไปเจริญและก่อให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกายได้หลากหลาย อาจเจริญเฉพาะบริเวณผิวหนังหรือบุกรุกเข้าสู่อวัยวะภายใน ลักษณะทางคลินิกของโรคติดเชื้อแคนดิดาสามารถแบ่งตามตำแหน่งที่มีการติดเชื้อได้ 3 ชนิด คือ 1. โรคผิวหนังจากเชื้อแคนดิดา (cutaneous candidiasis) ได้แก่ การติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่เปียกชื้นและมีการเสียดสี (intertrigo) เช่น ซอกรักแร้ ใต้ราวนม ขาหนีบ ก้น และการติดเชื้อบริเวณเล็บมือเล็บเท้า (4) 2. โรคติดเชื้อแคนดิดาของเยื่อหูผิวและชั้นใต้เยื่อหูผิว (mucosal and submucosal candidiasis) ได้แก่ การติดเชื้อบริเวณช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และช่องคลอด เป็นต้น และ 3. โรคติดเชื้อแคนดิดาของอวัยวะภายใน (systemic candidiasis) ได้แก่ การติดเชื้อบริเวณทางเดินปัสสาวะ เยื่อช่องท้อง และการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมทั้งการติดเชื้อชนิดแพร่กระจายเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง สมอและเยื่อหุ้มสมอง เยื่อและลิ้นหัวใจ ข้อ กระดูก และกล้ามเนื้อ เป็นต้น (1) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาที่มีรายงานการศึกษาและมีความถี่ของการเกิดโรคค่อนข้างสูงมีดังนี้

2.5.1 โรคผิวหนังจากเชื้อแคนดิดา (cutaneous candidiasis)

โรคผิวหนังจากเชื้อแคนดิดา เป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยในบริเวณรอยพับของผิวหนัง เช่น รักแร้ ใต้ราวนม ขาหนีบ และง่ามก้น ซึ่งเป็นบริเวณที่อับชื้น เช่นเดียวกับในเด็กอ่อนที่มักพบในบริเวณซอกคอ ขาหนีบ และบริเวณผ้าอ้อมห่อ สาเหตุหลักของการเกิดโรคมักเกิดจากการอับชื้น

และการเปื่อยของผิวหนัง กอปรกับสภาพอากาศแบบร้อนชื้นในประเทศไทยอาจทำให้มีเชื้อหรือ ปัสสาวะอับชื้นอยู่ตลอดเวลา ทำให้เชื้อราสามารถเจริญได้ดี นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลให้เกิด การติดเชื้อราได้ง่าย เช่น ความอ้วน โรคเบาหวาน และการได้รับยาปฏิชีวนะหรือยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น โรคผิวหนังจากเชื้อแคนดิดาที่พบบ่อยครั้ง ได้แก่

1. โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณซอกพับ (candidal intertrigo) ซึ่งมีการเสียดสีและ อับชื้น (ซอกรักแร้ ใต้ราวนม ก้น และขาหนีบ) มักเกิดจากเชื้อ *C. albicans* ทำให้เกิดผื่นแดงขนาดใหญ่ มีขุยบาง ๆ บางครั้งแฉะและเปื่อย และจะพบผื่นแดงหรือตุ่มหนองขนาดเล็กกระจายออกจากรอยผื่นใหญ่ ในรายที่เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรัง ผิวหนังบริเวณที่เป็นโรคมักจะหนาขึ้นและมีสีคล้ำ ผู้ป่วยจะมีอาการคันและ แสบ พบได้บ่อยในคนอ้วนและผู้ป่วยเบาหวาน (48)

2. โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณซอกนิ้วมือหรือนิ้วเท้า (interdigital candidiasis) มักทำให้ผิวหนังมีอาการตายเป็นฝ้าสีขาวแล้วหลุดลอกออกไป เห็นพื้นส่วนล่างเป็นสีแดงสด ผู้ป่วย มีอาการเจ็บและคัน พบได้บ่อยในคนที่ทำงานอยู่กับน้ำตลอดเวลาทั้งวัน เช่น แม่ค้า แม่บ้าน และลูกจ้าง ชักผ้า เป็นต้น (49)

3. โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณเล็บมือเล็บเท้า (candidal paronychia) ทำให้ ผิวหนังบริเวณหุ้มเล็บบวมแดง ไม่ติดกับแผ่นเล็บ อาจมีหนองใต้หุ้มเล็บลามไปตามเนื้อเล็บ ทำให้ เล็บหนาแข็งและขรุขระ ในรายที่เป็นเรื้อรัง เล็บที่งอกออกมาใหม่จะมีร่องขรุขระ (50)

4. ผื่นผ้าอ้อม (diaper rash) พบได้บ่อยในเด็กทารก เกิดจากการติดเชื้อแคนดิดา บริเวณผิวหนังที่ขอบผ้าอ้อมกดทับและมีการอับชื้น ทำให้เกิดผื่นแดงที่มีอาการคันและแสบ (51)

2.5.2 โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปาก (oropharyngeal candidiasis)

โรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก เป็นโรคติดเชื้อราแคนดิดาประเภทที่พบบ่อยที่สุดใน ปัจจุบัน ผู้ป่วยอาจไม่มีอาการใด ๆ หรือรู้สึกหนานานาในปากและรับรู้รสอาหารน้อยลง มักตรวจพบ ตะกอน เยื่อหรือปื้นสีขาวบริเวณเยื่อบุแก้มและเพดานปาก พบได้บ่อยในผู้ป่วยเอดส์ ผู้ป่วยมะเร็ง และผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน มักวินิจฉัยโรคได้จากลักษณะทางคลินิกเป็นสำคัญ โดยอาจทำการ ขูดบริเวณรอยโรคเพื่อตรวจยีสต์เซลล์หรือสายราเทียมด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และให้การรักษาด้วยยา clotrimazole 1 เม็ด อนุมัติวันละ 4 ครั้ง หรือ nystatin อนุมัติวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 7-10 วัน ถ้าไม่ได้ผลจึงให้ยาต้านเชื้อราชนิดกินที่ใช้รักษาโรคในหลอดอาหาร (2, 52)

2.5.3 โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณหลอดอาหาร (esophageal candidiasis)

โรคติดเชื้อแคนดิดาในหลอดอาหาร พบบ่อยในผู้ป่วยเอดส์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือต่อมน้ำเหลืองที่ได้รับยาเคมีบำบัด ผู้ป่วยมีอาการกลืนเจ็บกลืนลำบาก กลืนติดเจ็บหน้าอก ส่วนน้อยคลื่นไส้อาเจียน วินิจฉัยโดยการตรวจพบฝ้าในปากร่วมกับอาการกลืนเจ็บ การส่องกล้องตรวจหลอดอาหาร esophagoscopy จะช่วยยืนยันการวินิจฉัย หากตรวจพบเชื้อขาวในหลอดอาหาร อาจชุดตรวจด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และให้การรักษาด้วยยา fluconazole 200 มิลลิกรัม ในวันแรก และ 100 มิลลิกรัม วันละครั้งจนครบ 14 วัน ให้ผลเช่นเดียวกับการรักษาด้วยยา itraconazole ชนิดแขวนตะกอน 200 มิลลิกรัม วันละครั้ง นาน 14 วัน ในรายที่ต่อเนื่องการรักษาให้ใช้ยา amphotericin B ขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ฉีดเข้าหลอดเลือดดำวันละ 1 ครั้ง นาน 14 วัน และในผู้ป่วยเอดส์ควรให้ยา fluconazole ขนาด 100-150 มิลลิกรัมต่อวัน รับประทานสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เพื่อป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำในระยะยาว (2, 53)

2.5.4 โรคติดเชื้อแคนดิดาในระบบทางเดินปัสสาวะ (genitourinary candidiasis)

โรคติดเชื้อแคนดิดาในระบบทางเดินปัสสาวะ จัดเป็นโรคติดเชื้อราที่สำคัญและสามารถพบได้บ่อยที่สุด มักเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและระบบอวัยวะสืบพันธุ์ ในเพศหญิงจะมีการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องคลอดและปากช่องคลอด (vaginal และ vulvovaginal candidiasis) ซึ่งเป็นสาเหตุที่พบบ่อยอันดับ 2 ของการอักเสบในช่องคลอด เชื้อที่พบบ่อยที่สุด คือ *C. albicans* รองลงมาคือ *C. glabrata* ในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อรา เช่น ผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงตั้งครรภ์ ซึ่งร่างกายจะมีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงขึ้นและทำให้ปริมาณสารไกลโคเจนที่จะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสในช่องคลอดสูงขึ้น เป็นสาเหตุให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตดีขึ้น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ซึ่งจะทำลายภาวะสมดุลของเชื้อต่าง ๆ ในช่องคลอด ทำให้เชื้อราเพิ่มปริมาณขึ้น ผู้ที่ได้รับยาในกลุ่มสเตียรอยด์ ทำให้ภูมิคุ้มกันโรคลดลง ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ และผู้ที่สวมใส่กางเกงที่คับมากและอยู่ในที่ที่มีอากาศร้อนชื้น เป็นต้น อาการแสดงของโรค เช่น ผื่นแดงคัน แสบร้อนบริเวณปากช่องคลอด มีตกขาวสีขาวครีมชั้นที่ผนังช่องคลอดและอาจลามมาถึงปากช่องคลอดและขาหนีบได้ บางครั้งอาจมีอาการปัสสาวะขัดหรือมีอาการเจ็บขณะมีเพศสัมพันธ์ นอกจากนี้ พบว่าผู้ป่วยเพศหญิงที่เข้ารับการรักษาในหน่วยบริการสุขภาพระดับปฐมภูมิ เช่น สถานีอนามัย เฉลี่ยประมาณร้อยละ 40 ประสบปัญหาติดเชื้อราแคนดิดาบริเวณช่องคลอด

ในเพศชายจะมีการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณองคชาติและหนังหุ้มปลาย (balanitis และ balanoposthitis) โดยพบการติดเชื้อ *Candida* spp. ได้ประมาณร้อยละ 30-35 ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อบริเวณองคชาติและหนังหุ้มปลาย อาการแสดงของโรค เช่น ผื่นขาวหรือแดงบริเวณองคชาติและอาจแพร่กระจายไปยังถุงอัณฑะ ก้น และต้นขา เป็นแผลถลอก หรืออาจมีตุ่มหนองบริเวณองคชาติได้ บางครั้งมีอาการเจ็บหรือแสบร้อนขณะมีเพศสัมพันธ์ ในผู้ป่วยเบาหวาน ผื่นจะบวมแดงมากและเป็นแผลถลอกได้ นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังใกล้เคียงเวช (candida intertrigo) ได้บ่อย เช่น บริเวณขาหนีบและร่องก้น เนื่องจากผิวหนังบริเวณนี้มีความอบอุ่นและอับชื้น ทำให้มีโอกาสติดเชื้อง่าย อาการของโรคเป็นผื่นแดง ขอบเขตชัดเจน คัน เปื่อยลอก และมักมีตุ่มแดงขนาดเล็กหรือตุ่มหนองกระจายอยู่บริเวณขอบของผื่น (54)

การรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในระบบทางเดินปัสสาวะขึ้นอยู่กับตำแหน่งผื่น โรคประจำตัวของผู้ป่วย ภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ความไวต่อยาต้านเชื้อรา และปัจจัยอื่น ๆ โดยการรักษามาตรฐานสำหรับผื่นผิวหนังบริเวณอวัยวะเพศ คือการใช้ยาทา imidazole cream กรณีการอักเสบรุนแรงอาจใช้ยาทาที่มีส่วนผสมของคอตติโคสเตียรอยด์ร่วมด้วย ในเพศหญิงที่มีการติดเชื้อบริเวณช่องคลอดและปากช่องคลอดสามารถรักษาโดยใช้ยา clotrimazole ชนิดเหน็บช่องคลอด หรือยา fluconazole ชนิดรับประทานได้ ในเพศชายที่มีการติดเชื้อบริเวณองคชาติและหนังหุ้มปลายสามารถรักษาโดยใช้ยาทา clotrimazole cream หรือยา fluconazole ชนิดรับประทาน กรณีผู้ป่วยมีผื่นเป็นบริเวณกว้างหรือมีภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติ และไม่ตอบสนองต่อยาทา ควรรักษาโดยยา ketoconazole, itraconazole หรือ fluconazole ชนิดรับประทาน สำหรับปัญหาที่พบได้บ่อยในการรักษาโรคติดเชื้อบริเวณช่องคลอดและปากช่องคลอดคือ การติดเชื้อซ้ำซาก (recurrent vulvovaginal candidiasis) ซึ่งต้องให้การรักษาอย่างต่อเนื่องและใช้ระยะเวลาเกินกว่า 6 เดือน เมื่อหยุดยาแล้วต้องสังเกตอาการต่อไปเรื่อย ๆ และพบว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำซากสามารถกลับมาเป็นได้อีกเรื่อย ๆ ไม่สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ เนื่องจากเชื้ออาจเกิดการดื้อยาสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภาวะสุขภาพ สถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคม และวิถีการดำเนินชีวิตที่เสื่อมถอยลง (2, 11)

2.5.5 โรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องท้อง (intra-abdominal candidiasis หรือ IAC)

ภาวะติดเชื้อแคนดิดาในช่องท้อง เป็นภาวะติดเชื้อที่สำคัญที่ไม่สามารถระบุตำแหน่งชัดเจนได้ มักมีสาเหตุเริ่มต้นมาจากการติดเชื้อราแคนดิดาในระบบทางเดินอาหาร และพบว่าข้อมูล

การศึกษาเกี่ยวกับ IAC มีอยู่อย่างจำกัดในปัจจุบัน เนื่องจากรายงานการศึกษาทางระบาดวิทยา ส่วนใหญ่ให้ความสำคัญกับภาวะติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือด (candidemia) (2) อย่างไรก็ตามยังมี รายงานการศึกษาพบว่า IAC จัดเป็นภาวะเยื่อช่องท้องอักเสบ (peritonitis) ที่เกิดจากการติดเชื้อ เฉพาะที่หรือทั่วช่องท้องก็ได้ อาจเป็นการติดเชื้อของน้ำภายในช่องท้อง (primary peritonitis) การ อักเสบติดเชื้อจากการทะลุของอวัยวะในช่องท้อง (secondary peritonitis) การติดเชื้อระบบทางเดิน น้ำดี (biliary infections) ฝีในช่องท้อง (intra-abdominal abscesses) หรือภาวะเนื้อตายของตับอ่อน จากการติดเชื้อ (infected pancreatic necrosis) (55) IAC เป็นการติดเชื้อแคนดิดาชนิดลุกลามที่มี ความชุกของการติดเชื้อสูง โดยเฉพาะผู้ป่วยในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก และพบว่าสาเหตุหลักของภาวะ ติดเชื้อราแทรกซ้อนภายในช่องท้องหลังการผ่าตัด ประมาณร้อยละ 65-82 เกิดจาก *C. albicans* (56) นอกจากนี้ พบว่าผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงจากการเกิด IAC เนื่องจากข้อจำกัดด้านการวินิจฉัยโรค ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความไวและความจำเพาะต่ำ และการตรวจพบเชื้อในสิ่งส่งตรวจที่มาจาก บริเวณที่ไม่ปลอดเชื้ออาจไม่ได้บ่งชี้ว่าเชื้อนั้นจะเป็นสาเหตุของอาการและอาการแสดงของผู้ป่วย เนื่องจากเชื้อนั้นอาจเป็นเชื้อประจำถิ่นได้ แต่สามารถบอกได้เพียงว่าผู้ป่วยอาจติดเชื้อราชนิดลุกลาม ซึ่งภาวะ IAC เป็นการติดเชื้อที่รุนแรงและถึงขั้นเสียชีวิต หากไม่ได้รับการรักษาหรือได้รับการรักษาช้า ดังนั้นการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการที่มีความไวและความจำเพาะสูงจึงมีความสำคัญมาก เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างทันที่ (5)

2.5.6 โรคติดเชื้อแคนดิดาเรื้อรังในหลายอวัยวะ (hepatosplenic candidiasis หรือ HSC)

ภาวะติดเชื้อแคนดิดาเรื้อรังในหลายอวัยวะ พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน (acute leukemia) มีรายงาน การศึกษา พบอุบัติการณ์ของโรค HSC และอัตราการเสียชีวิตลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีการให้ ยาต้านเชื้อราเพื่อป้องกันโรคในระยะแรกและการใช้ยาต้านเชื้อราชนิดใหม่ เช่น ยากลุ่ม lipid formulation amphotericin B แต่อย่างไรก็ตาม การให้ยา fluconazole เพื่อป้องกันโรคในผู้ป่วยที่มี ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ทำให้เชื้อพัฒนาเกิดการดื้อยาขึ้นและผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อดื้อยา เพิ่มขึ้น (2, 6)

2.5.7 โรคติดเชื้อแคนดิดาในทารกแรกเกิด (neonatal candidiasis)

จากรายงานการศึกษาพบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกา มีอัตราเด็กเกิดใหม่ถึง 4 ล้าน คนต่อปี มีอัตราการคลอดก่อนกำหนดเฉลี่ยประมาณร้อยละ 11.4 ของการคลอดทั้งหมด มีอัตราทารก แรกเกิดที่มีน้ำหนักตัวน้อย (low birth weight, LBW) (ต่ำกว่า 2,500 กรัม) เฉลี่ยประมาณร้อยละ 8 และ

มีอัตราทารกแรกเกิดที่มีน้ำหนักตัวน้อยมาก (very low birth weight, VLBW) (ต่ำกว่า 1,500 กรัม) เฉลี่ยประมาณร้อยละ 1.4 รวมทั้งสิ้นประมาณร้อยละ 20.8 หรือ 750,000 คนต่อปี ซึ่งจัดเป็นกลุ่มประชากรที่มีความไวต่อการเกิดโรคก่อนข้างสูง (57) และพบว่าทารกที่เข้ารับการรักษานในหออภิบาลทารกแรกเกิดภาวะวิกฤต (neonatal intensive care unit, NICU) มีการติดเชื้อ *Candida* spp. ในเดือนแรกเฉลี่ยประมาณร้อยละ 75 ของทารกที่เข้ารับการรักษาทันที โดยทารกอาจได้รับเชื้อโดยตรงทางช่องคลอดในระหว่างการคลอด การสัมผัสกับผิวหนังมารดาหรือผู้ดูแล หรือจากการปนเปื้อนผ่านเข็มให้สารละลายทางหลอดเลือดดำ (intravenous catheter) และพบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในทารกแรกเกิดคือ *C. albicans* (58) สำหรับการรักษาหรือป้องกันภาวะติดเชื้อแคนดิดาในทารกแรกเกิด พบว่าการให้ยา fluconazole เพื่อป้องกันโรคติดเชื้อราแคนดิดาชนิดลูกกลมในทารกแรกเกิดสามารถลดอัตราการเสียชีวิตของทารกแรกเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยระยะเวลาของการให้ยารักษาจะปรับใช้ตามแนวทางการรักษาการติดเชื้อในเด็กและผู้ใหญ่ ซึ่งไม่มีแนวทางการรักษาที่เฉพาะสำหรับทารกแรกเกิด (5) และพบว่า การให้ยา nystatin ทางช่องปากสามารถลดอัตราการติดเชื้อแคนดิดาชนิดลูกกลมในทารกที่คลอดก่อนกำหนดได้ (59) อย่างไรก็ตาม การให้ยาด้านเชื้อราเพื่อป้องกันโรคในทารกแรกเกิด เช่น ยา fluconazole อาจนำไปสู่การเกิดเชื้อดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นได้

2.5.8 โรคติดเชื้อแคนดิดาที่สัมพันธ์กับการสอดใส่สายสวน (catheter-associated disseminated candidiasis)

โรคติดเชื้อแคนดิดาที่สัมพันธ์กับการสอดใส่สายสวน ได้แก่ สายสวนหลอดเลือดดำส่วนกลาง (central venous catheter, CVC) อุปกรณ์สอดใส่หลอดเลือดดำอื่น ๆ (intravascular devices, IVDs) และสายสวนปัสสาวะ เป็นต้น โดยผู้ป่วยที่ใส่สายสวนปัสสาวะอาจมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแคนดิดาในระบบทางเดินปัสสาวะเพิ่มขึ้น ส่วนผู้ป่วยที่ใส่สายสวนหลอดเลือดดำจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือดหรือการติดเชื้อแคนดิดาชนิดลูกกลมเข้าสู่อวัยวะภายในได้ ซึ่งจัดเป็นภาวะการติดเชื้อที่รุนแรง ทำให้การรักษาเป็นไปค่อนข้างยาก ใช้ระยะเวลานาน และผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้น จากรายงานการศึกษา พบว่าอุปกรณ์ที่สอดใส่ทางหลอดเลือดดำจัดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สามารถก่อให้เกิดภาวะติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือดได้ (60) โดยพบว่าผู้ป่วยที่ใส่สายสวนหลอดเลือดดำส่วนกลาง ประมาณร้อยละ 50-70 มีการติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือด (61) การติดเชื้อมีแนวโน้มที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถของเชื้อในการสร้างไบโอฟิล์มบนอุปกรณ์ที่สอดใส่ทางหลอดเลือดดำต่าง ๆ ได้ (6)

2.6 ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อแคนดิดา

โรคติดเชื้อแคนดิดาเป็นกลุ่มของโรคติดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของภาวะความเจ็บป่วยและเสียชีวิตในมนุษย์ที่สำคัญ มีอาการและอาการแสดงที่หลากหลาย ตั้งแต่การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง เยื่ออวัยวะภายใน และการติดเชื้อราในกระแสเลือด เป็นต้น (1) สามารถพบการติดเชื้อได้ทุกภูมิภาคทั่วโลก ความชุกของโรคนี้นี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากมีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างแพร่หลายตั้งแต่ 1940 โดยลักษณะทางคลินิกของโรคมีการพัฒนาและรุนแรงเพิ่มขึ้น มีการติดเชื้อของอวัยวะภายในที่พบได้บ่อยขึ้น พบได้ทั้งการติดเชื้อในชุมชนและการติดเชื้อในโรงพยาบาล ส่วนใหญ่เกิดจาก *C. albicans* รองลงไปได้แก่ *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* และ *C. glabrata* เป็นต้น กลุ่มหลังจัดเป็น non-*albicans* ที่เริ่มพบการติดเชื้อได้มากขึ้น (7) สมาคมโรคติดเชื้อแห่งสหรัฐอเมริกา หรือ Infectious Diseases Society of America (IDSA) ระบุว่าโรคติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือด มีอุบัติการณ์เป็นอันดับ 3 หรือ 4 ของการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลหลายแห่งของสหรัฐอเมริกา (5) จากรายงานการศึกษาของ Brown GD. และคณะ (62) และการศึกษาของ Hoffmann-Santos H. และคณะ (63) ระบุว่าภาวะติดเชื้อแคนดิดาในกระแสเลือดที่เกิดจากเชื้อ *C. albicans* เป็นโรคติดเชื้อราที่เป็นปัญหา มากที่สุดเป็นอันดับ 1 ในหลายประเทศทั่วโลก โดยพบอัตราการติดเชื้อประมาณ 4-14 รายต่อแสน ประชากร และมีอัตราการเสียชีวิตสูงสุดประมาณร้อยละ 46-75 และเชื้อ *C. albicans* ยังเป็นสาเหตุ ที่ทำให้เกิดภาวะเลือดเป็นพิษจากการติดเชื้อรา (fungal sepsis) ที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 80 ของโรคติดเชื้อราภายในโรงพยาบาล และร้อยละ 15 ของโรคติดเชื้อภายในโรงพยาบาลทั้งหมด (2, 6) สำหรับในทวีปเอเชีย พบว่าอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อแคนดิดาอยู่ในช่วง 0.16-4.53 รายต่อหนึ่งพัน ประชากรในโรงพยาบาล และ 11.7 รายต่อหนึ่งพันประชากรในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก ซึ่งสูงกว่า ประเทศฝั่งซีกโลกตะวันตก โดยในประเทศอินเดีย สิงคโปร์ และไทย พบอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ แคนดิดาแบบลูกกลมอยู่ที่ 4.53, 2.93 และ 1.31 รายต่อหนึ่งพันประชากรในโรงพยาบาล ตามลำดับ และคาดว่าจะมีความรุนแรงมากขึ้นในอนาคต (7) สำหรับในประเทศไทย โรคติดเชื้อแคนดิดาเป็น หนึ่งในสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อแทรกซ้อนในโรงพยาบาล โดยเฉพาะการติดเชื้อในระบบทางเดิน ปัสสาวะของผู้ใส่สายสวนปัสสาวะ (catheter-associated urinary tract infection, CAUTI) (8) และพบว่าในประเทศไทย โรคติดเชื้อราแคนดิดาเป็นโรคที่พบได้มาก 1 ใน 5 ของผู้ป่วยที่มีภาวะ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ส่วนใหญ่เกิดจาก *C. albicans* รองลงไป ได้แก่ *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* และ *C. krusei* เป็นต้น ซึ่งเป็นการติดเชื้อแคนดิดาของอวัยวะภายในแบบฉวยโอกาส และมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 40 ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแคนดิดาทั้งหมด (2) อย่างไรก็ตาม

พบว่าโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแคนดิดาเป็นโรคที่สามารถพบได้บ่อยที่สุดในประเทศไทย มีการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นและมีการติดเชื้อซ้ำได้เรื่อย ๆ เนื่องจากปัจจัยด้านสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นของประเทศไทย และสภาพสังคมปัจจุบันที่เข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ทำให้สัดส่วนประชากรผู้สูงอายุซึ่งอาจมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำเพิ่มมากขึ้น จึงมีโอกาสดติดเชื้อแคนดิดาได้ง่ายขึ้น โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแคนดิดาที่พบบ่อย ได้แก่ โรคติดเชื้อราแคนดิดาบริเวณซอกพับที่มีการเสียดสีและอับชื้น โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณซอกนิ้วมือหรือนิ้วเท้า โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณเล็บมือเล็บเท้า และผื่นผ้าอ้อมในเด็กทารก เป็นต้น และโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณเยื่อหูที่พบบ่อย ได้แก่ โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณเยื่อช่องปาก และทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องคลอดและปากช่องคลอด และโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณองคชาติและหนังหุ้มปลาย เป็นต้น (4) จากการศึกษาาระบาดวิทยาของการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเยื่อในคลินิกโรคผิวหนัง โรงพยาบาลศิริราช พบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อราแคนดิดาบริเวณผิวหนัง เล็บ และเยื่อช่องปาก ประมาณร้อยละ 59.6 เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* และต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาจนหายเฉลี่ยประมาณ 211 วัน (9) และพบว่าผู้ป่วยหญิงที่เข้ารับการรักษาในคลินิกสูตินรีเวชกรรม ประมาณร้อยละ 75 เคยประสบอาการคันบริเวณช่องคลอดหรือการอักเสบของช่องคลอดอย่างน้อยหนึ่งครั้งในชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 80-92 เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* (10) โดยร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยดังกล่าว สามารถกลับมาติดเชื้อราแคนดิดาซ้ำได้ตั้งแต่ 4 ครั้งต่อปีขึ้นไป ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาการรักษาและควบคุมในระยะยาว (11) และจากการศึกษาความชุกของการติดเชื้อราที่เล็บเท้าในผู้ป่วยเบาหวาน ที่แผนกผู้ป่วยนอกและเวชปฏิบัติทั่วไป โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา พบว่าร้อยละ 20.9 ของผู้ป่วยเบาหวานที่มีลักษณะเล็บเท้าผิดปกติ จะมีภาวะติดเชื้อราที่เล็บเท้า และประมาณร้อยละ 22.2 เกิดจากการติดเชื้อ *C. albicans* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะการดูแลเท้าที่ไม่เหมาะสม เช่น การไม่ล้างเท้าหรือการเช็ดเท้าไม่แห้งสนิท (12) จะเห็นได้ว่าโรคติดเชื้อราแคนดิดาส่งผลให้ผู้ป่วยมีภาวะสุขภาพ สถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคม และวิถีการดำเนินชีวิตที่เสื่อมถอยลง เนื่องจากการรักษาโรคต้องใช้ระยะเวลาและต้องใช้จ่ายที่มีราคาค่อนข้างสูง จึงมักพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เข้ารับการรักษาเฉพาะช่วงแรกหรือเข้ารับการรักษาไม่สม่ำเสมอ ทำให้การใช้จ่ายไม่ต่อเนื่อง จนเกิดการติดเชื้อเรื้อรังที่รักษาได้ยากขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดาอีกจำนวนมากที่เมื่อมีการติดเชื้อแล้ว นิยมซื้อยาทาหรือรับประทานเองโดยไม่ได้เข้ารับการรักษาอย่างถูกต้อง อาจเกิดอาการแพ้ยา เกิดการติดเชื้อเรื้อรังหรือการแพร่กระจายไปสู่บุคคลอื่นได้ และยังส่งผลให้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อแคนดิดาไม่ครอบคลุมในวงกว้างและมีอยู่อย่างจำกัดต่อกลุ่มประชากร (13)

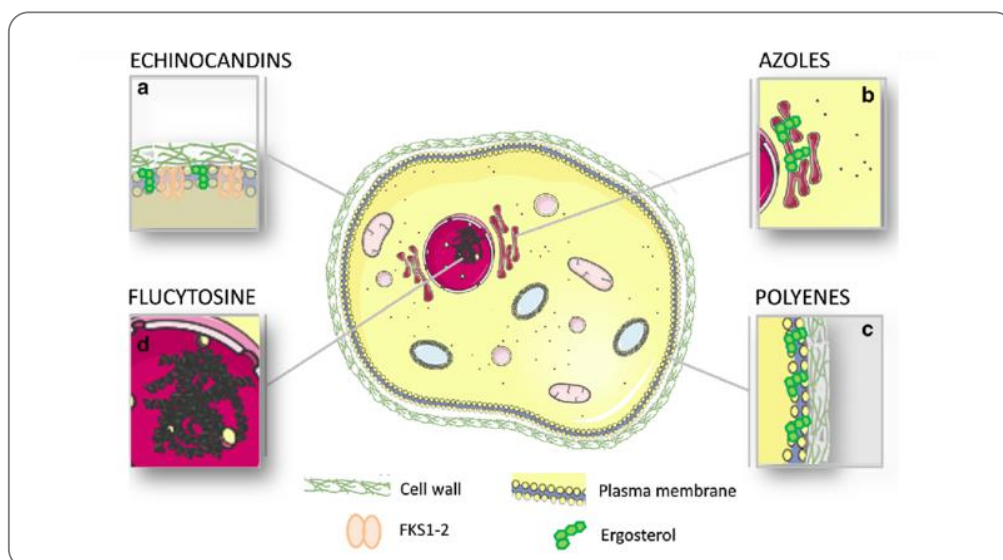
2.7 ยาต้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบันและข้อจำกัด

ยาต้านเชื้อราจัดเป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในปัจจุบัน เนื่องจากโรคติดเชื้อราเป็นโรคที่พบได้บ่อยและเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะโรคติดเชื้อแคนดิดา แต่ยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพนั้นมีน้อยและมีผลข้างเคียงสูง ซึ่งเป็นผลมาจากลักษณะโครงสร้างของเซลล์พื้นฐานของเชื้อราที่เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryotic organisms) เช่นเดียวกับมนุษย์ กระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในเซลล์เชื้อราจึงไม่แตกต่างกับกระบวนการที่พบในเซลล์มนุษย์ ความแตกต่างในระดับเซลล์ของเชื้อราและมนุษย์ที่สำคัญคือ 1) เซลล์เชื้อรามีผนังเซลล์ ในขณะที่เซลล์มนุษย์ไม่มีผนังเซลล์ และ 2) ชนิดของ sterol ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเซลล์เชื้อราเป็น ergosterol แต่ในเซลล์มนุษย์เป็น cholesterol ดังนั้นเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของยาต้านเชื้อราที่ถูกคิดค้นและพัฒนามาใช้ในการรักษาในปัจจุบันมีตั้งแต่การรบกวนการสร้างและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ และการยับยั้งการทำงานของกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ ได้แก่ การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น (64, 65)

ยาต้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ของยาต่อโครงสร้างของเชื้อราที่แตกต่างกัน ได้แก่ polyenes, azoles, pyrimidine analog และ echinocandins ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ตารางที่ 2 ยาต้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน (66, 67)

กลุ่มยาต้านเชื้อรา	กลไกการออกฤทธิ์	ชนิดของยาต้านเชื้อรา
Polyenes	ยับยั้งการสร้าง ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์	amphotericin B และ nystatin
Azoles	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 14 α -demethylase ในกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol	ketoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole และ posaconazole
Pyrimidine analog	ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ของเชื้อรา	flucytosine
Echinocandins	ยับยั้งการสร้าง 1,3- β -glucan ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์	miconazole, anidulafungin และ caspofungin



ภาพที่ 3 เป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน (68)

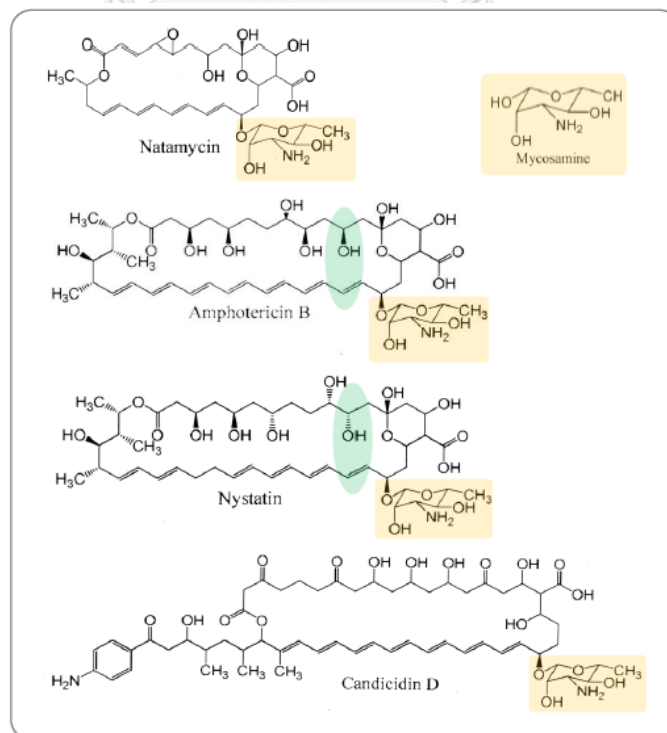
- กลุ่ม echinocandins ยับยั้งการสร้าง 1,3- β -glucan องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์
- กลุ่ม azoles ยับยั้งการสร้าง ergosterol และการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์
- กลุ่ม polyenes รบกวนการสร้าง ergosterol ของเยื่อหุ้มเซลล์
- กลุ่ม pyrimidine analog ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ของเชื้อรา

2.7.1 ยากลุ่ม Polyenes

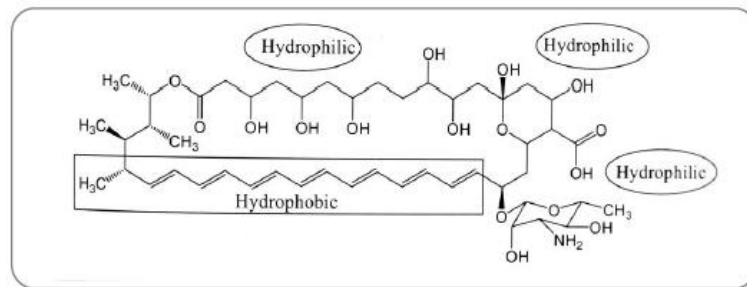
polyenes เป็นกลุ่มยาต้านเชื้อราจากธรรมชาติ ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ปัจจุบันสามารถแยกสารกลุ่มนี้ได้มากกว่า 60 ชนิด แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ค่อนข้างสูง จึงมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางคลินิก สารในกลุ่ม polyenes ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ amphotericin B, nystatin และ candidin D เป็นต้น ยากลุ่ม polyenes มีโครงสร้างเป็นวงแหวนแมโครไลด์ขนาดใหญ่ (macrolide ring) ที่ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนที่เชื่อมต่อกันเป็นวงแหวนด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งมีความยาวที่แตกต่างกันออกไป ขนาดโครงสร้างที่เป็นวงในยากลุ่ม polyenes ที่พบได้บ่อยมีอยู่ 2 ขนาด คือ ขนาด 26 อะตอม ได้แก่ natamycin และขนาด 36 อะตอม ได้แก่ amphotericin B, nystatin และ candidin D ซึ่งภายในวงแหวนแมโครไลด์จะปรากฏพันธะคู่อยู่ตั้งแต่ 4-7 พันธะ มีลักษณะเป็นพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยวในรูปแบบคอนจูเกต (conjugated system) ซึ่งมีการคอนฟอร์เมชัน (conformation) ของโมเลกุลเป็นทรานส์-ไอโซเมอร์ (*trans*-isomer) ที่มีความเสถียรกว่าซิส-ไอโซเมอร์ (*cis*-isomer) จึงทำให้โครงสร้างส่วนที่เป็นพันธะคู่แบบคอนจูเกตมีลักษณะแบนราบและมีคุณสมบัติชอบลิพิดสูง (high lipophilicity) จากการศึกษาฤทธิ์ของยากลุ่ม polyenes พบว่าสารที่มีจำนวนของพันธะคู่แบบคอนจูเกตมาก จะเป็นสาร

ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ดี ดังนั้นสารที่มีจำนวนพันธะคู่แบบคอนจูเกตเท่ากับ 7 จะเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสูงที่สุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ต่ำที่สุดด้วย และอีกด้านหนึ่งของวงแหวนแมโครไลด์ตรงข้ามกับด้านที่เป็นพันธะคู่แบบคอนจูเกตประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) จำนวนมาก (6-14 หมู่) ส่วนนี้ของโครงสร้างของสารจะมีลักษณะไม่ค่อยเป็นระเบียบและมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) นอกจากนี้ยากกลุ่ม polyenes ยังมีส่วนประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน (amino sugar) แทนที่หมู่ไฮดรอกซิล ได้แก่ mycosamine มาต่อกับวงแหวนแมโครไลด์ด้วยพันธะไกลโคซิดิก เพื่อลดความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ รวมทั้งเพิ่มคุณสมบัติชอบน้ำและฤทธิ์ทางชีวภาพของยา (6, 64) (ภาพที่ 4)

จากโครงสร้างของยากกลุ่ม polyenes ดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่ายากกลุ่มนี้ประกอบด้วยโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic molecule ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ ทำให้ยากกลุ่ม polyenes มีขีดจำกัดในการละลายทั้งในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่ออยู่ในตัวทำละลายสารมักเกิดเป็นสารแขวนตะกอนของไมเซลล์ (micelles) มากกว่าที่จะเป็นสารละลายที่แท้จริง นอกจากนี้ส่วนโครงสร้างที่เป็นพันธะคู่แบบคอนจูเกตยังทำให้สารมีความคงตัวต่ำ เนื่องจากอาจถูกกระตุ้นจากแสง ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ได้ (6, 64) (ภาพที่ 5)

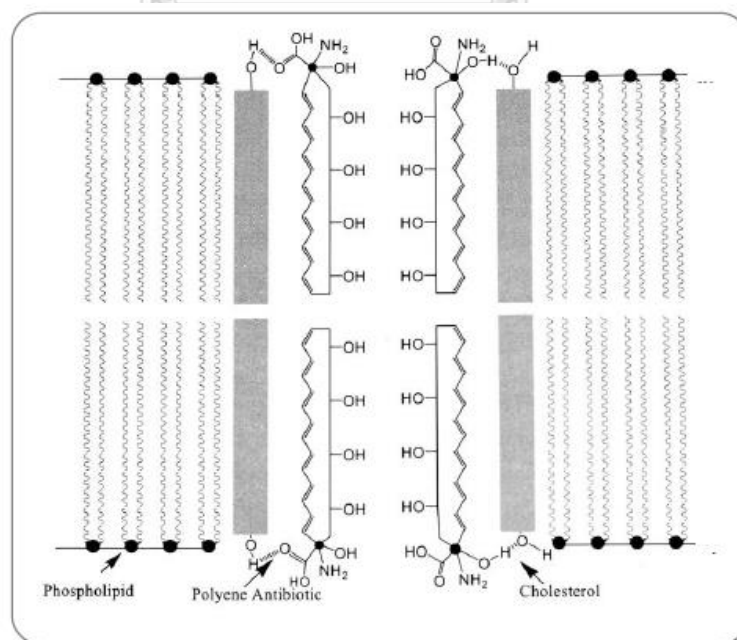


ภาพที่ 4 โครงสร้างของยาต้านเชื้อรากลุ่ม polyenes (64)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของยาต้านเชื้อราในกลุ่ม polyenes ที่มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic molecule ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำ (64)

กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านเชื้อราในกลุ่ม polyenes เกิดจากการที่สารจับกับ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา โดยหันโครงสร้างด้านที่เป็นพันธะคู่แบบคอนจูเกตซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำหรือชอบลิพิด เข้าจับกับโครงสร้างส่วนที่ชอบลิพิดของ ergosterol และด้านที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจะหันออกมาด้านตรงข้าม เมื่อยากลุ่ม polyenes จำนวน 5-10 โมเลกุล เข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะนี้ ด้านที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจะทำให้เกิดเป็นรูเปิดเล็ก ๆ ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป เกิดการรั่วไหลของสาร monovalent cation และ divalent cation เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และสารเมแทบอลิต์อื่น ๆ ออกสู่ภายนอกเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (6, 64) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านเชื้อราในกลุ่ม polyenes (64)

ดังนั้นยาในกลุ่ม polyenes อาจออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal) หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (fungistatic) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือด ถ้าความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำก็จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเนื่องจากยามีความจำเพาะกับสารพวก sterol ต่ำ นอกจากยาจะจับกับ ergosterol ของเชื้อราแล้ว ยังสามารถจับกับ cholesterol ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มนุษย์ได้อีกด้วย ยาในกลุ่มนี้จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพิษที่เกิดต่อไต (64)

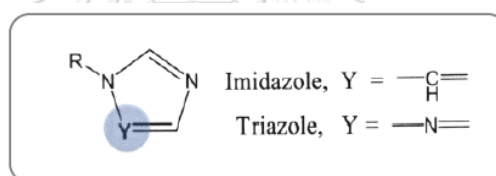
amphotericin B หรือ amphotericin B deoxycholate (AmBd) เป็นยาในกลุ่ม polyenes ที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างและสามารถรักษาการติดเชื้อราในร่างกายที่รุนแรงได้ แต่ปัญหาที่สำคัญของ AmBd คือภาวะพิษต่อไต โดยพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา AmBd ร้อยละ 53 มีค่าซีรัมครีเอตินินเพิ่มขึ้นเท่าตัว และร้อยละ 15 ต้องได้รับการล้างไต นอกจากนี้ AmBd ยังส่งผลให้เกิดการสูญเสียเกลือแร่โพแทสเซียม และแมกนีเซียมออกทางปัสสาวะ ทำให้เกลือแร่ทั้ง 2 ชนิดในเลือดต่ำภาวะเลือดเป็นกรดชนิด anion gap และยังกระตุ้นให้ร่างกายหลั่งสาร cytokines หลายชนิด เช่น prostaglandin E2 ทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้และหนาวสั่นหลังได้รับยา จากการศึกษาการกระจายตัวของยาในร่างกายมนุษย์พบว่า AmBd ถูกดูดซึมได้ไม่ดีในระบบทางเดินอาหาร เมื่อยาเข้าสู่กระแสเลือดจะถูกเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีที่ไต และร่างกายต้องใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ในการกำจัดยาประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ออกจากกระแสเลือด ซึ่งตัวยาที่เหลือต้องใช้เวลาในการกำจัดต่ออีกประมาณ 15 วัน ผ่านทางปัสสาวะและอุจจาระ (64) จากผลข้างเคียงดังกล่าวทำให้มีการพัฒนารูปแบบยาที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไขมัน (lipid formulation) เพื่อให้มีการดูดซึมที่ดีขึ้นและให้มีอาการข้างเคียงน้อยลง ได้แก่ liposomal amphotericin B (LAmB), amphotericin B lipid complex (ABLC) และ amphotericin B colloidal dispersion (ABCD) อย่างไรก็ตามรูปแบบยาที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไขมันเหล่านี้ก็ยังมีราคาสูงและขับออกทางไตได้น้อยกว่า AmBd (69)

nystatin เป็นยาในกลุ่ม polyenes อีกหนึ่งชนิดที่มักใช้รักษาการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปาก ผิวหนัง หลอดอาหาร และอวัยวะเพศหญิง จากการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์พบว่า nystatin ไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายผ่านเยื่อเมือกหรือทางเดินอาหาร และเมื่อปริมาณ nystatin ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ จึงไม่พบการบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ มีเฉพาะรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนสำหรับรับประทาน ยาทาบริเวณผิวหนัง และยาเหน็บช่องคลอดเท่านั้น (64)

จากข้อมูลดังกล่าว จะเห็นได้ว่ายาในกลุ่ม polyenes มีข้อจำกัดหลายประการ ทั้งสมบัติในการละลาย ความคงตัวของสาร หรือความเป็นพิษของสาร จึงได้เกิดความพยายามในการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตำรับยาหรือการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร เพื่อแก้ไขข้อจำกัดของยาต่อไป

2.7.2 ยากลุ่ม Azoles

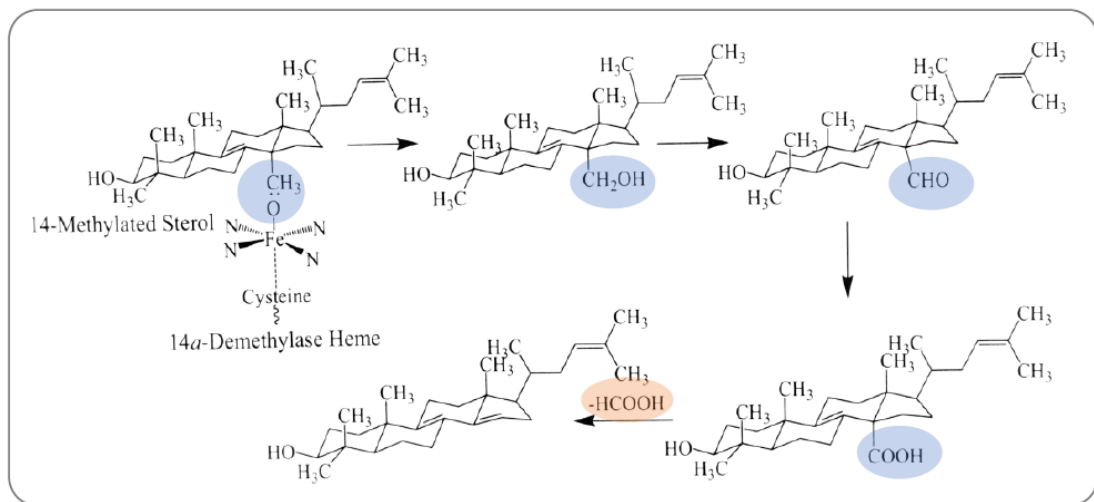
azoles จัดเป็นยาด้านเชื้อราในกลุ่มใหญ่และมีความสำคัญมากในปัจจุบัน โดย azoles เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compounds) ที่มีโมเลกุลเป็นวงแหวน (aromatic systems) ขนาด 5 อะตอมที่ต่างชนิดกัน (heteroatom) สามารถจำแนกตามโครงสร้างได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ imidazole ที่มีอะตอมไนโตรเจนอยู่ในวงแหวน จำนวน 2 อะตอม และ triazole ที่มีอะตอมไนโตรเจนอยู่ในวงแหวน จำนวน 3 อะตอม เป็นต้น อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ดีจะมีหมู่แทนที่ (R) ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2-3 วง ต่อกับวงอิมิดาโซล (imidazole ring) หรือวงไตรเอโซล (triazole ring) ซึ่งวงอะโรมาติกที่เป็นหมู่แทนที่นั้นต้องมีอย่างน้อย 1 วง เป็นฮาโลเจน (halogen) (64) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม azoles (64)

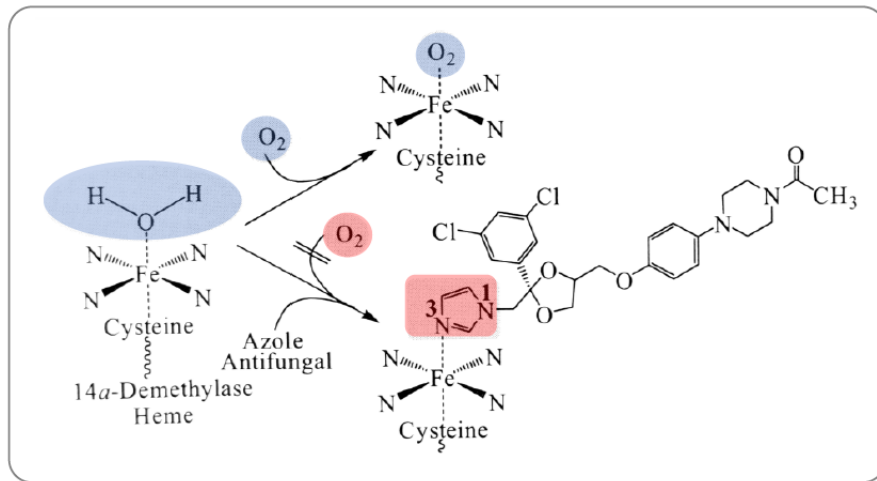
กลไกการออกฤทธิ์ของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม azoles เกิดจากการขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา ยาจะไปยังยังการทำงานของเอนไซม์ 14 α -demethylase (CYP51A1: cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ cytochrome P450 ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน lanosterol เป็น ergosterol ในยูคาริโอติกเซลล์ โดยเอนไซม์ 14 α -demethylase จะทำหน้าที่กำจัดหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 14 α ออกจากโครงสร้างของ 14-methylated sterol ซึ่งกลไกในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดผ่านปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) และปฏิกิริยาออกซิเดชันที่หมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 14 α โดยเปลี่ยนจากไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) เป็นแอลกอฮอล์ (alcohol) แอลดีไฮด์ (aldehyde) และกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) ตามลำดับ จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการกำจัด (elimination) เกิดเป็นพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 14 และ 15 โดยมีกรดฟอร์มิก (formic acid) เกิดขึ้นเป็น

ผลผลิตร่วม (by-product) (ภาพที่ 8) เมื่อการทำงานของเอนไซม์ 14α -demethylase ถูกยับยั้ง จะส่งผลให้เชื้อราสังเคราะห์ ergosterol ในเยื่อหุ้มเซลล์ได้น้อยลง และเกิดการสะสมของ 14-methylated sterol ซึ่งมีลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกับ ergosterol จึงทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป ความแข็งแรงของเซลล์ลดลง เพิ่มคุณสมบัติในการซึมผ่านของสาร ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกสู่ภายนอกเซลล์ จนกระทั่งเซลล์แตกในที่สุด (6, 64)



ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา โดยการทำงานของเอนไซม์ 14α -demethylase (64)

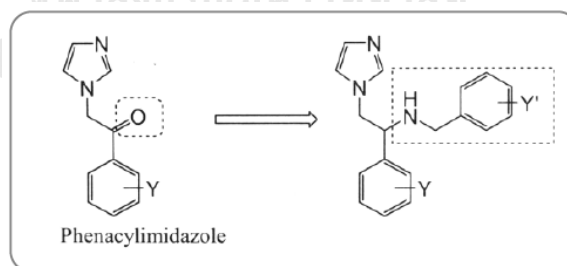
จากการศึกษายาต้านเชื้อราที่เป็นอนุพันธ์ของ imidazole พบว่ากลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 14α -demethylase เกิดจากการที่สารไปยับยั้ง cytochrome P450 ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์ 14α -demethylase โดยอะตอมไนโตรเจนที่ตำแหน่ง 3 ของวงอิมิดาโซลจะไปจับกับเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ใน cytochrome P450 แล้วเกิดการยับยั้งไม่ให้ cytochrome P450 เข้าจับกับอะตอมออกซิเจน ทำให้ cytochrome P450 ไม่สามารถเข้าไปร่วมทำงานกับเอนไซม์ 14α -demethylase ได้ ส่วนหมู่แทนที่ที่มาต่อกับอะตอมไนโตรเจนที่ตำแหน่ง 1 บนวงอิมิดาโซลนั้นจะเป็นส่วนที่จับกับอะโปโปรตีน (apoproteins) ของ cytochrome P450 เพื่อช่วยทำให้มีความเสถียรในการจับกับ cytochrome P450 มากขึ้น ส่งผลกับความแรงและความจำเพาะของยาต่อเชื้อราเมื่อเทียบกับเซลล์มนุษย์ (6, 64) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 กลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 14 α -demethylase (64)

ยาในกลุ่ม azoles เป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง กลไกในการออกฤทธิ์ค่อนข้างคล้ายคลึงกัน สิ่งที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดระหว่างยาภายในกลุ่มนี้คือ คุณสมบัติทางเภสัชจลศาสตร์ของยา ซึ่งจำแนกตามโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ imidazole และอนุพันธ์ของ triazole ดังนี้

1. อนุพันธ์ของ imidazoles ถูกพัฒนาโครงสร้างมาจากสาร phenacylimidazole ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่ม dermatophytes ได้ โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) จากหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ให้เป็นเบนซิลเอมีน (benzylamine) ส่งผลให้สารมีฤทธิ์เพิ่มขึ้น และมีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างขึ้น (ภาพที่ 10)

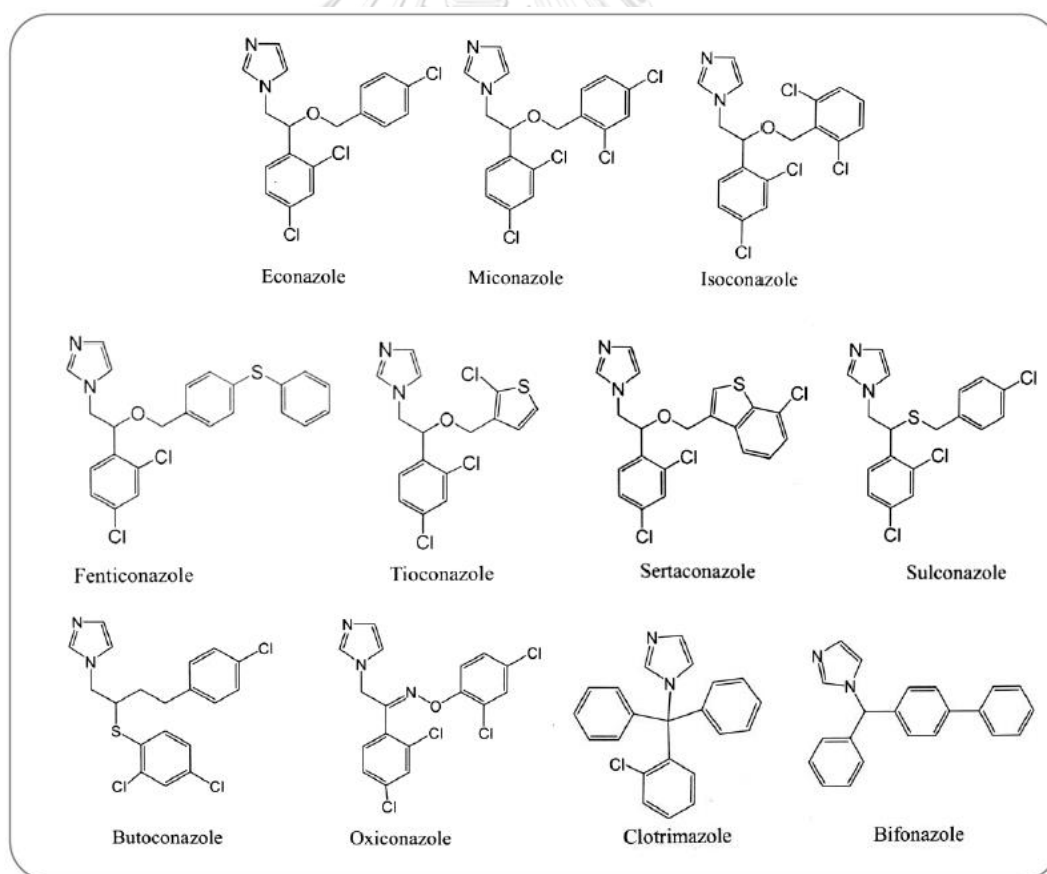


ภาพที่ 10 การพัฒนาโครงสร้างยากกลุ่มอนุพันธ์ของ imidazole (64)

เมื่อมีการพัฒนาโครงสร้างของยาตามหลักไอโซสเตียร์ (isostere) โดยเปลี่ยนโครงสร้างของสารจากเบนซิลเอมีน (-NH-) เป็นเบนซิลอีเทอร์ (-O-) พบว่าได้ยาด้านเชื้อราชนิดทาภายนอกที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง เช่น econazole, miconazole และ isoconazole (ภาพที่ 11)

จากนั้นมีการสังเคราะห์ยาต้านเชื้อราในกลุ่มอนุพันธ์ของ imidazole ขึ้นมามากมาย โดยอาจเปลี่ยนส่วนที่เป็นเบนซิลอีเทอร์ (-O-CH₂-Ph) เป็นเอริลอีเทอร์ (-O-CH₂-Ar) ได้แก่ fenticonazole, tioconazole และ sertaconazole เป็นต้น และเปลี่ยนส่วนเบนซิลอีเทอร์เป็นเบนซิลไทโออีเทอร์ (-S-CH₂-Ph) ได้แก่ sulconazole เป็นต้น (6, 64) (ภาพที่ 11)

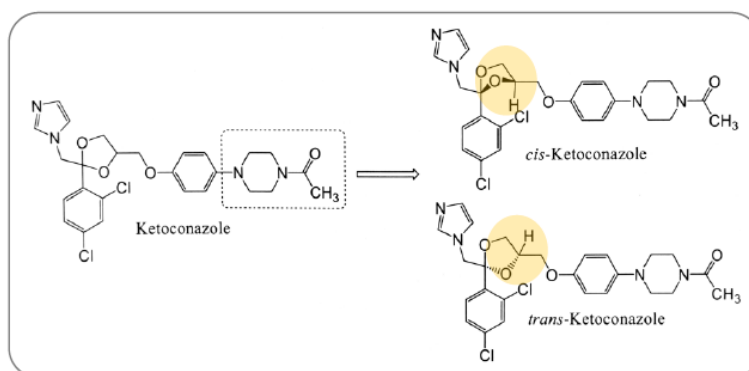
นอกจากนี้ยังมียาต้านเชื้อราอีกหลายชนิดที่มีการพัฒนาให้มีโครงสร้างคล้ายกับสารที่กล่าวมาข้างต้น ได้แก่ butoconazole, oxiconazole, clotrimazole และ bifonazole เป็นต้น โดย butoconazole จะมีโครงสร้างคล้ายกับ sulconazole ต่างกันที่ตำแหน่งของไทโออีเทอร์ เปลี่ยนมาอยู่ระหว่างวงอิมิดาโซลและวงเบนซิล ส่วน oxiconazole เป็นสารที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างจากเบนซิลอีเทอร์หรือเบนซิลไทโออีเทอร์ เป็นออกซิม (oxime, C=N-O) และยังมีการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่มาต่อกับวงอิมิดาโซลเป็นหมู่เอริลมีเทน (arylmethane) ได้เป็น clotrimazole และ bifonazole (6, 64) (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 โครงสร้างยาในกลุ่มอนุพันธ์ของ imidazole (64)

สารที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดเป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ สารมีชีวปริมาณการออกฤทธิ์จากการรับประทานค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมักถูกเมแทบอลิซึมในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และมีความเป็นพิษต่อร่างกายสูง ทำให้ไม่สามารถใช้เป็นยาต้านเชื้อราชนิดรับประทานได้ จึงมีการบริหารยาโดยใช้เป็นยาต้านเชื้อราชนิดทาภายนอกเท่านั้น ต่อมาจึงมีการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ ketal ของ phenacylimidazole เกิดเป็นวงแหวนใหม่จากการรวมโครงสร้าง phenacylimidazole ที่มีหมู่คาร์บอนิล 1 หมู่ เข้ากับโครงสร้าง chlorphenesine ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ ทำให้ได้สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งกลุ่ม dermatophytes และกลุ่ม candida ได้ (5, 64)

อนุพันธ์ ketal ที่สังเคราะห์ได้ยังคงเป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง เช่นเดียวกับยาต้านเชื้อราที่เป็นอนุพันธ์ของ imidazole ตัวอื่น ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น แต่ที่น่าสนใจสำหรับสารกลุ่มนี้คือ สามารถให้โดยการรับประทานได้ อย่างไรก็ตามสารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ยังคงมีความเป็นพิษสูง และจากการศึกษาต่อมาพบว่าหากหมู่แทนที่ในโครงสร้างเป็นวงเฮเทอโรไซคลิกที่มีอะตอมไนโตรเจน เช่น วงไพโรลิดีน (pyrrolidine) วงมอร์โฟลีน (morpholine) และวงพิเพอราซีน (piperazine) จะทำให้สารที่ได้มีฤทธิ์สูงขึ้น และมีความเป็นพิษต่ำกว่าหมู่แทนที่ชนิดอื่น จากการศึกษาทำให้ค้นพบยา ketoconazole ที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่อะซิลพิเพอราซีน (acylpiperazine) ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างตัวแรกที่สามารถให้โดยการรับประทานได้ นอกจากนี้ ketoconazole ยังมีการคอนฟอร์มเมชันของโมเลกุลเป็น *cis*-ketoconazole และ *trans*-ketoconazole และพบว่าไอโซเมอร์แบบ *cis* มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสูง เนื่องจากสามารถจับกับ cytochrome P450 ของเชื้อราได้มากกว่าไอโซเมอร์แบบ *trans* (6, 64) (ภาพที่ 12)



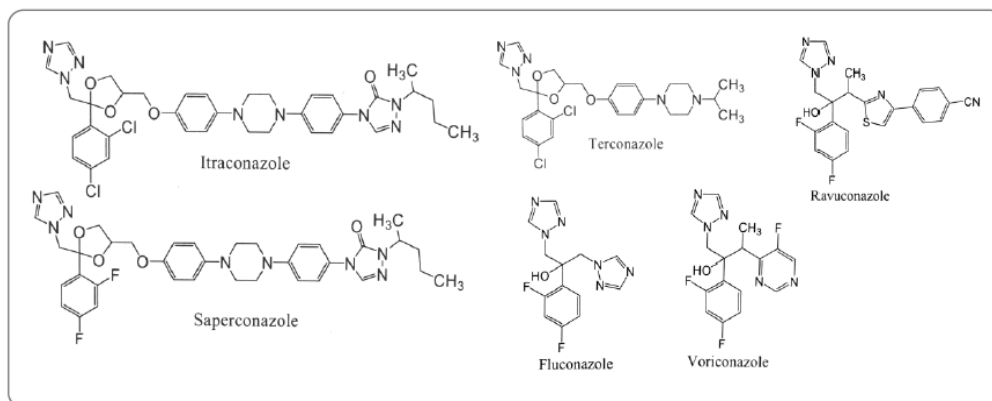
ภาพที่ 12 โครงสร้างของยา ketoconazole (64)

ถึงแม้ว่า ketoconazole จะเป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างที่สามารถรับประทานได้ แต่คุณสมบัติทางเภสัชจลศาสตร์ของยาก็ยังไม่น่าพึงพอใจ เนื่องจากยาไม่สามารถผ่านตัวกรองกั้นระหว่างเลือดและสมอง (blood brain barrier) ได้ มีความเป็นพิษต่อดับ และมีผลต่อระดับฮอร์โมนในร่างกายโดยเฉพาะเทสโทสเตอโรน (testosterone) ที่ลดลง นำไปสู่การมีเต้านมโต และหย่อนสมรรถภาพทางเพศ ข้อจำกัดดังกล่าว มีสาเหตุจากการที่ยามีความจำเพาะในการจับกับ cytochrome P450 ของเชื้อราอย่างไม่สูงพอ จึงสามารถจับและยับยั้งการทำงานของ cytochrome P450 ของมนุษย์ได้และทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการทางชีวเคมีต่าง ๆ ในร่างกายได้ (6)

2. อนุพันธ์ของ triazoles เป็นกลุ่มยาที่ถูกค้นพบจากการพัฒนาโครงสร้างของยา ketoconazole เป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างและมีความจำเพาะต่อเชื้อรามากกว่ากลุ่มอนุพันธ์ของ imidazole จึงมีความเป็นพิษและมีผลต่อระดับฮอร์โมนในร่างกายมนุษย์น้อยกว่า ได้แก่ itraconazole, saperconazole และ terconazole เป็นต้น (ภาพที่ 13)

แม้ว่า itraconazole จะเป็นยาต้านเชื้อราที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างและสามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานได้ แต่สารมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงทำให้มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ไม่แน่นอนและไม่สามารถเตรียมขึ้นมาในรูปแบบยาฉีดได้ ดังนั้นจึงเกิดการพัฒนาเพื่อให้ได้สารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำเพิ่มขึ้น โดยการเปลี่ยนหมู่แฮโลเจนที่ต่อกับวงเบนซิลจากคลอรีน (chlorine) เป็นฟลูออรีน (fluorine) ทำให้ได้ saperconazole ซึ่งเป็นยาชนิดรับประทานที่ละลายน้ำได้ดี มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ดีกว่า itraconazole และสามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำได้ แต่ในระหว่างการทดลองทางคลินิก พบว่ามีรายงานการเกิดมะเร็งในมดลูกของสัตว์ทดลอง จึงยกเลิกการนำยาดังกล่าวมาใช้ในมนุษย์ ส่วน terconazole เป็นยาที่ถูกดัดแปลงจากทางเดินอาหารได้น้อย ไม่สามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานได้ จึงนำมาใช้เป็นยาต้านเชื้อราชนิดทาภายนอกเท่านั้น (70)

นอกจากยาในกลุ่ม triazoles จะมีความเป็นพิษต่อร่างกายต่ำกว่ายาในกลุ่ม imidazoles แล้ว ยากลุ่มนี้ยังมีฤทธิ์สูงกว่าและมีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้างกว่า แต่สารที่พัฒนาขึ้นมา ก็ยังไม่สามารถผ่านเข้าสู่สมองได้ จึงมีการพัฒนาต่อไปจนค้นพบยาต้านเชื้อราที่มีโครงสร้างเป็น bis-triazole ได้แก่ fluconazole ซึ่งเป็นยาชนิดรับประทานที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างเช่นเดียวกับ ketoconazole และ itraconazole แต่มีฤทธิ์สูงกว่า ketoconazole 10-100 เท่า และสามารถผ่านเข้าสู่สมองได้ดีมาก นอกจากนี้ fluconazole ยังสามารถละลายน้ำได้ดีและสามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำได้ และเมื่อมีการพัฒนาโครงสร้างของ fluconazole ต่อไป จึงทำให้ได้สารต้านเชื้อราที่มีฤทธิ์สูงขึ้น ได้แก่ voriconazole และ ravuconazole เป็นต้น (70, 71) (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 โครงสร้างยากลุ่มอนุพันธ์ของ triazoles (64)

2.7.3 ยากลุ่ม Pyrimidine analog

กลุ่มยาอนุพันธ์ของไพริมิดีน (pyrimidine analog) ได้แก่ flucytosine หรือ 5-fluorocytosine (5-FC) เป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง DNA และ RNA ของเชื้อรา ซึ่งมีความไวต่อเชื้อราแคนดิดาเกือบทุกสายพันธุ์ โดยในระยะแรกยา 5-FC ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง แต่จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง แต่เมื่อบริหารยาเข้าสู่ร่างกาย ยาจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ของเชื้อราและเปลี่ยนเป็น 5-fluorouracil (5-FU) โดยเอนไซม์ cytosine deaminase ในเซลล์เชื้อรา จากนั้น 5-FU ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปน้ำตาลฟอสเฟต 5-fluorouracil-ribose monophosphate (5-FUMP), 5-fluorouracil-ribose diphosphate (5-FUDP) และ 5-fluorouracil-ribose triphosphate (5-FUTP) ตามลำดับ เนื่องจาก 5-FUTP ที่เกิดขึ้นเป็นสารแอนติเมแทบอลิต์ของ uracil-ribose triphosphate (UTP) ในการสร้าง RNA ของเชื้อรา จึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสร้าง RNA ของเชื้อรา นอกจากนี้ บางส่วนของ 5-FUMP จะถูกเปลี่ยนเป็น 5-fluorouracil-2-deoxyribose monophosphate (5-FUdRP) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ thymidylate synthetase ในการเปลี่ยน uracil-deoxyribose monophosphate (dUMP) เป็น thymidine-deoxyribose monophosphate (dTMP) ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้าง DNA ของเชื้อรา จึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสร้าง DNA ของเชื้อราได้อีกด้วย (64)

ยา 5-FC มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์น้อยมาก เนื่องจากสารค่อนข้างมีความจำเพาะในการถูกนำเข้าสู่เซลล์ของเชื้อรามากกว่าเซลล์มนุษย์ และเซลล์มนุษย์ไม่มีเอนไซม์ cytosine deaminase ดังนั้นการเกิดพิษต่อเซลล์จากการเปลี่ยน 5-FC เป็น 5-FU จะเกิดในเซลล์

ของเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียในลำไส้บางชนิดสามารถเปลี่ยน 5-FC เป็น 5-FU ได้ จึงทำให้มีโอกาสที่จะเกิดอาการพิษจากการใช้ยาในคนได้ ในปัจจุบันมีการบริหารยา 5-FC เข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานเท่านั้น ยาถูกดูดซึมได้ดีในทางเดินอาหารและถูกขับออกทางไตเป็นหลัก โดยไม่เปลี่ยนแปลงรูป ยาเข้าสู่น้ำไขสันหลังและสารน้ำในตาได้ดี แต่มีข้อเสียคือ หากนำมาใช้เป็นยาเดี่ยว จะเกิดการดื้อยาอย่างรวดเร็ว ดังนั้น 5-FC มักถูกนำมาใช้ร่วมกับยาอื่นในการรักษาการติดเชื้อในเยื่อหุ้มสมองหรือในตา ผลข้างเคียงที่สำคัญ ได้แก่ ภาวะพิษต่อตับ และการกดไขกระดูก เป็นต้น (5)

2.7.4 ยากลุ่ม Echinocandins

echinocandins เป็นกลุ่มยาที่มีโครงสร้างเป็น lipopeptide ที่มีลักษณะเป็น cyclic hexapeptide ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้าง 1,3- β -glucan ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์เชื้อรา ทำให้ผนังเซลล์เชื้อรามีความเปราะบางและถูกทำลายได้ง่ายขึ้น การค้นคว้าสารกลุ่มนี้เริ่มจากการค้นพบฤทธิ์ของ echinocandin B ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี แต่คุณสมบัติในการละลายไม่ดีและขอบเขตในการออกฤทธิ์ค่อนข้างแคบ จึงมีการพัฒนาโครงสร้างของ echinocandin B เพื่อให้ได้สารที่มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้างและมีคุณสมบัติในการละลายที่ดีขึ้น ได้แก่ cilofungin, caspofungin, anidulafungin และ micafungin เป็นต้น อย่างไรก็ตามสาร cilofungin มีความเป็นพิษสูง จึงไม่ถูกนำมาใช้เป็นยา ส่วนสาร caspofungin, anidulafungin และ micafungin ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาให้ใช้เป็นยาด้านเชื้อราได้เฉพาะรูปแบบยาฉีด (72)

ยากลุ่ม echinocandins มีผลข้างเคียงน้อย สามารถกระจายตัวเข้าสู่น้ำไขสันหลังและสารน้ำในตาได้ สามารถสลายตัวได้เองโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ ถูกขับออกมาในปัสสาวะต่ำ และไม่ต้องปรับลดขนาดยาตามการทำงานของไต (5) แต่มีปัญหาในการบริหารยา เนื่องจากยากลุ่มนี้จะมีการบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำเท่านั้น ไม่สามารถบริหารยาในรูปแบบอื่นได้

2.7.5 แนวทางการบริหารยาด้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน

ยาด้านเชื้อราที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน มีวิธีการบริหารยาที่แตกต่างกัน เพื่อให้เหมาะสมต่อการรักษา ชีวปริมาณการออกฤทธิ์ของยาแต่ละประเภท ระดับความรุนแรงของโรค และระดับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยแต่ละราย รวมถึงการตอบสนองและการดื้อยาของเชื้อก่อโรค โดยสามารถแบ่งแนวทางการบริหารยาออกได้เป็น 2 รูปแบบ (ตารางที่ 3) ดังนี้

1. ยาต้านเชื้อราที่ใช้ภายนอก (topical drugs) (74) เป็นการบริหารยาในรูปแบบยาทาภายนอก เพื่อรักษาโรคติดเชื้อราบริเวณผิวหนังชั้นตื้น ผิวหนังชั้นนอก เส้นผม ขน และเล็บ

2. ยาต้านเชื้อราที่มีผลทั่วร่างกาย (systemic drugs) (68) เป็นการบริหารยาเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทาน (oral) และการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (injection) นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อราบริเวณอวัยวะภายในร่างกาย หรือรักษาการติดเชื้อราที่ค่อนข้างดื้อยาและไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยใช้ยาในรูปแบบยาทาภายนอก อีกทั้งสามารถใช้รักษาการติดเชื้อราบริเวณผิวหนังชั้นตื้นที่มีการติดเชื้อลุกลามปริมาณมากได้

ตารางที่ 3 รูปแบบและชนิดของยาต้านเชื้อราที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปัจจุบัน (67, 73)

รูปแบบยา	ชนิดของยาต้านเชื้อรา
ยาต้านเชื้อราที่ใช้ภายนอก	<ul style="list-style-type: none"> ● polyenes: nystatin ● azoles: clotrimazole, ketoconazole, econazole และ miconazole ● allylamines: terbinafine และ naftifine
ยาต้านเชื้อราที่มีผลทั่วร่างกาย	<ul style="list-style-type: none"> ● polyenes: amphotericin B ● azoles: itraconazole, fluconazole, ketoconazole และ voriconazole ● pyrimidine analog: flucytosine ● echinocandins: micafungin, anidulafungin และ caspofungin
● แบบรับประทาน	
● แบบฉีด	

2.8 ปัญหาการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans*

เนื่องจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางการแพทย์ในปัจจุบัน เช่น การปลูกถ่ายอวัยวะ ซึ่งผู้ป่วยจะมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำจากการได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ประกอบกับสถานการณ์ทางเศรษฐกิจและสังคมโลกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ รวมทั้งภาวะสุขภาพและวิถีการดำเนินชีวิตของมนุษย์ที่เสื่อมถอยลง ทำให้มนุษย์มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อรามากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อราฉวยโอกาส เช่น โรคติดเชื้อราแคนดิดา (1) และเนื่องจากข้อจำกัดด้านการรักษาโรคติดเชื้อราแคนดิดาหลายประการ เช่น ยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมีจำกัดและมีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง การรักษาโรค

ใช้ระยะเวลานานและสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ รวมถึงการเข้าถึงยาด้านเชื้อราชนิดใหม่ของผู้ป่วยยังมีข้อจำกัดด้านสิทธิการรักษาและเป็นยาที่มีราคาสูง (7) ส่งผลให้สถานการณ์ด้านการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาและการใช้ยาด้านเชื้อราในปัจจุบัน เป็นไปอย่างไม่ถูกต้องและไม่สมเหตุผลผล ซึ่งผู้ป่วยติดเชื้อมักเข้ารับการรักษาไม่สม่ำเสมอหรือไม่ต่อเนื่อง และผู้ป่วยติดเชื้อนิยมซื้อยาทาหรือรับประทานเอง โดยไม่ได้เข้ารับการรักษาอย่างถูกต้อง (13) ทำให้เชื้อ *C. albicans* มีการพัฒนาแนวทางการดื้อยาด้านเชื้อราขึ้น โดยเฉพาะการดื้อยาในกลุ่ม azoles ซึ่งเป็นยาด้านเชื้อรากลุ่มใหญ่และถูกเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อราแคนดิดาบ่อยที่สุด

ยาในกลุ่ม polyenes และ azoles เป็นยาด้านเชื้อราที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาบ่อยที่สุด แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดของยาในกลุ่ม polyenes ในการบริหารยา การดูดซึมและผลข้างเคียงของยา ทำให้ปัจจุบันนิยมใช้ยาในกลุ่ม azoles ในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดา ยาในกลุ่ม azoles มีการพัฒนาเป็นลำดับเริ่มจากกลุ่ม imidazoles ได้แก่ clotrimazole, miconazole และ ketoconazole ต่อมาเป็นกลุ่ม triazoles ได้แก่ fluconazole, itraconazole และ voriconazole ยาในกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย มีข้อดีคือ ประสิทธิภาพสูง มีความปลอดภัยในการบริหารยา มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยกว่ายาในกลุ่ม polyenes และยังสามารถบริหารยาเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางการรับประทานและการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ทำให้อัตราการใช้ยาในกลุ่ม azoles ในการรักษามากขึ้นและเป็นไปอย่างไม่สมเหตุผล ประกอบกับผลกระทบของการใช้ยาในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ไม่ว่าจะเป็ระยะเวลาของการให้ยา จำนวนครั้งของการให้ยา การตอบสนองต่อยา และอัตราการตายของผู้ป่วยที่เกิดขึ้นจากการรักษา ส่งผลให้อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* ในผู้ป่วยมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น การดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* นั้นพบได้ทั้งจากการรับเชื้อดื้อยามาโดยตรง (primary resistance) และการดื้อยาในภายหลัง (secondary resistance) (74) จากการศึกษาความสอดคล้องของการดื้อยาในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแคนดิดาแบบลุกลาม ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองพบว่าสาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาคือ ความรุนแรงของการติดเชื้อซึ่งทำให้สภาวะการตอบสนองต่อการรักษาลดลง และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อบริเวณช่องปาก ผิวเยื่อ และบริเวณที่คาสายสวน ที่ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาเพิ่มขึ้น แม้ว่าเชื่อนั้นอาจเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา (42) อย่างไรก็ตามจากหลายรายงานการศึกษาทำให้สามารถสรุปปัจจัยที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ ดังนี้

1. ปัจจัยที่เกี่ยวกับเชื้อรา ได้แก่ ปริมาณเชื้อ สายพันธุ์ของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของยีสต์เป็นราสาย ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม และความสามารถในการสร้างกลไกการตอบสนองหรือกำจัดยา เป็นต้น

2. ปัจจัยที่เกี่ยวกับยาต้านเชื้อรา ได้แก่ ปริมาณของยา คุณสมบัติของยาในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อรา จำนวนครั้งของการให้ยา การสะสมของยา เกล็ดขงลนศาสตร์ของยา (pharmacokinetics) และอันตรกิริยาระหว่างยา (drug-drug interaction) เป็นต้น

3. ปัจจัยที่เกี่ยวกับผู้ป่วย เช่น สภาวะการตอบสนองต่อการรักษา ตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพ ความรุนแรงของการติดเชื้อ และการที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เช่น การคาสายสวน เป็นต้น

การดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* เป็นปัญหาที่พบมากขึ้นในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดา โดยเฉพาะการดื้อยาในกลุ่ม azoles เช่น ketoconazole, itraconazole และ fluconazole ที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการรักษาบ่อยที่สุด การดื้อยาส่งผลโดยตรงให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น ทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้น ระยะเวลาในการรักษานานขึ้น โดยไม่สามารถเพิ่มปริมาณยาได้ เนื่องจากความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ และเนื่องจากชนิดของยาต้านเชื้อราที่มีจำกัด การดื้อยาจึงทำให้การรักษาล้มเหลวและอาจรักษาไม่หายได้ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะเดิม และด้วยวิธีการบริหารยา fluconazole มีความหลากหลายในแต่ละประเทศ จึงพบว่า *C. albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีแนวโน้มของการดื้อยา fluconazole เพิ่มขึ้นและอาจมีการแพร่กระจายคุณสมบัติในการดื้อยาไปสู่เชื้อ *Candida* spp. สายพันธุ์อื่นได้ (2) มีรายงานปัญหาโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปากและหลอดอาหารที่รักษาไม่ได้ผลเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 ซึ่งการรักษาที่ไม่ได้ผลอาจตีความได้ว่าเป็นการรักษาด้วยยาต้านเชื้อราในขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสมไม่ได้ผล และไม่สามารถเพิ่มปริมาณยาได้ เนื่องจากความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ โดยเฉพาะยา fluconazole ซึ่งโรคติดเชื้อแคนดิดาที่ติดต่อการรักษา มักพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ และพบว่ามีอุบัติการณ์การเกิดโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปากที่ดื้อต่อยา fluconazole ในผู้ป่วยเอดส์ ต่อมาจึงมีการรักษาแบบ highly active antiretroviral therapy (HAART) คือ ต้องใช้ยา 3 ตัวรวมกันหรือมากกว่านั้น เพื่อรักษาโรคแทรกซ้อนที่เกิดจากเชื้อฉวยโอกาสด้วย เช่น เชื้อราและเชื้อวัณโรค อย่างไรก็ตาม การรักษาที่ไม่ค่อยได้ผลส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการดื้อของยาไม่ตีพอหรืออันตรกิริยาระหว่างยาต่าง ๆ ก็ได้ และมีรายงานพบว่าผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปากที่ดื้อต่อยา fluconazole มีระยะเวลาที่เคยได้รับยาต้านเชื้อราในกลุ่ม azoles มานาน และมีรายงานว่าโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปากแบบเป็น ๆ หาย ๆ มีความสัมพันธ์กับการรักษาที่ล้มเหลวด้วยยา fluconazole (1) แม้ว่าการดื้อยา fluconazole ของเชื้อ *C. albicans* จะเพิ่มมากขึ้นแต่การรักษาที่ล้มเหลวอาจเกิดจากสาเหตุอื่นได้ เช่น การใช้ยาอย่างไม่สมเหตุสมผล ภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ และปัญหาการดูดซึมยาไม่เพียงพอ เป็นต้น (42) จากการศึกษา

ในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 154 ราย เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าผู้ป่วยประมาณครึ่งหนึ่งมีการติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องปาก และ 1 ใน 4 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้รับการรักษาด้วยยากกลุ่ม azoles อยู่ก่อนแล้ว โดยเชื้อ *C. albicans* เป็นสาเหตุของการติดเชื้ออันดับ 1 ประมาณร้อยละ 83 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด และเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยากกลุ่ม azoles มาก่อนแล้ว เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา fluconazole อย่างไรก็ตามอาจพบสายพันธุ์ดื้อยา fluconazole ได้ในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยากกลุ่ม azoles มาก่อน ซึ่งอาจได้รับเชื้อสายพันธุ์ดื้อยามาจากผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดาคนอื่นผ่านทางสารคัดหลั่งต่าง ๆ ได้ (6)

จากรายงานของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหรัฐฯ หรือ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ระบุว่าเชื้อ *Candida* spp. ที่สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในมนุษย์มีมากกว่า 20 ชนิด และชนิดที่พบมากที่สุดคือ *C. albicans* นอกจากนี้ CDC ยังจัดอันดับ Fluconazole-resistant *Candida* spp. อยู่ในภัยคุกคามร้ายแรง ที่เป็นปัญหาสำคัญและต้องดำเนินการแก้ไขอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการลุกลาม เช่นเดียวกับแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น Multidrug-resistant *Acinetobacter*, Drug-resistant *Campylobacter*, Extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBLs), Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ Drug-resistant tuberculosis (14)

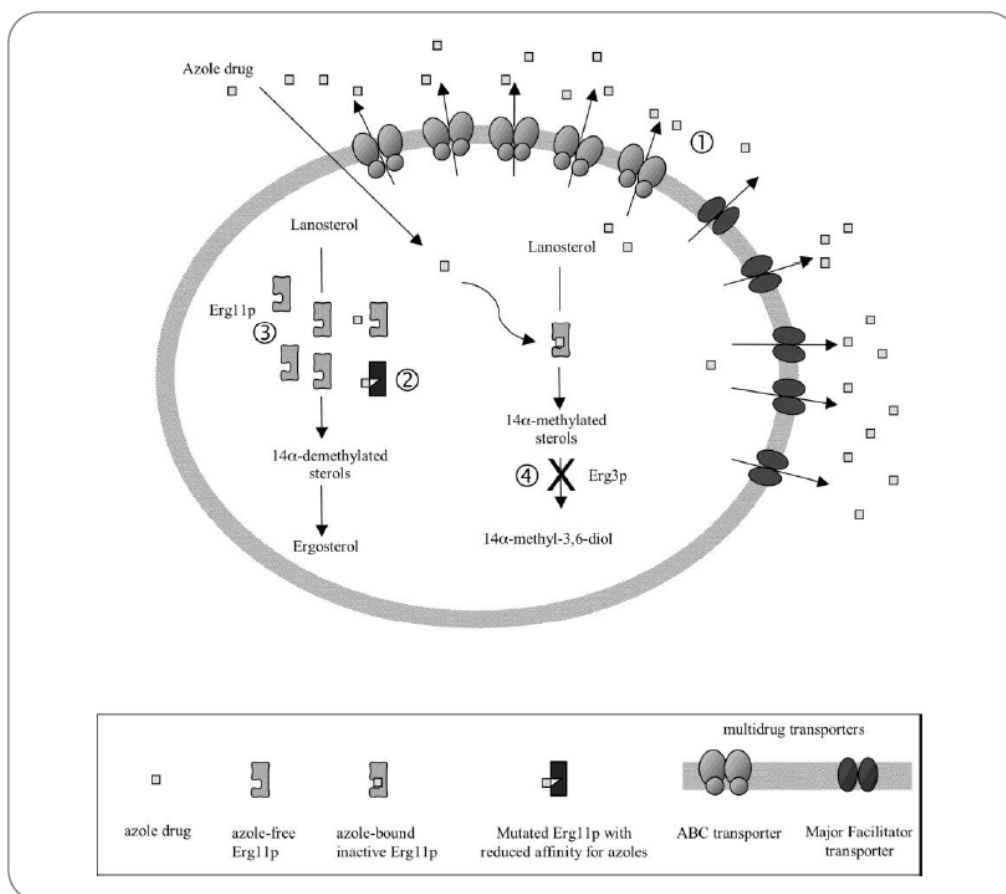
ในการทดสอบความไวของเชื้อ *C. albicans* ต่อยาต้านเชื้อราสามารถดำเนินการได้ตามแนวปฏิบัติมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) หรือ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) เป็นวิธีการวัดอัตราการลดการเจริญเติบโตของเชื้อราในหลอดทดลอง เมื่อทดสอบด้วยยาต้านเชื้อราที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และสามารถแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านเชื้อราที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (minimum inhibition concentration, MIC) ซึ่งสะท้อนถึงการออกฤทธิ์ของยาต้านเชื้อรา อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบความไวของ *C. albicans* ต่อยาต้านเชื้อราอาจไม่สอดคล้องกับการตอบสนองทางคลินิกได้ เนื่องจากการทดสอบการดื้อยาในหลอดทดลอง (in vitro resistance) แต่หากพบการดื้อยาในหลอดทดลองก็ทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่าอาจเกิดการดื้อยาในสัตว์ทดลองหรือในร่างกายได้ (in vivo resistance) หลายรายงานการวิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการรักษาทางคลินิกกับผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาและการศึกษาด้านพันธุกรรมของเชื้อ (in vitro) ทำให้มีรายงานเพิ่มมากขึ้นและสามารถ

สรุปเกณฑ์การแปลผล (interpretive criteria) ในการทดสอบความไวของเชื้อ *Candida* spp. ต่อ ยาต้านเชื้อราได้ 2 รูปแบบ คือ ค่าจุดตัดทางระบาดวิทยา (epidemiological cutoff, ECOFF) และ ค่าจุดตัดความไวของยา (clinical breakpoints, CBP) โดยค่า ECOFF เป็นค่าเกณฑ์ตัดสินผลบวก ที่ได้จากตัวแทนประชากรในกลุ่ม wild-type ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ non-wild-type ที่อาจ แสดงกลไกการดื้อยาต้านเชื้อราอย่างจำเพาะในหลอดทดลองได้ และค่า CBP เป็นค่าที่ได้จากการ วิเคราะห์ ปัจจัยทางคลินิกต่าง ๆ ร่วมด้วย ได้แก่ เกสัชจลศาสตร์ของยา กลไกการดื้อยา และการ ตอบสนองทางคลินิก (75) ทำให้สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาและไวต่อยาได้จากการ ประเมินค่า MIC ของยาได้

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่า CBP ตามมาตรฐาน CLSI พบว่าในปี พ.ศ. 2551 CLSI ได้ กำหนดค่า CBP ของยา fluconazole ต่อเชื้อ *Candida* spp. ทุกสปีชีส์ อยู่ที่ 8 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ต่อมาในปี พ.ศ. 2555 CLSI ได้กำหนดค่า CBP ของยา fluconazole ที่จำเพาะต่อ *Candida* spp. แต่ละสปีชีส์ สำหรับ *C. albicans* อยู่ที่ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (15) แสดงให้เห็น ความสำคัญของการวินิจฉัยเชื้อ *Candida* spp. ในระดับสปีชีส์ โดยเฉพาะเชื้อ *C. albicans* ที่มี การ กำหนดค่า CBP ของยา fluconazole ที่บ่งชี้ว่าเชื้อไวต่อยาลดลง และแสดงถึงแนวโน้มการดื้อยาที่ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในอนาคต

2.9 กลไกการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans*

การดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยที่เกี่ยวกับเชื้อรา ยาด้าน เชื้อราและผู้ป่วย ดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะปัญหาการดื้อยากลุ่ม azoles เช่น ketoconazole, itraconazole และ fluconazole ที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการรักษาบ่อยที่สุด การดื้อยาส่งผลโดยตรง ให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น ทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้น ระยะเวลาในการรักษานานขึ้น ตลอดจนไม่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะเดิม สำหรับกลไกการดื้อยากลุ่ม azoles ของเชื้อ *C. albicans* ในปัจจุบันสามารถจำแนกได้ 3 ประเภท ได้แก่ 1) การลดความเข้มข้นของยาภายใน เซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของยาไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อได้ 2) การเปลี่ยนแปลง บริเวณที่เป็นเป้าหมายของยา ทำให้ยาไม่สามารถจดจำบริเวณนั้นได้ และ 3) การเปลี่ยนแปลง กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (metabolic bypasses) (ภาพที่ 14) รายละเอียดดังนี้



ภาพที่ 14 กลไกการดื้อยาของกลุ่ม azoles ของเชื้อ *C. albicans* (16, 76)

- (1) การลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ โดยการเพิ่ม ABC และ MFS transporters protein
- (2) การเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป็นเป้าหมายของยา (3) การเพิ่ม Erg11p ที่เป็นเป้าหมายของยา และ
- (4) การเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยขัดขวางการสร้าง toxic sterol ภายในเซลล์

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.9.1 การลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์

2.9.1.1 ATP-binding cassette (ABC) transporters

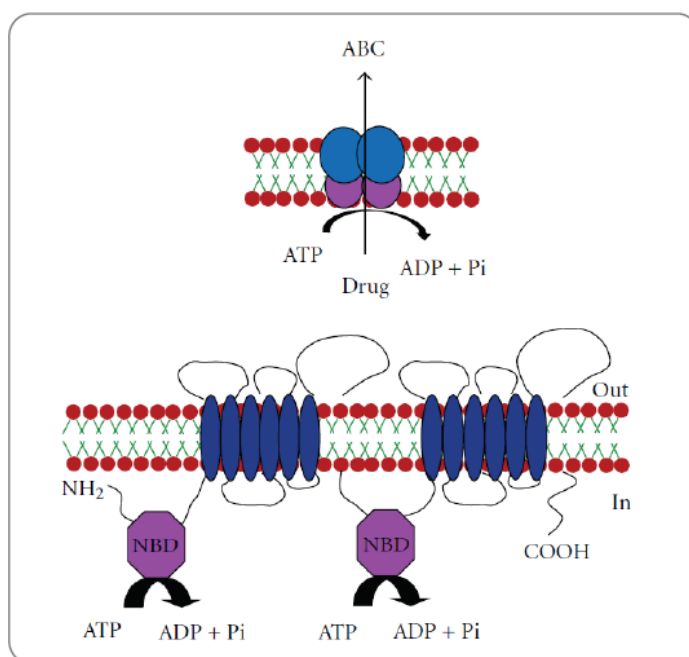
ATP-binding cassette (ABC) transporters คือกลุ่มโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีหน้าที่ขนส่งสารเข้าและออกจากเซลล์โดยใช้พลังงานแบบปฐมภูมิ (primary active transport) คือการขนส่งสารโดยอาศัยพลังงานจากกระบวนการจับยึดเหนี่ยวและการสลาย ATP (ATP binding and hydrolysis) โดยตรง โครงสร้างหลักของ ABC transporters ประกอบด้วย 4 sub-domains ได้แก่ 2 transmembrane domains (TMDs) และ 2 nucleotide-binding domains (NBDs) (ภาพที่ 15) โดย TMDs เป็นโปรตีนที่แทรกอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่จับกับสารหรือยาและนำส่งออกนอกเซลล์ ในขณะที่ NBDs จะเป็นโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ มีหน้าที่

สังเคราะห์พลังงานผ่านกระบวนการจับยึดเหนี่ยวและการสลาย ATP และส่งต่อพลังงานไปยัง TMDs ซึ่งเป็นกลไกการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบใช้พลังงาน (active transport) และเนื่องจาก NBDs ประกอบด้วย ATP-binding site และกรดอะมิโนที่จำเพาะในการจับกับ ATP จึงพบว่าโปรตีนในส่วน NBDs จะมีลำดับกรดอะมิโนที่ค่อนข้างจำเพาะและเป็นบริเวณอนุรักษ์ (highly conserved amino acid motifs) (77-79) สำหรับกลไกการทำงานของ ABC transporters เริ่มขึ้นเมื่อมีการจับกันระหว่าง small hydrophobic substrate molecules ที่ตำแหน่ง NBDs กับบริเวณ high affinity site ด้านในของ plasma membrane ทำให้ substrate ผ่านออกนอกเซลล์ได้ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่เชื้อดื้อยาหลายชนิดใช้เพื่อลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ (78)

ABC proteins ที่พบได้บ่อยที่สุดและมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาทางคลินิกของ *C. albicans* คือ Cdr1 และ Cdr2 (17-19, 80) จัดเป็น full-size ABC transporters ที่ประกอบด้วย 2 TMDs และ 2 NBDs ซึ่งแต่ละ TMDs จะประกอบด้วย 6 transmembrane spans (TMSs) ต่อกันทำให้เกิดช่องผ่าน (transport channel) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 15) Cdr1 และ Cdr2 เป็น ABC proteins ประเภท pleiotropic drug resistance (PDR) ทำให้มีการดื้อยามากกว่าหนึ่งชนิดและมีความจำเพาะในการจับกับ substrate ได้กว้าง โดยพบว่า *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Cdr1 และ Cdr2 จะเกิดการดื้อต่อยา fluconazole, ketoconazole, miconazole, itraconazole, rhodamine 6G, chlorhexidine, cerulenin และสารอื่นอีกหลายชนิด (78) และพบว่าเชื้อ azole-resistant *C. albicans* ที่แยกได้ทางคลินิก มีการแสดงออกของโปรตีน Cdr1 และ Cdr2 ในระดับสูง (17-19) จากหลายรายงานการศึกษา พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน Cdr1 และ Cdr2 คือ *CDR1* และ *CDR2* โดยมีหลายรายงานการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวกับการเกิด multiple azole resistance (itraconazole, ketoconazole และ fluconazole) เช่น เมื่อใส่พลาสมิดที่มี *CDR1* และ *CDR2* สูงในเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ delete ยีนนี้แล้ว พบว่าเชื้อมีการดื้อยาสูงขึ้น และพบว่าหน้าที่ของ *CDR1* และ *CDR2* ใน *C. albicans* คล้ายกับ *PDR5* ในเชื้อ *S. cerevisiae* ด้วย (26, 81)

นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *TAC1* ที่ทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcriptional activators) ของยีน *CDR* มีบทบาทสำคัญในกลไกการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* โดย Tac1p เป็นโปรตีนกลุ่ม zinc-finger Tac1p จะจับกับ drug response element (DRE) บริเวณที่มีส่วนซ้ำของเบส CGG 2 ครั้ง ตำแหน่งของยีนนี้อยู่ใกล้กับบริเวณ mating-type-like (MTL) locus จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *TAC1* กับการดื้อยาในการทดลอง โดยทำการกระตุ้น

เชื้อ non *TAC1-C. albicans* ด้วย homozygous clinical azole-resistant strain (DSY296) ที่มี *TAC1* allele พบว่าเชื้อที่ถูกกระตุ้นมีการแสดงออกของ *CDR1* และ *CDR2* เพิ่มสูงขึ้น (82) เมื่อศึกษาด้วยวิธี Microarray และ Northern blot พบว่า *TAC1* ทำให้เกิด overexpression ของ azole-resistant strains โดย upregulate ของ *CDR1* และ *CDR2* (83) และสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นได้อีก เช่น *RTA3*, *IFU5*, *HSP12* และ *PDR16* (82, 84)

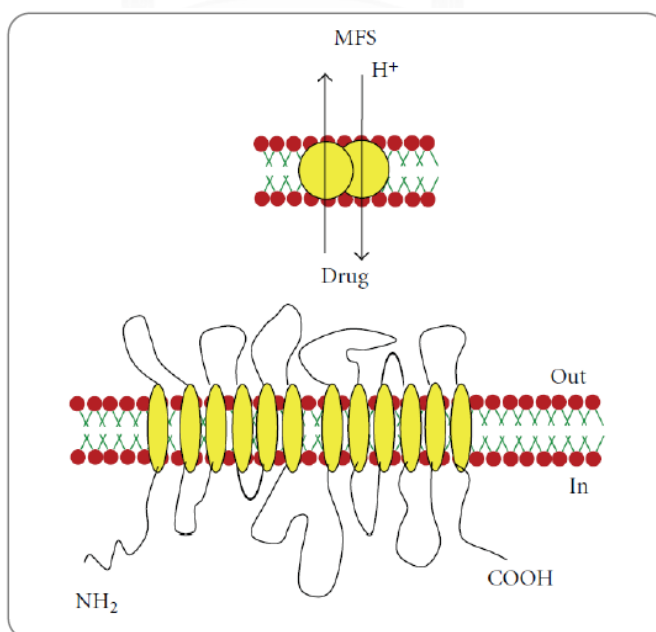


ภาพที่ 15 โครงสร้างของ ATP-binding cassette (ABC) transporters (85)

2.9.1.2 Major facilitator superfamily (MFS) transporters

Major facilitator superfamily (MFS) transporters คือกลุ่มโปรตีนที่แทรกอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่ขนส่งสารเข้าและออกจากเซลล์โดยใช้พลังงานแบบทุติยภูมิ (secondary active transport) คือการขนส่งสารสองชนิดที่อาศัยพลังงานโดยทางอ้อม เป็นพลังงานที่สะสมไว้ในขณะที่สารตัวหนึ่งถูกขนส่งตาม electrochemical gradient ทำให้เกิดพลังงานขึ้น เพื่อใช้ขนส่งสารอีกตัวหนึ่งที่ถูกขนส่งต้าน electrochemical gradient เกิดได้ทั้งแบบทิศทางเดียวกัน (symporter) และแบบทิศทางตรงกันข้าม (antiporter) โครงสร้างหลักของ MFS transporters ประกอบด้วย 12 หรือ 14 TMSs (ภาพที่ 16) จากหลายรายงานการศึกษาพบ MFS transporters กว่า 95 ชนิดในเชื้อ *C. albicans* และสามารถจำแนกได้ 4 families ได้แก่ SP (sugar porter), DHA1 (drug:H⁺ antiporter 1), DHA2 (drug:H⁺ antiporter 2) และ ACS (anion:cation symporter) (86)

MFS proteins ที่พบได้บ่อยที่สุดและมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาทางคลินิกของ *C. albicans* คือ Mdr1 ที่ประกอบด้วย 12 TMSs ต่อกันทำให้เกิดช่องผ่านบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 16) จัดเป็น MFS transporters กลุ่ม DHA1 ทำหน้าที่เป็น proton antiporters ช่วยขับสารกลุ่ม hydrophobic compounds ออกจากเซลล์ ได้แก่ benomyl, methorexate, cycloheximide, benzotriazoles, 4-nitroquinoline-N-oxide, fluconazole และ sulfometuron methyl เป็นต้น (32, 33) จากหลายรายงานการศึกษา พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน Mdr1 คือ *MDR1* และพบว่า azole-resistant *C. albicans* ที่แยกได้ทางคลินิกมีการแสดงออกของโปรตีน Mdr1 ในระดับสูง ซึ่งการแสดงออกของ Mdr1 มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ ยิ่งมีการแสดงออกของ Mdr1 มาก เชื่อจะสามารถขับยาออกนอกเซลล์ได้มากและทำให้การรักษาไม่ได้ผล อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า MFS multidrug efflux transporters มีความสามารถในการจับกับ substrate ได้แคบกว่า ABC multidrug efflux transporters (78) และเนื่องจาก Mdr1 มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำน้อยกว่า Cdr1 และมีบริเวณที่จำเพาะกับ substrate น้อยกว่า Cdr1 ทำให้สามารถขับยา fluconazole และ ketoconazole ออกจากเซลล์ได้ แต่ไม่สามารถขับยา miconazole หรือ itraconazole ออกจากเซลล์ได้ (4, 87) การสร้าง MFS multidrug efflux transporters Mdr1 จึงจัดเป็นกลไกการดื้อยา fluconazole ที่สำคัญอีกกลไกหนึ่งของ *C. albicans* นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายของยาและการสร้าง ABC multidrug efflux transporters Cdr1 และ Cdr2



ภาพที่ 16 โครงสร้างของ Major facilitator superfamily (MFS) transporters (85)

2.9.1.3 Overexpression of *ERG11* gene

กลไกการดื้อยาในกลุ่มยิวคาร์โอดิกเซลล์ส่วนใหญ่เกิดจากการเพิ่มการแสดงออกของยีนซึ่งจะส่งผลถึงการเพิ่มการทำงานของโปรตีนด้วย สำหรับยาในกลุ่ม azoles ที่ออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ 14 α -demethylase จึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวถูกถอดรหัสโดยยีน *ERG11* ในกรณีนี้เมื่อเชื้อ *C. albicans* เพิ่มการแสดงออกของยีน *ERG11* มากขึ้นจึงทำให้เกิดโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ 14 α -demethylase เพิ่มขึ้นด้วย และจำเป็นต้องใช้ยาในปริมาณมากขึ้น เพื่อให้การจับกันระหว่างยากับเอนไซม์มีความสมดุล (17, 18) (ภาพที่ 14)

2.9.2 การเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป็นเป้าหมายของยา

การเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป็นเป้าหมายของยาจัดเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาในกลุ่ม azoles และ echinocandins โดยเฉพาะยาในกลุ่ม azoles บริเวณที่เป็นเป้าหมายของยาในกลุ่ม azoles คือ เอนไซม์ 14 α -demethylase ซึ่งถูกถอดรหัสโดยยีน *ERG11* ในกรณีของ *C. albicans* อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *ERG11* (mutation of *ERG11* gene) มีผลให้ลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของเอนไซม์ 14 α -demethylase เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้ยาเข้าจับกับบริเวณเป้าหมายได้น้อยลงหรือไม่สามารถเข้าจับกับบริเวณเป้าหมายได้ จากหลายรายงานการศึกษา พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างได้หลายตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม ผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *ERG11* อาจส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยาในระดับแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความจำเพาะของโครงสร้างของยาที่สามารถจับกับบริเวณเป้าหมายได้ โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *ERG11* ส่งผลให้เชื้อดื้อยา fluconazole ในระดับสูง และดื้อยา posaconazole ในระดับต่ำ (88, 89) (ภาพที่ 14)

2.9.3 การเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์

การเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เป็นกลไกการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* กลไกหนึ่งที่มีรายงานการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol โดยการยับยั้งการทำงานของยีน *ERG3* ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน Erg3p เมื่อยา fluconazole จับกับเอนไซม์ 14 α -demethylase จะเกิดการสะสมของ 14-methylated sterol ที่มีลักษณะรูปร่างและสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกับ ergosterol และ

โปรตีน Erg3p จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารดังกล่าวไปเป็น toxic sterol ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพที่ 2.14) ดังนั้นถ้าเซลล์สูญเสียการทำงานของยีน *ERG3* หรือ Erg3p สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์จะลดลงและเชื้อจะเกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามในกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ให้สมบูรณ์ได้นั้นต้องอาศัยยีนหลายชนิดในการทำงาน การยับยั้งการทำงานของยีน *ERG3* จึงเป็นเพียงหนึ่งในสมมติฐานและพบว่าเชื้อต่างสปีชีส์อาจให้ผลแตกต่างกันได้ (90, 91)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *CDR2* ใน fluconazole-resistant *C. albicans* จำนวน 40 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณปากช่องคลอดที่มีการติดเชื้อแบบซ้ำซาก ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึกลับแบบย้อนกลับ (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) โดยยีน multi-drug resistance (*MDR*) และยีน candida drug resistance (*CDR*) เป็นยีนหลักที่ทำให้ *C. albicans* เกิดการดื้อยา ผลการศึกษาพบว่า fluconazole-resistance *C. albicans* ที่แยกได้มีการแสดงออกของยีน *CDR2* จำนวน 35 ไอโซเลท (ร้อยละ 87.5) มีการแสดงออกของยีน *MDR1* จำนวน 32 ไอโซเลท (ร้อยละ 80) และมีการแสดงออกทั้งยีน *CDR2* และ *MDR1* จำนวน 30 ไอโซเลท (ร้อยละ 75) แสดงให้เห็นถึงอัตราการแสดงออกของยีน *CDR2* และ *MDR1* ที่สูงกว่าปกติใน fluconazole-resistant *C. albicans* ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การรักษาล้มเหลวและส่งผลให้ผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ดังนั้นการรักษาด้วยสารธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยีนดังกล่าว อาจนำไปสู่ความสำเร็จในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณช่องคลอด โดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อแบบซ้ำซากหรือแบบเรื้อรังต่อไป (21)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนความไวต่อยาในกลุ่ม azoles กับการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* (ถอดรหัสเป็น transporter proteins บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา) และยีน *ERG11* (ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ 14 α -demethylase บริเวณเป้าหมายของยากลุ่ม azoles) ในเชื้อ *C. albicans* จำนวน 120 ไอโซเลท ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยติดเชื้อแคนดิดา ประกอบด้วย azole-resistance *C. albicans* จำนวน 60 ไอโซเลท และ azole-susceptible *C. albicans* จำนวน 60 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค RT-qPCR พบว่า azole-resistance *C. albicans* มีการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ azole-susceptible *C. albicans* (20)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG11* และ *FLU1* ใน fluconazole-resistance *C. albicans* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *ERG11* ที่ตำแหน่ง G487T และ T916C จำนวนรวม 14 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและมีการติดเชื้อแคนดิดาแบบฉวยโอกาส ด้วยเทคนิค RT-qPCR โดยยีนดังกล่าวเป็นยีนหลักที่ทำให้ *C. albicans* เกิดการดื้อยาหลายชนิด ผลการศึกษาพบว่า fluconazole-resistance *C. albicans* ที่แยกได้ทุกไอโซเลทมีการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* สูงขึ้นและบางไอโซเลทมีการแสดงออกของยีน *MDR1*, *FLU1* และ *ERG11* ระดับสูง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าการที่ *C. albicans* มีการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* สูงขึ้นกว่าปกติ ประกอบกับการกลายพันธุ์ของยีน *ERG11* อาจเป็นกลไกหลักสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยา fluconazole และยาชนิดอื่น ๆ (22)

นอกจากนี้ จากหลายรายงานการศึกษา พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* (18, 23, 24) และยังพิสูจน์ให้เห็นว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัสเป็น transporter proteins มีผลให้ *C. albicans* ดื้อต่อยา fluconazole สูงขึ้นถึงร้อยละ 85 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type (25) รวมทั้งพบว่าเมื่อมีการกำจัดส่วนของยีนที่ถอดรหัสเป็น transporter proteins ดังกล่าว จะสามารถลดระดับการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* ลงได้ (26) ดังนั้น การคิดค้นสารจากธรรมชาติชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ที่ถอดรหัสเป็น transporter proteins บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และยีน *ERG11* ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ 14 α -demethylase ในกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ของเชื้อรา จึงอาจนำไปสู่ความสำเร็จในการจัดการปัญหาเชื้อดื้อยาและการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาต่อไปในอนาคต

2.10 เสม็ดขาว (Cajuput tree)

เสม็ดขาว (Cajuput tree) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Melaleuca cajuputi* Powell, synonym: *M. leucadendron* Linn., *M. leucadendra* Linn. var. *minor* Duthie เป็นพืชสกุลเสม็ดในวงศ์ *Myrtaceae* เช่นเดียวกับยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globulus* Labill.) พืชในวงศ์นี้สามารถพบได้ทั่วโลกประมาณ 95 สกุล 3,600 ชนิด กระจายอยู่กว้างขวางในเขตร้อน โดยเฉพาะฝั่งซีกโลกใต้ในทวีปออสเตรเลียและโอเชียเนีย แต่มีเพียงชนิดเดียวที่แพร่กระจายสู่ทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศอินเดีย คือ เสม็ดขาว **ลักษณะทั่วไป** ไม้ต้น ไม่ผลัดใบ มีขนาดเล็กถึงขนาดกลางประมาณ

5-25 เมตร เรือนยอดแคบ พุ่มทรงสูง เปลือกชั้นในสีน้ำตาลอ่อน เปลือกนอกสีขาวถึงน้ำตาลเทา เปลือกเป็นแผ่นบาง เรียงซ้อนกันเป็นปีกหนา ลอกออกได้เป็นแผ่น ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ แผ่นใบรูปหอกโค้งเล็กน้อย ขนาดความกว้างประมาณ 1.5-4 เซนติเมตร และยาว 5-10 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ เนื้อใบหนากรอบ สีเขียวอมเทา ผิวใบเกลี้ยง มีเส้นใบหลัก 5-7 เส้น ออกจากโคนจรดปลายใบ ใบอ่อนมีขนคล้ายเส้นไหมปกคลุม ดอก ดอกเป็นช่อเชิงลดคล้ายหางกระรอก ออกตามซอกใบหรือใกล้ปลายกิ่ง ขนาดประมาณ 7.5-15 เซนติเมตร สีขาว มีขนเล็กน้อย มีก้านเกสรเพศผู้ยาวพันกลีบดอกเป็นพู่ ผล ผลแห้งแตก รูปถ้วย ขนาดเล็กประมาณ 0.4 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลอมเทา ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กอยู่จำนวนมาก (92-94) ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ลักษณะทั่วไปของเสม็ดขาว (92)

เสม็ดขาวมักขึ้นกระจายพันธุ์รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ในพื้นที่ชุ่มน้ำเป็นบริเวณกว้างในภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย ตามขอบป่าพรุ ป่าชายทะเล และป่าชายเลนที่น้ำท่วมถึงน้อย ในภาคใต้ขึ้นในป่าพรุรวมพื้นที่ประมาณ 343,441.33 ไร่ จังหวัดที่พบมากที่สุดคือ จังหวัดนราธิวาส พื้นที่ประมาณ 137,446.88 ไร่ รองลงมาคือ จังหวัดนครศรีธรรมราช พื้นที่ประมาณ 118,412.51 ไร่ และยังพบในจังหวัด สงขลา ปัตตานี พัทลุง สุราษฎร์ธานี ตรัง และชุมพร ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบในป่าพรุรวมพื้นที่ประมาณ 3,578.18 ไร่ (29) เสม็ดขาวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ทั้งดินกรด ดินเค็ม น้ำท่วมขัง และแห้งแล้ง ขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยการเพาะเมล็ด สามารถปลูกในน้ำท่วมไม่ถึง พื้นที่พรุเสื่อมโทรม หรือพื้นที่ที่มีน้ำขังได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำโคก ซึ่งสภาพพื้นที่ที่ไม่เสม็ดขาวสามารถเจริญเติบโตได้ดีเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่รกร้างว่างเปล่าที่พืชเกษตรและ

ไม้ปาชนิดอื่นเจริญเติบโตได้ไม่ดีหรือให้ผลผลิตที่ไม่คุ้มค่า ในอดีตชาวบ้านไม่นิยมนำเสมีดขาวมาใช้ประโยชน์ แต่ปัจจุบันพบว่าหลายหน่วยงานในหลายพื้นที่ของกรมป่าไม้ ได้เริ่มทำการศึกษา และวิจัยเกี่ยวกับไม้เสมีดขาวเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการน้อมนำพระราชดำริของสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ว่า “ไม้เสมีด คนอื่นเขามองว่าเป็นไม้เสี่ยงเครื่อง แต่ข้อเท็จจริง เป็นไม้ที่มีประโยชน์มาก หากทำดี ๆ จะเป็นการเพิ่มมูลค่า สร้างงาน สร้างรายได้ ในราษฎรได้มาก” ตลอดจนมีการถ่ายทอดองค์ความรู้และบริการวิชาการแก่คนในชุมชน ให้ได้ตระหนักถึงความสำคัญของป่าเสมีดขาวที่มีอยู่ในท้องถิ่นของตนมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าและยั่งยืน รวมทั้งการพัฒนาเป็นพื้นที่สวนป่าเศรษฐกิจต่อไป (29, 94)

การใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นการใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ เนื่องจากเนื้อไม้เสมีดขาวมีความคงทนต่อสภาพเปียกชื้นและน้ำเค็มได้ดี จึงสามารถนำมาใช้ทำเสาเข็ม สร้างบ้าน ทำเฟอร์นิเจอร์ รั้ว และถ่าน ส่วนเปลือกต้นใช้มุงหลังคาหรือห่อก้อนได้สำหรับใช้จุดไฟ ใบนำมาต้มน้ำชาหรือนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ใบ ดอกและยอดอ่อนมีรสเผ็ดใช้รับประทานเป็นผักจิ้มกับน้ำพริก และใบสดนำมากลั่นน้ำมันหอมระเหยได้ มีกลิ่นคล้ายการบูร เรียกว่า น้ำมันเสมีดหรือน้ำมันเซียว (Cajuput oil) มีคุณสมบัติทางยาคล้ายน้ำมันยูคาลิปตัส นิยมใช้ในการรักษาโรคแบบพื้นบ้าน แก้อาการปวดเมื่อย ไขข้ออักเสบ ปวดศีรษะ ปวดฟัน รักษาโรคผิวหนัง สิว ฆ่าเชื้อโรค ฆ่าแมลง หรือใช้ภายในเป็นยากระตุ้นขับลม แก้อักเสบ ท้องอืด ขับเสมหะ และขับพยาธิ เป็นต้น และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มได้อีกหลายอย่าง เช่น สบู่เหลวล้างหน้า สเปรย์ไล่ยุง ฆ่าปลวก ป้องกันทาก ฐูปกันยุง และแชมพูสุนัข เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าในประเทศเวียดนามจะใช้ป่าเสมีดเป็นที่กักเก็บน้ำ เพื่อช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำที่เป็นกรดให้มีความเป็นกรดลดลงก่อนนำไปใช้ปลูกข้าว (29, 30)

น้ำมันหอมระเหย เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชั้นทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นด้วยองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่หลากหลาย ซึ่งส่วนใหญ่มีกระบวนการชีวสังเคราะห์มาจากหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) 2-3 หน่วย เกิดเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpene) เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpene) และสังเคราะห์มาจากกรดซิมมิกเกิดเป็นสารกลุ่มฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) โดยพืชแต่ละสายพันธุ์จะประกอบด้วยชนิดและปริมาณขององค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้พืชแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติทางชีวภาพและมีกลิ่นที่เฉพาะตัว เช่น กุหลาบ กระดังงา ยูคาลิปตัส และลาเวนเดอร์ เป็นต้น พืชแต่ละสายพันธุ์จะสร้างและสะสมสารหอมระเหยเหล่านี้ไว้ในเซลล์พิเศษ ต่อมหรือท่อ ภายในส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชแตกต่างกันออกไป เช่น ต่อมบนผิวใบ เปลือก ดอก เปลือกผลไม้ และเมล็ด เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าการนำน้ำมันหอมระเหยมา

ใช้ประโยชน์ด้านการบำบัดรักษาทางสุนทรบำบัดหรือการดูแลสุขภาพแบบองค์รวมมาอย่างยาวนาน ทั้งการใช้ในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ การยับยั้งและฆ่าเชื้อ การฟื้นฟูสภาพผิวหนัง ด้านการอักเสบ ต้านไวรัส การทำความสะอาดแผล การกระตุ้นหรือช่วยผ่อนคลาย และช่วยทำให้สดชื่นหรือทำให้สงบมีสมาธิ ซึ่งปัจจุบันมีวิธีการพิสูจน์สรรพคุณของน้ำมันหอมระเหยและสร้างความเชื่อมั่นตามหลักการแพทย์แผนปัจจุบันมากมาย ทำให้เกิดการยอมรับและใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยอย่างแพร่หลายในรูปแบบที่ต่างกัน เช่น ผลิตภัณฑ์สำหรับการนวด สูดดม หรือสปา ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและความงาม และใช้ในอุตสาหกรรมยา เป็นต้น (95)

จากหลายรายงานการศึกษาพบว่าพืชในสกุลเสม็ด (*Melaleuca* spp.) หลายชนิด เมื่อนำส่วนของใบ (leaves) กิ่งอ่อน (twigs) หรือกิ่งใหญ่ที่แตกจากลำต้น (branches) มากลั่นด้วยน้ำหรือไอน้ำจะให้ น้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยชนิดและปริมาณของสารพิษเคมีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และแหล่งที่ปลูก เช่น น้ำมันทีทรี (tea tree oil) จากสายพันธุ์ *M. alternifolia* ในประเทศออสเตรเลียมีองค์ประกอบหลักสำคัญคือ terpinen-4-ol และน้ำมัน niaouli จากสายพันธุ์ *M. quinquenervia* ในประเทศออสเตรเลีย มีองค์ประกอบหลักเป็น nerolidol และ 1,8-cineole ส่วนน้ำมันเสม็ด (cajuput oil) จากใบและกิ่งอ่อนของสายพันธุ์ *M. cajuputi* ที่พบและมีจำหน่ายในประเทศไทยมาเลเซีย จะมีองค์ประกอบหลักเป็น alpha-pinene, myrcene, limonene และ 1,8-cineole เป็นต้น (96) โดยพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชในสกุล *Melaleuca* spp. จะมีองค์ประกอบหลักสำคัญได้หลายชนิด เช่น alpha-pinene, myrcene, limonene, 1,8-cineole, cymene, terpinen-4-ol และ terpineol เป็นต้น และน้ำมันเสม็ดที่มีมูลค่าทางการตลาดสูงจะต้องประกอบด้วยสาร terpinen-4-ol อยู่ระหว่างร้อยละ 35-48 และ 1,8-cineole ไม่เกินร้อยละ 10 ตามมาตรฐานสากล International Organization for Standardization หรือ ISO 4730:2017 (97) อย่างไรก็ตาม น้ำมันเสม็ดที่มีปริมาณสารดังกล่าวน้อยหรือไม่มีเลย อาจประกอบด้วยสารพิษเคมีชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ต่างออกไปได้

นอกจากนี้ จากการศึกษา tea tree oil จากใบ กิ่งอ่อน และกิ่งใหญ่ที่แตกจากลำต้นของพืชสายพันธุ์ *M. alternifolia* ในประเทศไต้หวัน พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากส่วนของพืชที่แตกต่างกัน จะประกอบด้วยสารพิษเคมีชนิดเดียวกัน แต่ปริมาณผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จะแตกต่างกัน โดยใบพืชจะให้ผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือกิ่งอ่อน และกิ่งใหญ่ที่แตกจากลำต้นตามลำดับ อันเป็นผลมาจากใบพืชประกอบด้วยต่อมผลิตน้ำมันบนผิวใบจำนวนมาก จึงให้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด (98)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวที่เก็บจากพื้นที่ป่าพรุในจังหวัดนราธิวาส ประเทศไทย ด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าองค์ประกอบที่พบมากที่สุดคือ terpinolene (ร้อยละ 24.74) และรองลงมาคือ gamma-terpinene (ร้อยละ 22.84) ซึ่งอาจไม่ใช่สารที่มีมูลค่าสูงทางการตลาด เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวจะมีความผันแปรขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เจริญเติบโต (99) แต่องค์ประกอบหลายชนิดของน้ำมันเสม็ดที่สกัดได้ในการทดลองนี้ มีฤทธิ์ไล่หรือฆ่าแมลง เช่น มด ยุง ปลวก และเพลี้ยได้ดี และมีรายงานว่าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ดีด้วย นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทำลายไม้ร่วมกับกลุ่มสารป้องกันรักษาเนื้อไม้ พบว่าน้ำมันเสม็ดที่ได้ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราทำลายไม้ได้ดี (31, 32) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันเสม็ดขาวในประเทศอินเดีย พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดที่แยกได้ทางคลินิก ได้แก่ *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Aspergillus niger* (33) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันเสม็ดขาวจากสายพันธุ์ *M. cajuputi* Powell ในภาคตะวันออกของประเทศไทย เพื่อโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านและเพื่อให้การใช้ประโยชน์ป่าเสม็ดขาวเป็นไปอย่างคุ้มค่าและยั่งยืนต่อไป

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

รายการ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
เครื่องมือ		
1. ตู้ชีวนิรภัย ระดับ 2 (biological safety cabinet Class II) รุ่น LabGard® ES model NU-543E และรุ่น LabGard® ES model NU-440-400E	NuAire, Inc.	สหรัฐอเมริกา
2. ตู้บ่มเชื้อ/ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) รุ่น Memmert BM400	Memmert	เยอรมนี
3. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance) รุ่น PB602	METTLER TOLEDO	สหรัฐอเมริกา
4. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น METTLER AT200	METTLER TOLEDO	สหรัฐอเมริกา
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH	เยอรมนี
6. เครื่องให้ความร้อนตลอดทดลอง (heating block) รุ่น SHT 1D	Stuart Scientific	อังกฤษ
7. เครื่องเขย่าสารแบบสั่น (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie 2 model. G560E	Scientific Industries, Inc.	สหรัฐอเมริกา
8. เครื่องเขย่าสารแบบสั่น (vortex mixer) รุ่น IKA® MS1 Minishaker	IKA Works, Inc.	เยอรมนี
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 5424 R	Eppendorf AG	เยอรมนี
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก (mini centrifuge) รุ่น TT-6000 Mini-Centrifuge	Hercuvan Lab Systems	มาเลเซีย
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (NanoDrop Micro-UV/Vis Spectrophotometer) รุ่น NanoDrop One ^C	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา

รายการ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
12. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (thermal cycler) รุ่น Mastercycler® nexus	Eppendorf AG	เยอรมนี
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง (real-time PCR) รุ่น CFX96 Touch™	BIO-RAD Laboratories Inc	สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (DC power supply) รุ่น ENDURO™ 300V Power Supplies	Labnet International, Inc.	สหรัฐอเมริกา
15. ชุดรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis set) รุ่น ViPro Horizontal Unit APHU00	Vivantis Technologies	มาเลเซีย
16. ถังรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็ก (electrophoresis chamber) รุ่น MINI SUBTM DNA CELL	BIO-RAD Laboratories Inc	สหรัฐอเมริกา
17. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation) รุ่น Omega Fluor™ Plus	Gel Company, Inc.	สหรัฐอเมริกา
18. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น 913 pH Meter	Metrohm AG	สวิตเซอร์แลนด์
19. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) รุ่น R-220 และรุ่น R-219	SHARP	ญี่ปุ่น
20. ตู้เย็นไฟฟ้า (refrigerator) รุ่น R-Z190S	HITACHI	ญี่ปุ่น
21. ตู้เย็นไฟฟ้า รุ่น GR-B171Z	TOSHIBA	ญี่ปุ่น
22. ตู้เย็นแช่แข็งไฟฟ้า (freezer) รุ่น MF-U14E-W	mitsubishi electric	ญี่ปุ่น
23. ตู้ป่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker Incubator) รุ่น New Brunswick INNOVA 4300 Series	New Brunswick Scientific	สหรัฐ
24. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำความดันสูง (autoclave) รุ่น WiseClave® WAC-60	Daihan Scientific	เกาหลีใต้
25. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำความดันสูง รุ่น TOMY SS-325	Tomy Seiko	ญี่ปุ่น

รายการ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
อุปกรณ์		
1. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติชนิดปรับปริมาตร (autopipette) ขนาด 0.1-2, 0.5-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร	METTLER TOLEDO Rainin™	สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลาย (pipette aid) รุ่น S1 Pipette Filler	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
3. ปิเปตพลาสติกปราศจากเชื้อ (sterile-disposable serological pipette) ขนาด 10 และ 25 มิลลิลิตร	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
4. งานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก (plastic petri dish) ขนาด 90 x 15 มิลลิเมตร	Bibby Sterilin Ltd.	สหราชอาณาจักร
5. ไมโครไทเทอร์เพลท (96-well polystyrene round bottom microtiter plates)	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
6. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen Inc.	สหรัฐอเมริกา
7. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (PCR tube, flat cap) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร	KIRGEN Bioscience Inc.	สาธารณรัฐประชาชนจีน
8. ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip) ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร	METTLER TOLEDO	สหรัฐอเมริกา
9. พาราฟิล์มแบบม้วน (Parafilm) ขนาดกว้าง 4 นิ้ว ยาว 125 ฟุต	Parafilm® M	สหรัฐอเมริกา
10. หลอดทดลองฝาเกลียว (test tube screw cap) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร	Pyrex® Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
11. หลอดทดลอง ฝาร้อมฝาปิด (test tube) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร	Pyrex® Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. หลอดทดลอง ขนาด 12x75 มิลลิเมตร	Pyrex® Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
13. หลอดทดลองฝาเกลียว ก้นแบน (test tube screw cap, flat bottom) ขนาด 25x50 มิลลิเมตร	Pyrex® Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
14. กระดาษตาปลา สำหรับซุบสารปฏิชีวนะ (antibiotic assay discs) ขนาด 6 มิลลิเมตร	Whatman®	สหราชอาณาจักร

รายการ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
15. ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ ความยาว 6 นิ้ว (sterile cotton swab)	Qcare	ไทย
16. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร	DURAN® SCHOTT AG	เยอรมนี
17. ขวดแก้วฝาเกลียว (laboratory bottle screw cap) ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร	DURAN® SCHOTT AG	เยอรมนี
18. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร	Kartell S.p.A. -LABWARE	อิตาลี
อาหารเลี้ยงเชื้อ		
1. อาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA)	HiMedia Laboratories	อินเดีย
2. อาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB)	Difco™	สหรัฐอเมริกา
3. อาหาร Brilliance™ Candida agar (BCA)	Oxiods	สหรัฐอเมริกา
4. อาหาร RPMI 1640 Medium, Powder	Gibco®	แคลิฟอร์เนีย
5. อาหาร Mueller-Hinton agar (MHA)	Difco™	สหรัฐอเมริกา
ยาและสารเคมี		
1. ดิสก์ยาฟลูโคนาโซล (fluconazole discs) ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์	HiMedia Laboratories	อินเดีย
2. ยาฟลูโคนาโซลชนิดผง (fluconazole 98.0%)	TCI America™	สหรัฐอเมริกา
3. สารละลายกลีเซอรอล (glycerol) AnaLaR NORMAPUR® ACS	VWR International	สหรัฐอเมริกา
4. แบเรียมคลอไรด์ (barium chloride)	Univar Solutions	สหรัฐอเมริกา
5. กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)	Merck KGaA	เยอรมนี
6. Tris base (Trizma® base)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
7. Boric acid for electrophoresis	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
8. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
9. Lysis buffer Invitrogen™ PureLink™ (Tris-HCl, EDTA and SDS)	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา

รายการ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
10. TE buffer Invitrogen™ PureLink™ (Tris-EDTA buffer)	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
11. สารละลาย RNase A Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	Univar Solutions	สหรัฐอเมริกา
13. สารละลาย Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25:24:1) pH 8.0	Research Organics, Inc.	สหรัฐอเมริกา
14. สารละลายเอทานอล (ethanol) absolute for analysis	Merck KGaA	เยอรมนี
15. 5X FIREPol® Master Mix (FIREPol® DNA polymerase, 5x Reaction Buffer B, 12.5 mM MgCl ₂ , 1 mM dNTPs)	Solis BioDyne	สาธารณรัฐ เอลส์โตเนีย
16. อะกาโรส (LE Agarose for gel electrophoresis)	QP Products	สหรัฐอเมริกา
17. สีย้อมสารพันธุกรรม Safe-Green™ (6X loading dye)	Applied Biological Materials Inc.	แคนาดา
18. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)	Solis BioDyne	สาธารณรัฐ เอลส์โตเนีย
19. 3-Morpholinopropanesulfonic Acid (MOPS for buffer solutions)	AppliChem GmbH	เยอรมนี
20. D (+)-Glucose monohydrate	Merck KGaA	เยอรมนี
21. สารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck KGaA	เยอรมนี
22. Methylene blue for microscopy Certistain®	Merck KGaA	เยอรมนี
23. TRIsure™ reagent	Bioline USA Inc.	สหรัฐอเมริกา
24. คลอโรฟอร์ม (chloroform)	Merck KGaA	เยอรมนี
25. ไอโซโพรพานอล (isopropanol)	Merck KGaA	เยอรมนี
26. One-Step BrightGreen qRT-PCR kit - BrightGreen qPCR MasterMix-Low ROX (2X) - qRT-PCR Enzyme Mix (50X) - Nuclease-free H ₂ O	Applied Biological Materials Inc.	แคนาดา

3.2 เชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 แหล่งที่มาและการเก็บรักษาเชื้อทดสอบ

(1) เชื้อทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วยเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

(2) นำเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกและ *C. albicans* ATCC 90028 มาเพาะเลี้ยงลงบนจานอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(3) เตรียม working stock โดยถ่ายโอนเชื้อทดสอบจากข้อ 3.2.1 (2) เพาะเลี้ยงในหลอดอาหาร SDA slant แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเชื้อเจริญนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

(4) เตรียม permanent stock culture โดยถ่ายโอนเชื้อทดสอบจากข้อ 3.2.1 (2) เพาะเลี้ยงลงในหลอดอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปิเปตถ่ายเชื้อปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโคร-เซ็นทริฟิวก์ปราศจากเชื้อ เติมสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้อยู่ในรูปของเซลล์แขวนลอย นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา

(1) ถ่ายโอนเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 จาก working stock ลงบนจานอาหาร SDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) เชียเชื้อทดสอบจากจานอาหาร SDA ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของสารมาตรฐาน 0.5 McFarland จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(3) ตรวจสอบขนาดของกล้าเชื้อ (inoculum size) ด้วยวิธีการ drop plate โดยนำแขวนลอยกล้าเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว มาเจือจางแบบ ten-fold dilution ให้ได้ระดับการเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-4} ทำการตรวจสอบปริมาณเซลล์ของกล้าเชื้อจากระดับความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-4} โดยปิเปตแขวนลอยกล้าเชื้อจากแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยอดลงบนจานอาหาร SDA (ทำซ้ำระดับความเจือจางละ 3 ครั้ง) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารและคำนวณปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (ภาคผนวก ง)

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมน้ำมันเมล็ดชาโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation)

(1) การเก็บตัวอย่างพืช (harvesting) โดยลงพื้นที่เก็บเมล็ดชา เฉพาะส่วนใบ (leaves) และกิ่งอ่อน (twigs) ในพื้นที่ป่าชุมชน ตำบลท่าช้าง อำเภอเมืองจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี (พื้นที่บริจาค ให้มูลนิธิชัยพัฒนา) โดยได้รับความอนุเคราะห์การขออนุญาตเก็บตัวอย่างพืชการนำทางเข้าพื้นที่ และการเก็บตัวอย่างพืช จากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี

(2) การตรวจสอบเอกลักษณ์และยืนยันชนิดของพืช (identification) โดยตรวจสอบเอกลักษณ์และยืนยันชนิดของตัวอย่างเมล็ดชาที่เก็บได้ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ โดยได้รับความอนุเคราะห์ตรวจสอบเอกลักษณ์และยืนยันชนิดของพืช จากโครงการพัฒนาป่าไม้ ศูนย์รักษาการพัฒนาวัวคิ่งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี กรมป่าไม้

(3) การกลั่นน้ำมันหอมระเหย (distillation) โดยนำใบและกิ่งอ่อนของต้นเมล็ดชาที่เก็บได้มาผึ่งในที่ร่มข้ามคืน และชั่งบันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวใส่ลงในหม้อกลั่น แล้วเติมน้ำให้ท่วมตัวอย่าง แต่ไม่เกิน 3 ใน 4 ของความจุหม้อกลั่น ปิดฝาหม้อกลั่นให้แน่นสนิท ต่อท่อระบบน้ำหล่อเย็นในส่วนท่อควบแน่น และต้มน้ำในหม้อกลั่น โดยใช้แก๊สให้ความร้อนปานกลาง อุณหภูมิประมาณ 65-70 องศาเซลเซียส แล้วเปิดสวิตช์ควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น น้ำมันหอมระเหยจากพืชจะระเหยไปพร้อมกับไอน้ำ แล้วกลั่นตัวพร้อมกับหยดน้ำลงในภาชนะรองรับ เกิดการแยกชั้น จนสามารถแยกน้ำมันออกมาได้ สังเกตปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่เพิ่มขึ้นในภาชนะรองรับอย่างสม่ำเสมอ ทำการกลั่นเป็นเวลา 2-3 วัน หรือจนกว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่เพิ่มขึ้น และปิดเครื่องกลั่น (95) โดยได้รับความอนุเคราะห์เครื่องกลั่นขนาดใหญ่ระดับชุมชน และการควบคุมการกลั่นจากคุณค้ำรณ เลียดประถม นักวิชาการป่าไม้ชำนาญการ หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนากาป่าไม้ สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ กรมป่าไม้

(4) การคำนวณหาร้อยละของผลผลิตที่ได้ (% yield) โดยบันทึกน้ำหนักน้ำมันเมล็ดชาที่ได้ และคำนวณหาปริมาณของน้ำมันเมล็ดชา ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของพืชตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

(5) การเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหย (storage) โดยเก็บรักษาน้ำมันเมล็ดชาไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี (chemical composition) ของน้ำมัน เสมีตขาวโดยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเสมีตขาวด้วยเครื่อง HP-5989 MS Engine (HewlettPackard) ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หลักการทำงานของเครื่องประกอบด้วย 2 ส่วน คือ 1) ส่วนของเครื่อง GC ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้เมื่อถูกความร้อน อาศัยหลักของความสามารถในการละลายที่แตกต่างกันขององค์ประกอบในตัวอย่างที่มีต่อเฟสนิ่ง (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และ 2) ส่วนของเครื่อง MS ทำหน้าที่เป็น detector ในการตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง อาศัยกลไกคือ โมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่างโดยเครื่อง GC จะถูกไอออไนซ์ในสถานะสุญญากาศ แล้วตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวลเทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิง (library) จากนั้นแปลผลออกมาเป็นโครมาโตแกรมและชื่อขององค์ประกอบ โดยมี การตั้งค่าการทำงานและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำมันเสมีตขาว ดังนี้

(1) ชนิด Capillary Column คือ HP-5MS (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร พิล์มหนา 0.25 ไมโครเมตร) เฟสนิ่ง คือ (5%-phenyl)-methylpolysiloxane และเฟสเคลื่อนที่ คือ ก๊าซฮีเลียม อัตราการไหล 1 มิลลิเมตรต่อนาที และมีอัตราส่วนปริมาตรสารตัวอย่างที่ระบายออกต่อปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าคอลัมน์ (split ratio) เท่ากับ 40:1

(2) อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของเครื่องตรวจวัดสัญญาณ เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของ Column เริ่มต้นจาก 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มขึ้นในอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 200 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 280 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที

(3) วิธีการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน (mass ionization) ชนิด Electron Impact (EI) ที่ปล่อยอิเล็กตรอนออกมาด้วยพลังงานที่คงที่ประมาณ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ (eV) และมีช่วงมวลในการวิเคราะห์ข้อมูล (mass range) คือ 30-500 หน่วยมวลอะตอม (atomic mass unit, amu)

3.3.3 การตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยเทคนิคทาง จุลชีววิทยาและอณูชีววิทยา

(1) ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic morphology) ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 ได้แก่ รูปร่าง ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ การแตกหน่อ (budding) และการสร้างสายราเทียม (pseudohyphae)

(2) ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic morphology) ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 บนอาหาร SDA และอาหาร *Candida* Chromogenic agar ได้แก่ ลักษณะและสีโคโลนี

(3) ตรวจสอบยีนย่นชนิดของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

(3.1) สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อทดสอบ โดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform) ตามรายงานการศึกษาของ Moore D. และ Dowhan D. (100)

(ก) เตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ โดยถ่ายโอนเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 จาก working stock ลงในขวดอาหาร SDB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที

(ข) ปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อจากขวดอาหาร SDB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้งและเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์ (pellet)

(ค) แขนวลอยตะกอนเซลล์ในสารละลาย lysis buffer (Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 8.0, EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ SDS ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารแบบปั่น (vortex mixer) เป็นเวลา 15 วินาที

(ง) ทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิคแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) โดยนำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำออกมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

(จ) เติมสารละลาย RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(ฉ) เติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 30 ครั้ง และนำไปปั่นตกตะกอนแยกเศษเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบนที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์หลอดใหม่

(ข) เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24: 1) ค่าพีเอช 8.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 50 ครั้ง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนแยกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบนที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ปริมาตรประมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์หลอดใหม่

(ช) ตกตะกอนดีเอ็นเอในส่วนใสที่แยกได้ โดยเติมเอทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบนทิ้งและเก็บเฉพาะส่วนตะกอนดีเอ็นเอ

(ค) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนตะกอน และเปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อระเหยเอทานอลออก

(ค) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปิเปตสารละลายขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

(ง) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (NanoDrop) (ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร (260: 280 nm ratio) ซึ่งดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260: 280 เท่ากับ 1.8-2.0

(3.2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(ก) เตรียมไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *26S rRNA* ของ *C. albicans* ตามรายงานของ Mannarelli BM. และคณะ (101) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ผลิตภัณฑ์ PCR	GenBank accession no.
26S	Forward	5'-TGTTGCTCTCTCGGGGCGGCCG-3'	175 bp	U45776
<i>rRNA</i>	Reverse	5'-AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTA-3'		

(ข) เตรียมสารละลาย PCR master mix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

PCR master mix	ปริมาตร	ความเข้มข้น
- 5X FIREPol® Master Mix	4 ไมโครลิตร	1X
- Forward Primer (10 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
- Reverse Primer (10 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
- DNA template (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร	-
- น้ำกลั่นปราศจาก DNase	13 ไมโครลิตร	-

(ค) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycler) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
- Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ
- Denaturation	95 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
- Annealing	67 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
- Extension	72 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
- Final Extension	72 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ

(3.3) วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

(ก) เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงอะกาโรส จำนวน 2 กรัม ผสมกับสารละลาย 0.5x TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนได้สารละลายใส และตั้งไว้ให้อุณหภูมิตกลงอยู่ที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส

(ข) เทอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ลงใน casting plate ที่วาง comb ไว้แล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้แผ่นเจลแข็งตัวและค่อย ๆ ดึง comb ออก จะได้หลุมสำหรับหยดสารทดสอบ

(ค) นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ไปวางใน electrophoresis tank และเติมสารละลาย 0.5x TBE buffer ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจล

(ง) ผสมสีย้อม Safe-Green™ กับผลผลิต PCR ในอัตราส่วน 5:1 แล้วหยดลงในหลุมและหยด 100 bp DNA ladder เพื่อเป็น marker มาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิต PCR

(จ) ต่อขั้วไฟฟ้าและทำการแยกดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 90 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 70 นาที หรือจนกระทั่งสีย้อมเคลื่อนที่ลงมาบริเวณปลายแผ่นอะกาโรสเจล ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่อง

(ฉ) นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ได้ไปตรวจดูผลิตภัณฑ์ PCR ภายใต้แสงสีฟ้า (Blue Light) และถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)

(3.4) คัดเลือกเฉพาะเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.4 การศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยวิธี Broth microdilution ตามมาตรฐานของ CLSI 2017 (อ้างอิงจากเอกสาร CLSI M60, M27-A3 และ M27-S4)

(1) เตรียมกล้าเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 (ตามวิธีในข้อ 3.2.2) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:50 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) และเจือจางอีกครั้งในอัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(2) เตรียมยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้นเริ่มต้น 12,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นเป็น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(3) ทดสอบหาค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซล (15, 102, 103)

(3.1) ปิเปตยาฟลูโคนาโซลในแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 3.3.4 (2)) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) (ข้อ 3.3.4 (1)) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $0.5-2.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมียาฟลูโคนาโซลความเข้มข้นตั้งแต่ 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(3.2) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(3.3) อ่านผลค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟลูโคนาโซลที่สามารถยับยั้งทดสอบได้ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และแปลผลตามเกณฑ์ที่ CLSI (2017) กำหนด คือ $MIC_{FLC} \leq 2$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดเป็นเชื้อที่ไวต่อยา, $MIC_{FLC} = 4$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดเป็นเชื้อที่ไวต่อยาลดลง และ $MIC_{FLC} \geq 8$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

(4) การควบคุมคุณภาพของการทดสอบหาค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซล

(4.1) ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system) คือ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลต่อสายพันธุ์ มาตรฐานต้องอยู่ในเกณฑ์ตามที่ CLSI (2017) กำหนด คือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(4.2) ชุดควบคุมการเจริญ (growth control) คือชุดกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

(4.3) ชุดควบคุมสารละลาย (solvent control) คือชุดกล้าเชื้อทดสอบที่เจือจางใน อาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปริมาตร 990 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

(4.4) ชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ (sterility control) คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

(5) คัดเลือกเฉพาะเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.5 การตรวจหายีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์ คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(1) สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อทดสอบ โดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 (3.1)

(2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(2.1) เตรียมไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล ตามรายงานของ Ricardo E. และคณะ (17) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ผลิตภัณฑ์ PCR	GenBank accession no.
<i>CDR1</i>	Forward	5'-TGCCAAACAATCCAACAA-3'	112 bp	X77589
	Reverse	5'-CGACGGATCACCTTTCATACGA-3'		
<i>CDR2</i>	Forward	5'-AAGGTTTTGATGCTACTGC-3'	125 bp	U63812
	Reverse	5'-GTCGGACATGTGGCTCAA-3'		
<i>MDR1</i>	Forward	5'-GTGTTGGCCATTGGTTTTTCAGTC-3'	114 bp	X53823
	Reverse	5'-CCAAAGCAGTGGGGATTTGTAG-3'		
<i>ERG11</i>	Forward	5'-GGTGGTCAACATACTTCTGCTTC-3'	137 bp	X13296
	Reverse	5'-GTCAAATCATTCAAATCACCCACCT-3'		

(2.2) เตรียมสารละลาย PCR master mix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

PCR master mix	ปริมาตร	ความเข้มข้น
- 5X FIREPol® Master Mix	4 ไมโครลิตร	1X
- Forward Primer (10 ไมโครโมลาร์)		
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> และ <i>ERG11</i>	1 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
สำหรับยีน <i>MDR1</i>	1.4 ไมโครลิตร	0.7 ไมโครโมลาร์
- Reverse Primer (10 ไมโครโมลาร์)		
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> และ <i>ERG11</i>	1 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
สำหรับยีน <i>MDR1</i>	1.4 ไมโครลิตร	0.7 ไมโครโมลาร์
- DNA template (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร	-
- น้ำกลั่นปราศจาก DNase		
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> และ <i>ERG11</i>	13 ไมโครลิตร	-
สำหรับยีน <i>MDR1</i>	12.2 ไมโครลิตร	-

(2.3) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycler) โดยมีสภาวะการทำงานปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
- Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ
- Denaturation	95 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
- Annealing			
สำหรับยีน <i>CDR1</i> และ <i>MDR1</i>	58 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
สำหรับยีน <i>CDR2</i>	55 องศาเซลเซียส		
สำหรับยีน <i>ERG11</i>	60 องศาเซลเซียส		
- Extension	72 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
- Final Extension	72 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ

(3) วิเคราะห์ผลผลิตผล PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ข้อ 3.3.3 (3.3)

(4) คัดเลือกตัวแทนของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนดื้อยาแตกต่างกัน กลุ่มละ 1-2 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันเมล็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล

3.3.6.1 ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Disk diffusion ตามมาตรฐานของ CLSI 2017 (อ้างอิงจากเอกสาร CLSI M60, M44-A2 และ M44-S3)

(1) เตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 (ตามวิธีในข้อ 3.2.2) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(2) เตรียมดิสก์บรรจุน้ำมันเมล็ดขาว โดยเตรียมน้ำมันเมล็ดขาวความเข้มข้น 200 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:4 ให้มีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำมันเมล็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นดิสก์ขนาด 6 มิลลิเมตร จะได้ดิสก์บรรจุน้ำมันเมล็ดขาวขนาด 4 และ 1 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ตามลำดับ

(3) เตรียมดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO โดยปิเปตสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นดิสก์ขนาด 6 มิลลิเมตร

(4) ทดสอบความไวของน้ำมันเมล็ดขาวต่อเชื้อทดสอบ (15, 104, 105)

(4.1) ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดกล้าเชื้อ บิดพอหมาด และนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (w/2% Glucose + Methylene blue) (MH-GMB) เป็นแนว 3 ระบาย

(4.2) ปล่อยให้แห้งประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ไม่เกิน 15 นาที)

(4.3) วางแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้ และดิสก์ยาฟลูโคนาโซล บนผิวหน้าอาหาร MH-GMB ที่ป้ายเชื้อทดสอบ

(4.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(4.5) อ่านผลโดยการตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

(5) การควบคุมคุณภาพของการทดสอบความไวของน้ำมันเมล็ดชา

(5.1) ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system)

คือ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซล (ขนาด 10 ไมโครกรัม) ต่อสายพันธุ์มาตรฐานต้องอยู่ในเกณฑ์ตามที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 27-38 มิลลิเมตร จึงจะอ่านผลการทดสอบความไวของน้ำมันเมล็ดชาได้

(5.2) ชุดควบคุมผลบวก (positive control) สำหรับการทดสอบใช้ดิสก์ยาฟลูโคนาโซล ขนาด 10 ไมโครกรัม

(5.3) ชุดควบคุมผลลบ (negative control) สำหรับการทดสอบใช้ดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO ขนาด 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์

3.3.6.2 ศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (minimum fungicidal concentration, MFC) ของน้ำมันเมล็ดชาต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ต่อต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Broth macrodilution ตามมาตรฐานของ CLSI 2017 (อ้างอิงจากเอกสาร CLSI M60, M27-A3 และ M27-S4)

(1) เตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ต่อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 (ตามวิธีในข้อ 3.2.2) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเจือจางอีกครั้งในอัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $0.5-2.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(2) เตรียมน้ำมันเมล็ดชาความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.91 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(3) เตรียมยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้นเริ่มต้น 12,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:2 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นเป็น 6,400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6,400, 3,200, 1,600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(4) ทดสอบหาค่า MIC ของน้ำมันเมล็ดขาว (15, 102, 103)

(4.1) ปิเปิดน้ำมันเมล็ดขาวในแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 3.3.6.2 (2)) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) (ข้อ 3.3.6.2 (1)) ปริมาตร 990 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันความเข้มข้นตั้งแต่ 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(4.2) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(4.3) อ่านผลค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันเมล็ดขาวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

(5) ทดสอบหาค่า MFC ของน้ำมันเมล็ดขาว (15, 102, 103)

(5.1) ปิเปิดสารละลายในหลอดทดสอบที่ระดับค่า MIC เป็นต้นไปที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ (ข้อ 3.3.6.2 (4)) หยดลงผิวหน้าอาหาร SDA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

(5.2) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(5.3) อ่านผลค่า MFC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันเมล็ดขาวที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ซึ่งจะไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบบนผิวหน้าอาหาร SDA (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

(6) ทดสอบหาค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซล

(6.1) ปิเปิดยาฟลูโคนาโซลในแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 3.3.6.2 (3)) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) (ข้อ 3.3.6.2 (1)) ปริมาตร 990 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นตั้งแต่ 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(6.2) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(6.3) อ่านผลค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟลูโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

(7) การควบคุมคุณภาพของการทดสอบหาค่า MIC และค่า MBC

(7.1) ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system)

คือ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลต่อสายพันธุ์มาตรฐานต้องอยู่ในเกณฑ์ตามที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(7.2) ชุดควบคุมการเจริญ (growth control) คือชุดกล้ำเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

(7.3) ชุดควบคุมสารละลาย (solvent control) คือชุดกล้ำเชื้อทดสอบที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปริมาตร 990 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

(7.4) ชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ (sterility control) คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

(7.5) ชุดควบคุมสารทดสอบ (compound control) คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อที่มีน้ำมันเมล็ดขาวความเข้มข้นตั้งแต่ 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Checkerboard microdilution

(1) เตรียมกล้ำเชื้อสำหรับทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนดื้อยาแตกต่างกัน จำนวน 5 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 (ตามวิธีในข้อ 3.2.2) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:50 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) และเจือจางอีกครั้งในอัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(2) เตรียมยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้นเริ่มต้น 12,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:50 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นเป็น 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(3) เตรียมน้ำมันเมล็ดข้าวความเข้มข้นเริ่มต้น 500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นเป็น 5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution ด้วยอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 และ 0.16 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(4) ทดสอบหาค่า MIC ของน้ำมันเมล็ดข้าวร่วมกับยาฟลูโคนาโซล (106)

(4.1) ปิเปตยาฟลูโคนาโซลในแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 3.3.7 (2)) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร น้ำมันเมล็ดข้าวในแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 3.3.7 (3)) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) (ข้อ 3.3.7 (1)) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $0.5-2.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีสารผสมระหว่างยากับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

		DRUG A Fluconazole (ug/mL)										
		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.13	0
DRUG B Cajuput oil (u/mL)	1.25											
	0.63											
	0.31											
	0.16											
	0.08											
	0.04											
	0											

(4.2) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(4.3) อ่านผลค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดข้าวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

(5) ประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดข้าวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล ด้วยดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (fractional inhibitory concentration index, FICI) ตามสูตรดังนี้

$$\text{ค่า FICI} = \text{FIC(A)} + \text{FIC(B)}$$

$$= [A]/\text{MIC(A)} + [B]/\text{MIC(B)}$$

โดย [A] คือ ค่า MIC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MIC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MIC(A) คือ ค่า MIC ของสาร A และ MIC(B) คือ ค่า MIC ของสาร B

(6) แปลผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดชาในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลจากค่าดัชนีชี้วัด FICI ดังนี้ (107)

$FICI \leq 0.5$	= เสริมฤทธิ์กัน (synergistic)
$0.5 < FICI \leq 1.0$	= มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กัน (additive)
$1.0 < FICI \leq 4.0$	= ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifferent)
$FICI > 4.0$	= ฤทธิ์ต้านกัน (antagonistic)

(7) การควบคุมคุณภาพของการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดชาในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล

(7.1) ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system) คือ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลต่อสายพันธุ์มาตรฐานต้องอยู่ในเกณฑ์ตามที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(7.2) ชุดควบคุมการเจริญ (growth control) คือชุดกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

(7.3) ชุดควบคุมสารละลาย (solvent control) คือชุดกล้าเชื้อที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปริมาตร 990 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

(7.4) ชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ (sterility control) คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

(7.5) ชุดควบคุมสารทดสอบ (compound control) คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อที่มีน้ำมันเมล็ดชาความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.8 การศึกษาผลกระทบของน้ำมันเมล็ดชาต่อการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ย้อนกลับ (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)

(1) สกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อทดสอบ ด้วยวิธี TRIsure reagent (108)

(1.1) เตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ โดยถ่ายโอนเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนดื้อยาแตกต่างกัน จำนวน 5 ไอโซเลท และ

C. albicans ATCC 90028 จาก working stock ลงในขวดอาหาร SDB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่า 240 รอบต่อนาที แล้วทำการทดสอบด้วยน้ำมันเสม็ดขาว โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเสม็ดขาว (untreated) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับน้ำมันเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC และ $\frac{1}{8}$ MIC (treated) เป็นเวลา 90 นาที

(1.2) ปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อจากขวดอาหารทดสอบ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสทิ้งและเก็บเฉพาะส่วนตะกอนเซลล์

(1.3) ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย TRisure reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปิเปตสารละลายขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง และทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิคแช่แข็งและละลาย โดยนำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำออกมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

(1.4) เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนแยกโปรตีนและเศษเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปิเปตเก็บเฉพาะส่วนใสด้านบนที่ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์หลอดใหม่

(1.5) ตกตะกอนอาร์เอ็นเอในส่วนใสที่แยกได้ โดยเติมไอโซพรพานอล อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบนทิ้ง และเก็บเฉพาะส่วนตะกอนอาร์เอ็นเอ

(1.6) ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยเติมเอทานอล ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนตะกอนอาร์เอ็นเอ และเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อระเหยเอทานอลออก

(1.7) ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นปราศจาก RNase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปิเปตสารละลายขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

(1.8) ตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร (260 : 280 nm ratio) ซึ่งอาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนอยู่ที่ 2.0

(2) สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (complementary DNA, cDNA) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบเรียลไทม์ย้อนกลับ (OneStep qRT-PCR)

(2.1) เตรียมไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล และยีน *ACT1* ที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ (housekeeping gene) ซึ่งใช้เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ตามรายงานของ Ricardo E. และคณะ (17) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ผลผลิต PCR	GenBank accession no.
<i>CDR1</i>	Forward	5'-TGCCAAACAATCCAACAA-3'	112 bp	X77589
	Reverse	5'-CGACGGATCACCTTTCATACGA-3'		
<i>CDR2</i>	Forward	5'-AAGGTTTTGATGCTACTGC-3'	125 bp	U63812
	Reverse	5'-GTCGGACATGTGGCTCAAA-3'		
<i>MDR1</i>	Forward	5'-GTGTTGGCCATTGGTTTTAGTC-3'	114 bp	X53823
	Reverse	5'-CCAAAGCAGTGGGGATTGTAG-3'		
<i>ERG11</i>	Forward	5'-GGTGGTCAACATACTTCTGCTTC-3'	137 bp	X13296
	Reverse	5'-GTCAAATCATTCAAATCACACCT-3'		
<i>ACT1</i>	Forward	5'-AAGAATTGATTTGGCTGGTAGAGA-3'	179 bp	X16377
	Reverse	5'-TGGCAGAAGATTGAGAAGAAGTTT-3'		

(2.2) เตรียมสารละลาย qRT-PCR master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดังนี้

PCR master mix	ปริมาตร	ความเข้มข้น
- BrightGreen qPCR MasterMix-Low ROX (2X)	5 ไมโครลิตร	1X
- qRT-PCR Enzyme Mix (50X)	0.2 ไมโครลิตร	1X
- Forward Primer (10 ไมโครโมลาร์)		
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>ERG11</i> และ <i>ACT1</i>	0.5 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
สำหรับยีน <i>MDR1</i>	0.7 ไมโครลิตร	0.7 ไมโครโมลาร์

PCR master mix	ปริมาตร	ความเข้มข้น
- Reverse Primer (10 ไมโครโมลาร์)		
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>ERG11</i> และ <i>ACT1</i>	0.5 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
สำหรับยีน <i>MDR1</i>	0.7 ไมโครลิตร	0.7 ไมโครโมลาร์
- Total RNA (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร	-
- น้ำกลั่นปราศจาก Nuclease		
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>ERG11</i> และ <i>ACT1</i>	2.8 ไมโครลิตร	-
สำหรับยีน <i>MDR1</i>	2.4 ไมโครลิตร	-

(2.3) สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (real-time PCR) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังนี้ (109)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
- cDNA Synthesis	42 องศาเซลเซียส	15 นาที	1 รอบ
- Pre-Denaturation	95 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ
- Denaturation	95 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
- Annealing/Elongation			
สำหรับยีน <i>CDR1</i> , <i>MDR1</i> และ <i>ACT1</i>	58 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
สำหรับยีน <i>CDR2</i>	55 องศาเซลเซียส		
สำหรับยีน <i>ERG11</i>	60 องศาเซลเซียส		
- Melting Curve	65-95 องศาเซลเซียส	Increment 0.5 องศาเซลเซียส/วินาที	

(3) วิเคราะห์ผลเชิงปริมาณสัมพัทธ์ (relative quantification) เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (110) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างยีนเป้าหมาย (target gene) และยีนอ้างอิง (reference gene) และแสดงผลเป็นสัดส่วนความเปลี่ยนแปลง (fold change) ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดขาว (calibrator) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับน้ำมันเมล็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC และ $\frac{1}{8}$ MIC เป็นเวลา 90 นาที ตามสูตรดังนี้

$$\text{Relative Quantification} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

โดย $\Delta\Delta Ct$ คือ $\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ calibrator}$
 ΔCt คือ $Ct \text{ target} - Ct \text{ reference}$

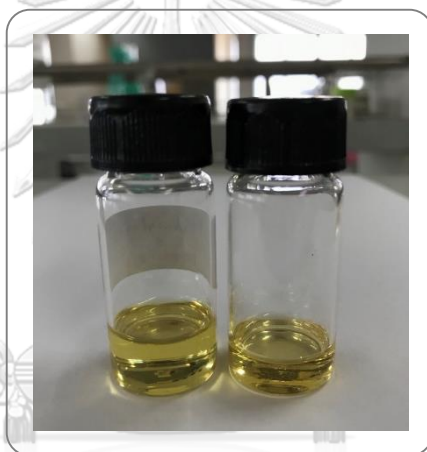
(4) วิเคราะห์ melting curve เพื่อยืนยันผลผลิต PCR (ทำการทดลอง 2 ครั้ง)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการเตรียมน้ำมันเมล็ดข้าวโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

เมื่อนำใบ (leaves) และกิ่งอ่อน (twigs) ของต้นเสม็ดขาว น้ำหนัก 6,050.00 กรัม มาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้เครื่องกลั่นขนาดใหญ่ระดับชุมชน พบว่าได้น้ำมันเสม็ดขาวหนักประมาณ 21.26 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน ปราศจากตะกอนและสารแขวนลอย และมีกลิ่นเฉพาะตัวของใบเสม็ดขาว ดังภาพที่ 18 และได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 0.35 โดยมวล (%W/W) ดังตารางที่ 4



ภาพที่ 18 ลักษณะน้ำมันเมล็ดข้าวที่สกัดได้

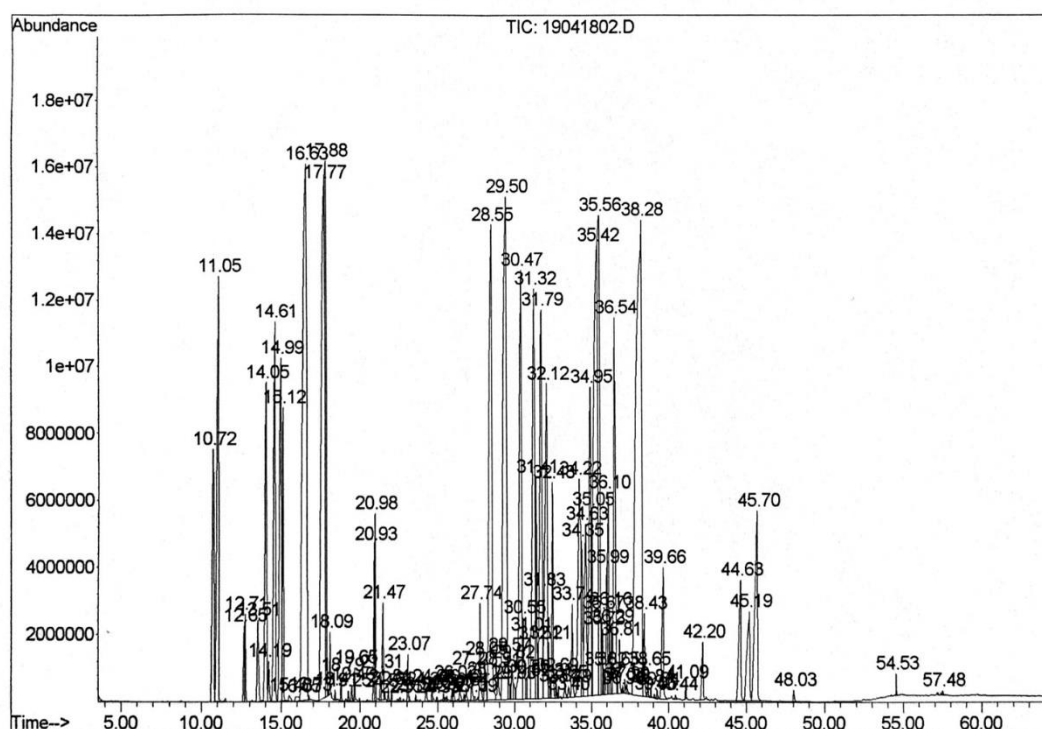
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำมันเมล็ดข้าวที่สกัดได้

ส่วนของพืช	น้ำหนักพืช (กรัม)	ชนิดของ ตัวทำละลาย	น้ำหนักน้ำมัน ที่ได้ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (%W/W)	หมายเหตุ
ใบและ กิ่งอ่อน	6,050.00	น้ำ DW	21.26	0.35	ของเหลวใส สีเหลืองอ่อน ปราศจากตะกอน และสาร แขวนลอย มีกลิ่นเฉพาะตัว

4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเสม็ดขาว โดยเทคนิค GC-MS

เมื่อนำตัวอย่างน้ำมันเสม็ดขาวมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี โดยเทคนิค GC-MS พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีองค์ประกอบทางเคมี จำนวน 99 ชนิด (ตารางที่ 7) ซึ่งแสดงโดย GC fingerprint ดังภาพ ที่ 19 เมื่อพิจารณาร้อยละพื้นที่ใต้พีค (peak area) พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีองค์ประกอบหลัก 6 ชนิด ได้แก่ 1) 1,8-Naphthyridine, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,2,4a,7,7-pentamethyl-, 8-oxide 2) alpha-Pyrone 3) Terpinolene 4) gamma-Terpinene 5) trans-Caryophyllene และ 6) beta-Elemene โดยมีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 10.46, 10.11, 9.26, 8.00, 6.36 และ 5.09 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี 15 ชนิด ของน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell กับน้ำมันที่สกัดได้จากใบของ *M. alternifolia* ตามมาตรฐานสากล International Organization for Standardization หรือ ISO 4730:2017 พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้มีองค์ประกอบทางเคมี จำนวน 8 ชนิด เป็นไปตามมาตรฐานสากล ได้แก่ 1) Terpinolene 2) alpha-Pinene 3) Sabinene 4) Aromadendrene 5) delta-Cadinene 6) Limonene 7) Globulol และ 8) Viridiflorol และจำนวน 7 ชนิด ไม่เป็นไปตามมาตรฐานสากล ได้แก่ 1) Terpinen-4-ol 2) gamma-Terpinene 3) alpha-Terpinene 4) 1,8-Cineole 5) p-Cymene 6) alpha-Terpineol และ 7) Ledene ดังตารางที่ 6



ภาพที่ 19 GC fingerprint ของน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้

ตารางที่ 5 องค์ประกอบหลักทางเคมีในน้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้

No	Retention Time (min)	Peak Area (%)	Possible Compounds	CAS number
1	35.05, 35.42, 35.56	10.46	1,8-Naphthyridine, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,2,4a,7,7-pentamethyl-, 8-oxide	069340-71-2
2	38.28	10.11	alpha-Pyrone	065077-06-7
3	17.76, 17.87	9.26	Terpinolene	000586-62-9
4	16.63, 16.73	8.00	gamma-Terpinene	000099-85-4
5	29.51	6.36	trans-Caryophyllene	000087-44-5
6	28.55	5.09	beta-Elemene	000515-13-9

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้จากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell กับน้ำมันทีทรีที่สกัดได้จากใบของ *M. alternifolia* ตามมาตรฐานสากล (International Organization for Standardization, ISO 4730:2017)

Compounds	ISO 4730:2017 standard (น้ำมันทีทรีที่สกัดได้จากใบของ <i>M. alternifolia</i> ^a)		น้ำมันเมล็ดชาที่สกัดได้ จากใบและกิ่งอ่อนของ <i>M. cajuputi</i> Powell
	Minimum (%)	Maximum (%)	
Terpinen-4-ol	35.00	48.00	1.04
gamma-Terpinene	14.00	28.00	8.00
alpha-Terpinene	6.00	12.00	2.30
1,8-Cineole	<0.01	10.00	ND
p-Cymene	0.50	8.00	0.10
Terpinolene	1.50	5.00	9.26
alpha-Terpineol	2.00	5.00	0.34
alpha-Pinene	1.00	4.00	2.71
Sabinene	<0.01	3.50	0.26
Aromadendrene	0.20	3.00	0.57
Ledene	0.10	3.00	ND
delta-Cadinene	0.20	3.00	0.84
Limonene	0.50	1.50	1.08
Globulol	<0.01	1.00	0.68
Viridiflorol	<0.01	1.00	1.37

หมายเหตุ: ^a หมายถึง น้ำมันทีทรีที่สกัดได้จากใบ (leaves) และกิ่งขนาดเล็ก (branchlets) ของทีทรี *M. alternifolia* โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของน้ำมันเมล็ดข้าวที่สกัดได้

Peak No.	Retention Time (min)	Peak Area (%)	Possible Compounds	CAS number	Quality of Identification
1	10.72	1.69	Norsabinane	058037-87-9	94
2	11.05	2.71	alpha-Pinene	000080-56-8	96
3	12.66	0.26	Sabinene	003387-41-5	97
4	12.71	0.25	beta-Pinene	018172-67-3	97
5	13.51	0.42	Myrcene	000123-35-3	96
6	14.05	1.85	alpha-Phellandrene	000099-83-2	94
7	14.19	0.15	3-Carene	013466-78-9	96
8	14.61	2.27	alpha-Terpinene	000099-86-5	98
9	14.99	2.44	o-Cymene	000527-84-4	95
10	15.12	1.08	Limonene	000138-86-3	91
11	15.48	0.04	alpha-Ocimene	006874-10-8	96
12	16.05	0.06	beta-Ocimene	003779-61-1	96
13	16.63	7.98	gamma-Terpinene	000099-85-4	97
14	16.73	0.01	gamma-Terpinene	000099-85-4	96
15	17.76	6.35	Terpinolene	000586-62-9	98
16	17.87	2.91	Terpinolene	000586-62-9	98
17	18.09	0.15	Linalool	000078-70-6	97
18	18.41	0.02	1,3,8-p Menthatriene	021195-59-5	91
19	18.78	0.06	2-Cyclohexene-1-ol	029803-81-4	95
20	19.25	0.03	Mentha-1,4,8-triene	000000-00-0	83
21	19.46	0.05	1-Terpineol	000586-82-3	98
22	19.65	0.07	1-Methoxy-1,3-cyclohexadiene	002161-90-2	78
23	20.93	0.51	Terpinen-4-ol	000562-74-3	96
24	20.98	0.53	Terpinen-4-ol	000562-74-3	98
25	21.31	0.10	p-Cymene	001197-01-9	90
26	21.47	0.34	alpha-Terpineol	010482-56-1	91
27	21.57	0.02	cis-Piperitol	016721-38-3	81
28	21.81	0.04	alpha-Terpinene	000099-86-5	98
29	22.01	0.03	2-Cyclohexen-1-ol, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-, cis-	016721-38-3	86
30	22.56	0.02	tert-Butylbenzene	000098-06-6	49
31	23.07	0.14	2-Isopropyl-4-methoxypyrimidine	064958-53-8	83
32	23.15	0.02	Citral	000106-26-3	93

Peak No.	Retention Time (min)	Peak Area (%)	Possible Compounds	CAS number	Quality of Identification
33	23.56	0.02	3-Methylene-2,6-heptanedione	000000-00-0	22
34	24.26	0.05	6,6-Dimethylhepta-2,4-diene	000000-00-0	43
35	24.62	0.04	1-Methylbicyclo (4.1.0) heptane	002439-79-4	49
36	24.94	0.02	3,3,5,5-Tetramethylcyclopentene	038667-10-6	45
37	25.37	0.02	Cyclohexanol, 2-methylene-, (S)-	061187-70-0	58
38	25.58	0.01	2,3,4-Trimethylthiophene	001795-04-6	38
39	25.90	0.03	2-Acetylthiophene	000088-15-3	46
40	26.02	0.06	2,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl-, methyl ester	002349-14-6	76
41	26.42	0.06	Bicycloelemene	000000-00-0	98
42	26.70	0.02	3-(p-Anisoylhydrazono)-N-(2-ethylphenyl) butyramide	000000-00-0	43
43	26.84	0.04	alpha-Cubebene	017699-14-8	99
44	27.20	0.13	Eugenol	000097-53-0	98
45	27.39	0.02	alpha-Zingiberene	000495-60-3	93
46	27.74	0.43	Alpha-Copaene	003856-25-5	99
47	28.04	0.25	Cyclohexane	000515-13-9	98
48	28.17	0.04	Cyclohexane	000515-13-9	86
49	28.55	5.09	beta-Elemene	000515-13-9	99
50	28.91	0.17	Methyl Eugenol	000093-15-2	98
51	29.51	6.36	trans-Caryophyllene	000087-44-5	99
52	29.57	0.16	beta-Gurjunene	017334-55-3	96
53	29.71	0.06	beta-Panasinsene	000000-00-0	93
54	29.82	0.17	alpha-Gurjunene	000489-39-4	99
55	29.93	0.08	alpha-Gurjunene	000489-39-4	99
56	30.47	3.64	Humulene	006753-98-6	98
57	30.55	0.35	Aromadendrene	000489-39-4	99
58	30.75	0.09	Bicyclo [5.3.0] decane	000000-00-0	93
59	30.80	0.03	Cyclohexane	000515-13-9	99
60	31.01	0.49	gamma-Selinene	000515-17-3	98
61	31.32	3.54	Germacrene D	023986-74-5	99
62	31.41	0.70	beta-Eudesmene	017066-67-0	99
63	31.51	0.16	1H-Cyclopropa[a]naphthalene	017334-55-3	97
64	31.79	3.26	Bicyclogermacrene	100762-46-7	98

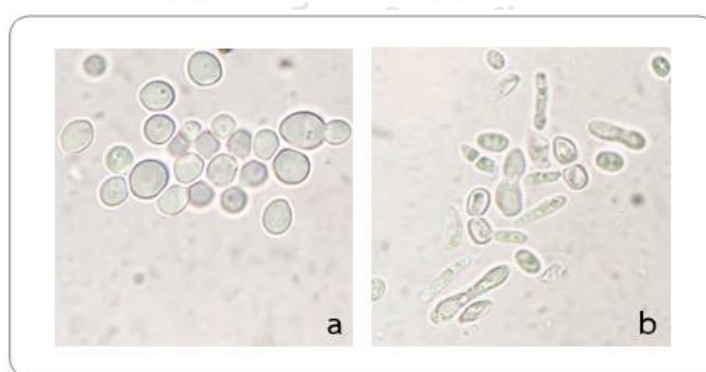
Peak No.	Retention Time (min)	Peak Area (%)	Possible Compounds	CAS number	Quality of Identification
65	31.83	0.20	Isohomogenol	000093-16-3	95
66	32.12	2.65	Allo-Aromadendrene	025246-27-9	81
67	32.21	0.16	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta., 8a.alpha.)	039029-41-9	98
68	32.31	0.04	Bicyclo [4.4.0] dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	000000-00-0	90
69	32.48	0.84	delta-Cadinene	000483-76-1	98
70	32.69	0.06	Naphthalene, 1,2,3,4,6,8a-hexahydro-1-isopropyl-4,7-dimethyl-	016728-99-7	98
71	32.82	0.03	alpha-Cadinene	000000-00-0	97
72	33.25	0.07	Caryophyllene oxide	001139-30-6	90
73	33.40	0.01	1-Methylidene-2b-hydroxymethyl-3,3-dimethyl-4a-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexane	000000-00-0	95
74	33.49	0.05	Eremophilene	010219-75-7	95
75	33.74	0.38	Palustrol	005986-49-2	98
76	34.22	2.22	Caryophyllene oxide	001139-30-6	78
77	34.35	0.68	Globulol	000489-41-8	99
78	34.63	1.37	Viridiflorol	000552-02-3	99
79	34.95	2.04	Ledol	000577-27-5	99
80	35.05	0.57	1,8-Naphthyridine, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,2,4a,7,7-pentamethyl-, 8-oxide	069340-71-2	90
81	35.42	6.32	1,8-Naphthyridine, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,2,4a,7,7-pentamethyl-, 8-oxide	069340-71-2	90
82	35.56	3.57	1,8-Naphthyridine, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-2,2,4a,7,7-pentamethyl-, 8-oxide	069340-71-2	90
83	35.67	0.25	1-(2-Hydroxy-3,4-dimethylphenyl) ethanone	000000-00-0	58

Peak No.	Retention Time (min)	Peak Area (%)	Possible Compounds	CAS number	Quality of Identification
84	35.73	0.15	Cadina-1,4-diene	000000-00-0	64
85	35.82	0.08	alpha-Elemene	005951-67-7	95
86	35.99	0.48	Isospathulenol	000000-00-0	99
87	36.10	0.85	tau-Muurolol	019912-62-0	93
88	36.16	0.26	Copaene	003856-25-5	97
89	36.29	0.22	Aromadendrene	000489-39-4	99
90	36.54	2.48	alpha-Cadinol	000481-34-5	96
91	36.65	0.05	Oplopenone	028305-60-4	91
92	36.81	0.23	Crotonaldehyde	003155-71-3	66
93	36.96	0.01	6-(t-Butyl)-2,2,4-trimethyl-2H-thiopyran	142397-01-1	64
94	37.02	0.02	Ethanone	127940-12-9	64
95	37.17	0.04	4-Bromo-1-naphthylamine	002298-07-9	83
96	37.29	0.04	trans-Carveol	001197-07-5	46
97	38.28	10.11	alpha-Pyrone	065077-06-7	72
98	38.42	0.36	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	000000-00-0	97
99	38.65	0.07	2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)	004128-17-0	98
100	38.85	0.03	beta-Lonone	000079-77-6	70
101	39.06	0.01	alpha-Cedrene epoxide	000000-00-0	70
102	39.24	0.03	Benzyl benzoate	000120-51-4	98
103	39.65	0.78	2,4-Dimethoxy-6-methyl-3-(1-methylethyl) phenol (Espintanol)	000000-00-0	90
104	40.44	0.02	2,4-Dimethoxy-6-methyl-3-(1-methylethyl) phenol	000000-00-0	90
105	41.10	0.04	2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)	004128-17-0	98
106	42.20	0.28	Eugenin	000000-00-0	91
107	44.63	0.90	2-Cyclohexen-1-one, 3-hydroxy-5,5-dimethyl-	093719-18-7	87
108	45.19	0.88	4-Ethyl-3-(3-hydroxyphenyl) hex-4-en-1-ol	000000-00-0	83

Peak No.	Retention Time (min)	Peak Area (%)	Possible Compounds	CAS number	Quality of Identification
109	45.70	1.82	7-Methylcyercene	000000-00-0	86
110	48.03	0.04	Phytol isomer	000000-00-0	95
111	54.53	0.03	Diethylhexyl phthalate (DEHP)	000117-81-7	86
112	57.48	0.02	N-Methyl-1-adamantaneacetamide	000000-00-0	60

4.3 ผลการตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา และอณูชีววิทยา

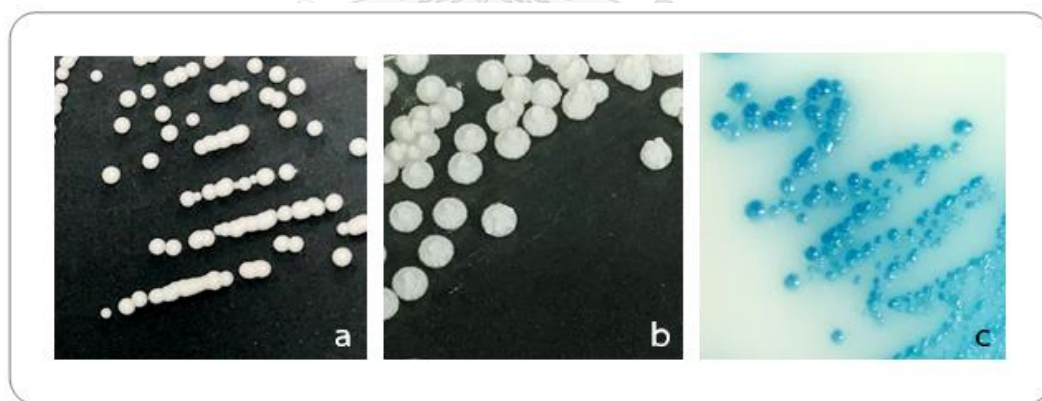
เมื่อนำเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท (แยกได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทเสมหะ จำนวน 11 ไอโซเลท และปัสสาวะ จำนวน 17 ไอโซเลท) และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) และทำการตรวจสอบลักษณะจุลสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทเป็นเซลล์ยีสต์ที่มีหลายลักษณะเซลล์ ตั้งแต่เซลล์เดี่ยว (unicellular) รูปร่างกลมรีคล้ายรูปไข่ (oval shaped) (ภาพที่ 20a) เซลล์หน่อ (budding yeast cells/ blastospores/ blastoconidia) และสายราเทียม (pseudohyphae) ซึ่งเกิดจากเซลล์หน่อยืดยาวออกและเรียงต่อกันในลักษณะคล้ายสายรา ไม่มีผนังกัน (septum) แต่มีรอยคอด (constriction) ที่ชัดเจนบริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ (ภาพที่ 20b)



ภาพที่ 20 ลักษณะจุลสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

- เซลล์เดี่ยว (unicellular) หรือเซลล์หน่อ (budding yeast cells)
- สายราเทียม (pseudohyphae)

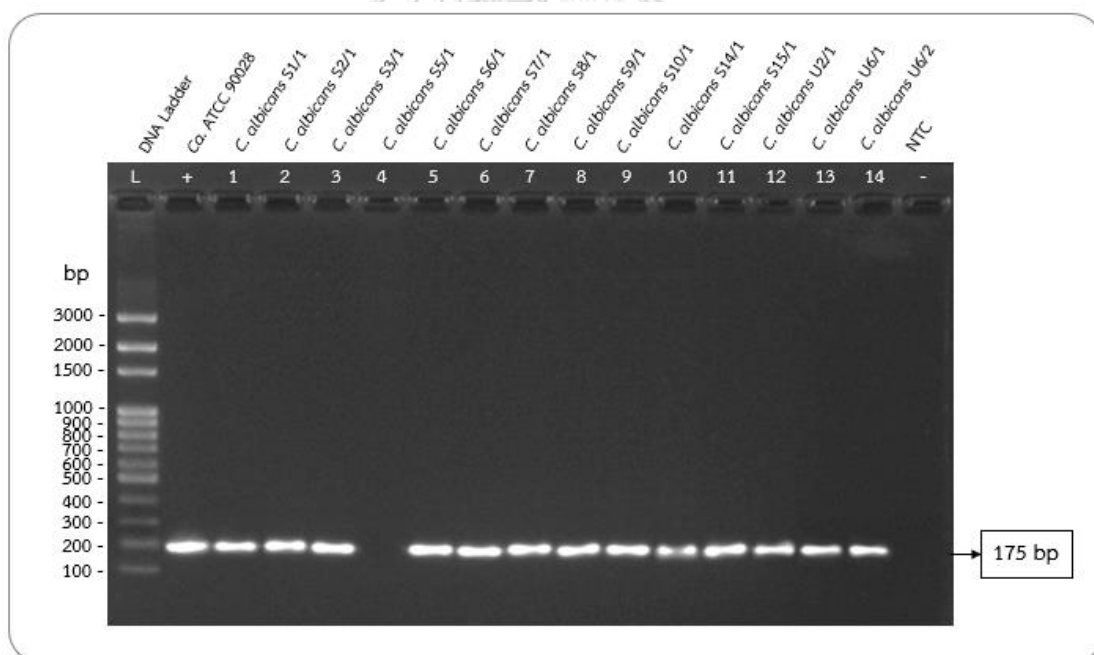
จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า บนอาหาร SDA พบว่าเชื้อทดสอบส่วนใหญ่มีลักษณะโคโลนีสีครีมขุ่น ทึบแสง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว มีความหนืดคล้ายเนยเหลว (ภาพที่ 21a) และบางไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีสีครีมขุ่น ทึบแสง รูปร่างกลม นูน ขอบหยัก ผิวขรุขระ และมีความหนืดมากจนเป็นเส้นสายขณะใช้เข็มเขี่ยตะขึ้นมา (ภาพที่ 21b) ซึ่งเป็นลักษณะการเจริญของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดแข็ง เมื่อทำการตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อ *C. albicans* บนอาหาร Brilliance Candida Agar (BCA) โดยอาศัยหลักการที่เอนไซม์ hexosaminidase และ alkaline phosphatase จากเชื้อทดสอบไปย่อยสลาย chromogenic substrate ในอาหาร BCA ทำให้เกิดสีของโคโลนีแตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทให้โคโลนีสีเขียวบนอาหาร BCA (ภาพที่ 21c) (ภาคผนวก จ) แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อ *C. albicans* อย่างไรก็ตาม การจำแนกสีโคโลนีของเชื้อ *C. albicans* และ *C. dubliniensis* บนอาหาร BCA ยังเป็นไปได้ยาก เนื่องจากสปีชีส์มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมอย่างมาก (closely related species) และให้โคโลนีสีเขียวใกล้เคียงกัน จึงต้องดำเนินการทดสอบยืนยันชนิดของเชื้อ *C. albicans* ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาต่อไป



ภาพที่ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

- โคโลนีสีครีมขุ่น ทึบแสง รูปร่างกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว บนอาหาร SDA
- โคโลนีสีครีมขุ่น ทึบแสง รูปร่างกลม นูน ขอบหยัก ผิวขรุขระ บนอาหาร SDA
- โคโลนีสีเขียวบนอาหาร BCA

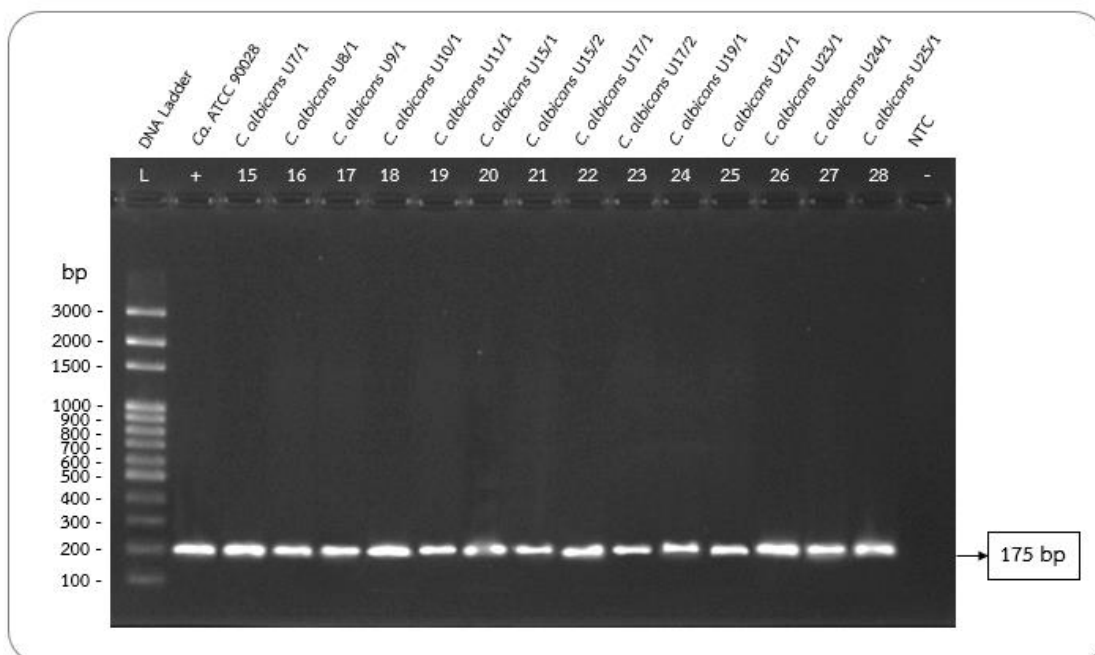
และจากการตรวจสอบยืนยันชนิดของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *26S rRNA* ของเชื้อ *C. albicans* โดยใช้ *26S rRNA* specific primers และนำ DNA amplicon มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของ แถบ DNA กับชุดควบคุมผลบวกและ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส พบว่ามีแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดเท่ากับ 175 คู่เบส เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ 1-3 และปฏิกิริยาที่ 5-28 (ภาพที่ 22 และภาพที่ 23) แสดงให้เห็นว่าเชื้อทดสอบในปฏิกิริยาดังกล่าว จำนวน 27 ไอโซเลท เป็น *C. albicans* จริง นอกจากนี้ ยังพบว่าในปฏิกิริยาที่ 4 ไม่มีแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้น (ภาพที่ 22) สันนิษฐาน ได้ว่าเชื้อทดสอบในปฏิกิริยานี้ อาจเป็นเชื้อ *C. dubliniensis* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม non-*albicans Candida*



ภาพที่ 22 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *26S rRNA* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

Lane L คือ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส, Lane + คือ ชุดควบคุมผลบวกของยีน *26S rRNA*

Lane 1-14 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ในปฏิกิริยาที่ 1-14, Lane - คือ ชุดควบคุมผลลบที่ไม่มี DNA ตั้งต้น



ภาพที่ 23 ผลผลิต PCR ของยีน 26S rRNA ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

Lane L คือ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส, Lane + คือ ชุดควบคุมผลบวกของยีน 26S rRNA

Lane 15-28 คือ ผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 15-28, Lane - คือ ชุดควบคุมผลลบที่ไม่มี DNA ตั้งต้น

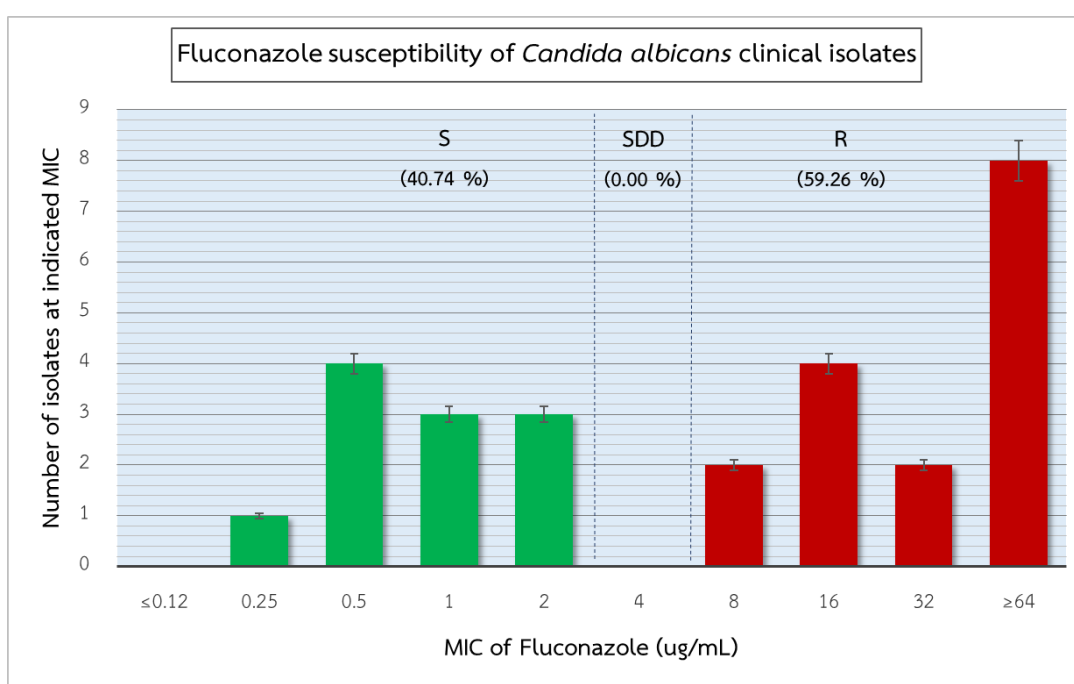
4.4 ผลการศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยวิธี Broth microdilution

จากการศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท โดยวิธี Broth microdilution ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) พบว่า *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก เป็นเชื้อที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล (susceptible, S) โดยมีค่า $MIC_{FCZ} \leq 2$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 11 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 40.74) และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล (resistant, R) โดยมีค่า $MIC_{FCZ} \geq 8$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 16 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 59.26) ตามลำดับ (ภาพที่ 24)

สำหรับชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งใช้ *C. albicans* ATCC 90028 เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบโดยวิธี Broth microdilution ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ

C. albicans ATCC 90028 โดยมีค่า MIC_{FCZ} อยู่ในช่วง 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

และชุดควบคุมการเจริญหรือชุดควบคุมสารละลาย คือ ชุดกล้าเชื้อทดสอบที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose + 0.5% DMSO) พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารดังกล่าว และในชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ คือ ชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปรากฏจากเชื้อ พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อปนเปื้อนในการทดสอบทุกชุด



ภาพที่ 24 รูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

S หมายถึง susceptible หรือเชื้อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล

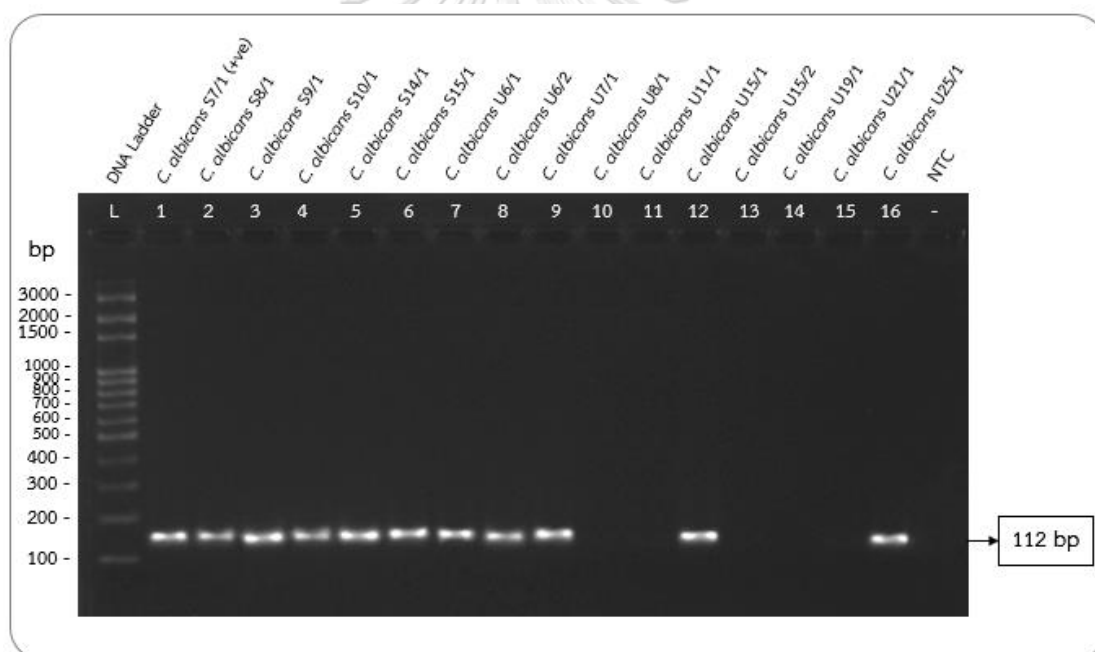
SDD หมายถึง susceptible dose dependent หรือเชื้อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล โดยขึ้นกับปริมาณยาที่ได้รับ

R หมายถึง resistant หรือเชื้อดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

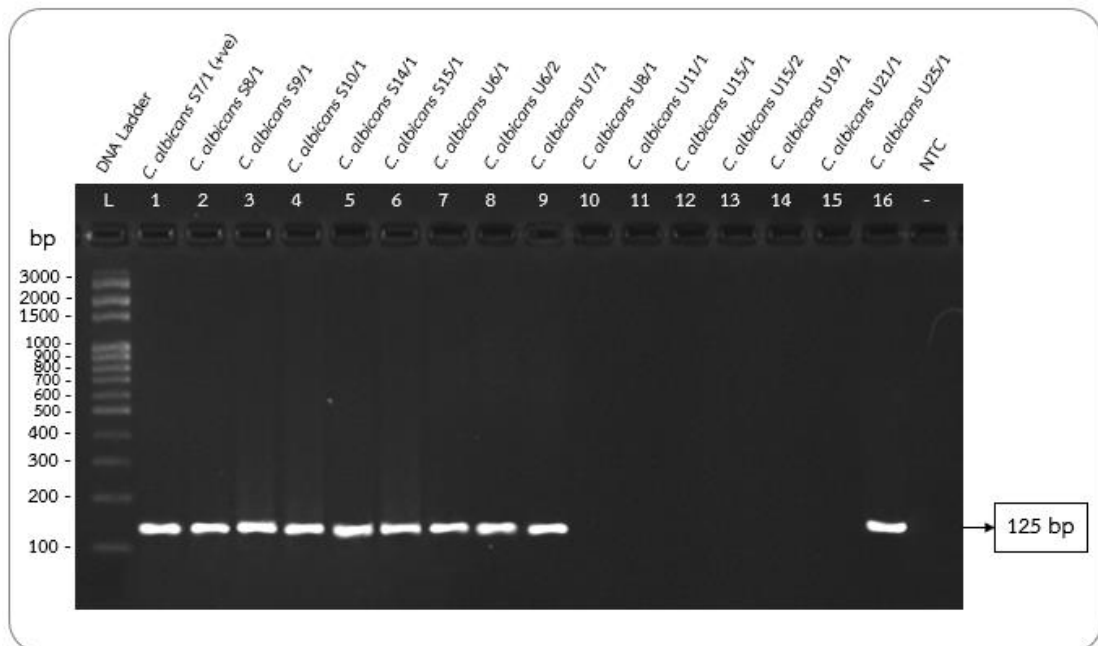
4.5 ผลการตรวจหายีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก ที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท ด้วย

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ช่องกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับชุดควบคุมผลบวกและ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส ผลการตรวจหายีน *CDR1* พบว่ามีแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดเท่ากับ 112 คู่เบส เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ 1-9 ปฏิกิริยาที่ 12 และปฏิกิริยาที่ 16 (ภาพที่ 25) ผลการตรวจหายีน *CDR2* พบว่ามีแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดเท่ากับ 125 คู่เบส เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ 1-9 และปฏิกิริยาที่ 16 (ภาพที่ 26) ผลการตรวจหายีน *MDR1* พบว่ามีแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดเท่ากับ 114 คู่เบส เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ 1-12 และปฏิกิริยาที่ 15-16 (ภาพที่ 27) และผลการตรวจหายีน *ERG11* พบว่ามีแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดเท่ากับ 137 คู่เบส เกิดขึ้นในทุกปฏิกิริยา (ภาพที่ 28)

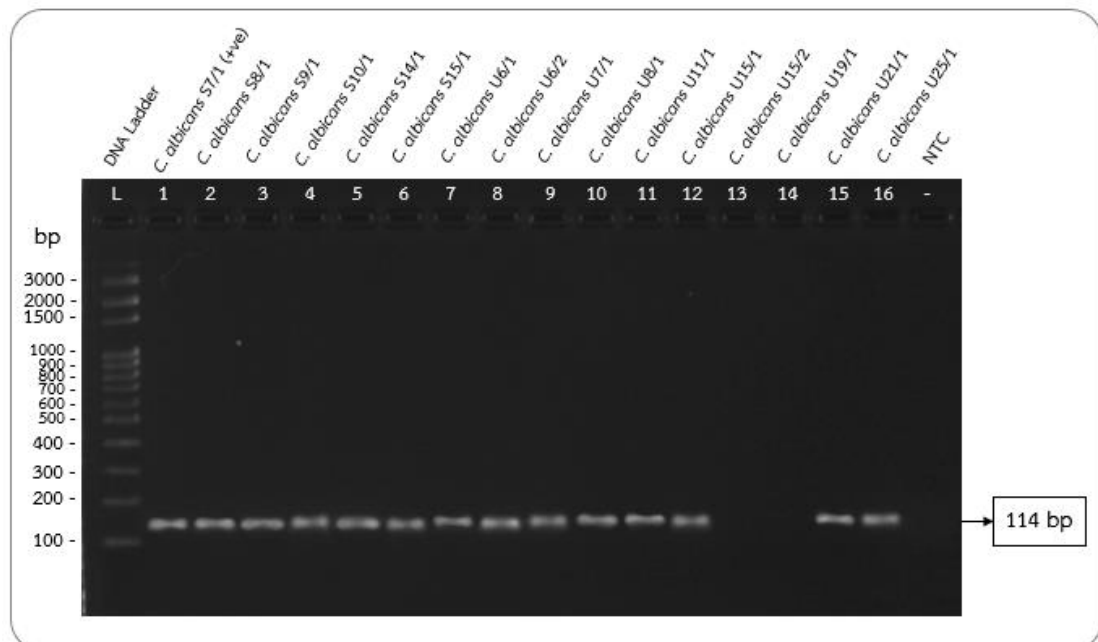


ภาพที่ 25 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *CDR1* ใน *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล
Lane L คือ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส, Lane 1 คือผลิตภัณฑ์ PCR ในปฏิกิริยาที่ 1 ของ *C. albicans* S7/1 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของยีน *CDR1*, Lane 2-17 คือผลิตภัณฑ์ PCR ในปฏิกิริยาที่ 2-17, Lane - คือชุดควบคุมผลลบที่ไม่มี DNA ตั้งต้น



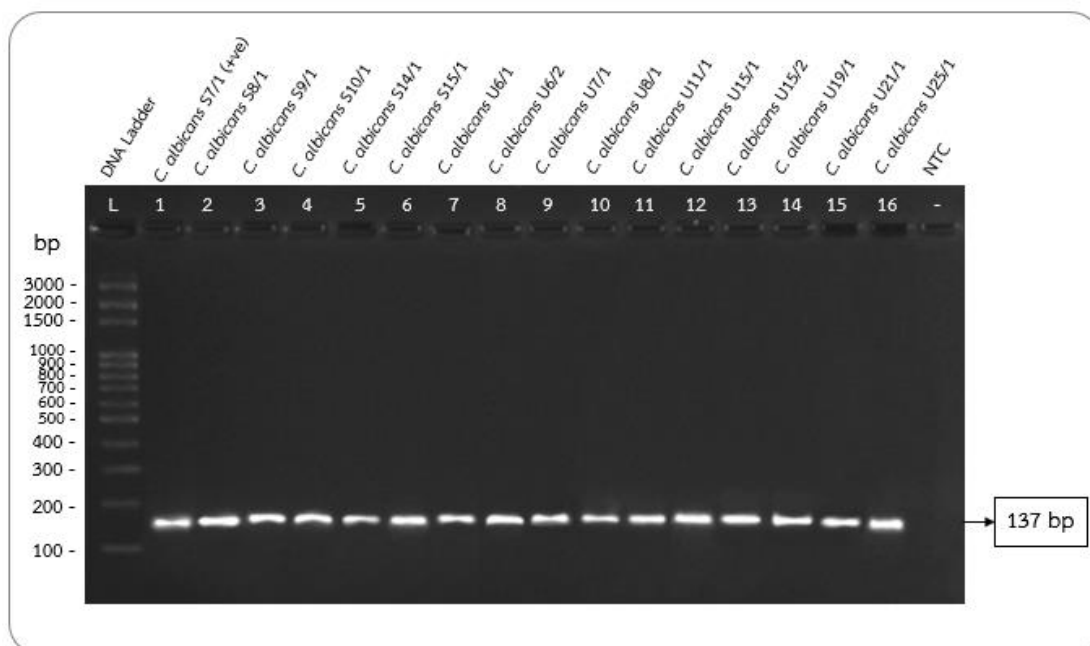
ภาพที่ 26 ผลผลิต PCR ของยีน *CDR2* ใน *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล

Lane L คือ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส, Lane 1 คือผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 1 ของ *C. albicans* S7/1 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของยีน *CDR2*, Lane 2-17 คือผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 2-17, Lane - คือชุดควบคุมผลลบที่ไม่มี DNA ตั้งต้น



ภาพที่ 27 ผลผลิต PCR ของยีน *MDR1* ใน *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล

Lane L คือ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส, Lane 1 คือผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 1 ของ *C. albicans* S7/1 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของยีน *MDR1*, Lane 2-17 คือผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 2-17, Lane - คือชุดควบคุมผลลบที่ไม่มี DNA ตั้งต้น



ภาพที่ 28 ผลผลิต PCR ของยีน *ERG11* ใน *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล
Lane L คือ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส, Lane 1 คือผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 1 ของ *C. albicans* S7/1 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวกของยีน *ERG11*, Lane 2-17 คือผลผลิต PCR ในปฏิกิริยาที่ 2-17, Lane - คือชุดควบคุมผลลบที่ไม่มี DNA ตั้งต้น

จากผลการตรวจหายีนดังกล่าวข้างต้น พบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล ทั้ง 16 ไอโซเลท มียีนที่เกี่ยวข้องกับการติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยสามารถพบยีน *CDR1* ได้ในเชื้อทดสอบ จำนวน 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 68.75) สามารถพบยีน *CDR2* ได้ในเชื้อทดสอบ จำนวน 10 ไอโซเลท (ร้อยละ 62.5) สามารถพบยีน *MDR1* ได้ในเชื้อทดสอบ จำนวน 14 ไอโซเลท (ร้อยละ 87.5) และพบยีน *ERG11* ได้ในเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท (ร้อยละ 100) (ตารางที่ 8) และสามารถจำแนกรูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มคุณสมบัติในการติดต่อยาฟลูโคนาโซลได้ 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 ประกอบด้วย *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* รูปแบบที่ 2 ประกอบด้วย *CDR1*, *MDR1* และ *ERG11* รูปแบบที่ 3 ประกอบด้วย *MDR1* และ *ERG11* และรูปแบบที่ 4 ประกอบด้วย *ERG11* เพียงยีนเดียว (ตารางที่ 9) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบระดับค่า MIC_{FLC} ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยทดสอบสถิติ H ด้วยวิธีของครัสคาล-วัลลิส (Kruskal-Wallis H test) ซึ่งมีสมมติฐานหลัก (H_0) ว่าเชื้อทดสอบที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ มีระดับค่า MIC_{FLC} ไม่แตกต่างกัน และมีสมมติฐานรอง (H_1) ว่าเชื้อทดสอบที่มีรูปแบบของยีนต่างกัน อย่างน้อย

2 รูปแบบที่มีระดับค่า MIC_{FLC} แตกต่างกันได้ พบว่าได้ค่า p-value = 0.27 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าเชื้อทดสอบที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ มีระดับค่า MIC_{FLC} ไม่แตกต่างกัน (ภาคผนวก ญ)

ตารางที่ 8 ความถี่ในการตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล

ยีนที่ตรวจพบ	Positive isolates (ร้อยละ)	Negative Isolates (ร้อยละ)	รวม (ร้อยละ)
<i>CDR1</i>	11 (68.75)	5 (31.25)	16 (100.0)
<i>CDR2</i>	10 (62.5)	6 (37.5)	16 (100.0)
<i>MDR1</i>	14 (87.5)	2 (12.5)	16 (100.0)
<i>ERG11</i>	16 (100.0)	0 (0.0)	16 (100.0)

ตารางที่ 9 รูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล

รูปแบบ	ยีนที่ตรวจพบ	เชื้อทดสอบ	ค่า MIC _{FLC} (ug/mL)
1	<i>CDR1, CDR2, MDR1</i> และ <i>ERG11</i>	<i>C. albicans</i> S7/1	8
		<i>C. albicans</i> S8/1	16
		<i>C. albicans</i> S9/1	≥64
		<i>C. albicans</i> S10/1	≥64
		<i>C. albicans</i> S14/1	8
		<i>C. albicans</i> S15/1	≥64
		<i>C. albicans</i> U6/1	≥64
		<i>C. albicans</i> U6/2	≥64
		<i>C. albicans</i> U7/1	≥64
		<i>C. albicans</i> U25/1	≥64
2	<i>CDR1, MDR1</i> และ <i>ERG11</i>	<i>C. albicans</i> U15/1	≥64
3	<i>MDR1</i> และ <i>ERG11</i>	<i>C. albicans</i> U8/1	16
		<i>C. albicans</i> U11/1	16
		<i>C. albicans</i> U21/1	16
4	<i>ERG11</i>	<i>C. albicans</i> U15/2	32
		<i>C. albicans</i> U19/1	32

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล

4.6.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Disc diffusion

จากการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Disc diffusion บนอาหาร MHA + GMB พบว่าดิสก์บรรจุน้ำมันเสม็ดขาวขนาด 1 ไมโครลิตรต่อดิสก์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.67 ± 0.58 ถึง 10.00 ± 0.00 มิลลิเมตร และเมื่อใช้ดิสก์ทดสอบที่บรรจุน้ำมันเสม็ดขาวเพิ่มขึ้นเป็น 4 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะกว้างมากขึ้น อยู่ระหว่าง 7.67 ± 0.58 ถึง 12.33 ± 1.53 มิลลิเมตร (ตารางที่ 10) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ดิสก์ทดสอบที่บรรจุน้ำมันเสม็ดขาวเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตั้งแต่ 1, 2, 4 และ 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะมีขนาดกว้างมากขึ้นตามปริมาณของน้ำมันเสม็ดขาว (ภาพที่ 29)

สำหรับชุดควบคุมผลบวก ซึ่งใช้ดิสก์ยาฟลูโคนาโซลขนาด 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล ทั้ง 16 ไอโซเลทอยู่ในระดับต่ำ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 8.67 ± 0.58 ถึง 17.33 ± 1.15 มิลลิเมตร และทำให้ยืนยันผลได้ว่าเป็นเชื้อดีอย่างจริง นอกจากนี้ ในชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งใช้ *C. albicans* ATCC 90028 เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบโดยวิธี Disc diffusion ด้วยดิสก์ยาฟลูโคนาโซลขนาด 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ บนอาหาร MHA + GMB พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC 90028 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 32.00 ± 2.00 มิลลิเมตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 27-38 มิลลิเมตร (ตารางที่ 10) และชุดควบคุมผลลบ ซึ่งใช้ดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ พบว่าดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท (ตารางที่ 10)

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาว โดยการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน

(Pearson product-moment correlation) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่าได้ค่า $r = -0.151$ และค่า sig. (2-tailed) = 0.578 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดขาวไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อของน้ำมันเมล็ดขาวและยาฟลูโคนาโซล ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิเมตร) *					แปลผล ความไว
		น้ำมันเมล็ดขาว (1 ไมโครลิตร)	น้ำมันเมล็ดขาว (4 ไมโครลิตร)	DMSO (20 ไมโครลิตร)	ยาฟลูโคนาโซล (10 ไมโครกรัม)		
1	<i>C. albicans</i> S7/1	8.00 ± 0.00	11.33 ± 0.58	NZ	12.67 ± 0.58	R	
2	<i>C. albicans</i> S8/1	8.00 ± 0.00	11.33 ± 0.58	NZ	13.33 ± 3.06	R	
3	<i>C. albicans</i> S9/1	8.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	NZ	13.67 ± 1.15	R	
4	<i>C. albicans</i> S10/1	9.00 ± 1.00	10.33 ± 0.58	NZ	10.00 ± 0.00	R	
5	<i>C. albicans</i> S14/1	9.33 ± 1.15	11.00 ± 1.00	NZ	13.00 ± 0.00	R	
6	<i>C. albicans</i> S15/1	9.00 ± 0.00	11.67 ± 0.58	NZ	8.67 ± 0.58	R	
7	<i>C. albicans</i> U6/1	8.00 ± 0.00	10.67 ± 0.58	NZ	17.33 ± 0.58	S-DD	
8	<i>C. albicans</i> U6/2	10.00 ± 0.00	12.33 ± 1.53	NZ	17.33 ± 1.15	S-DD	
9	<i>C. albicans</i> U7/1	7.67 ± 0.58	10.33 ± 0.58	NZ	13.00 ± 1.73	R	
10	<i>C. albicans</i> U8/1	6.67 ± 0.58	7.67 ± 0.58	NZ	13.67 ± 0.58	R	
11	<i>C. albicans</i> U11/1	8.00 ± 0.00	10.33 ± 0.58	NZ	13.33 ± 1.53	R	
12	<i>C. albicans</i> U15/1	8.33 ± 0.58	12.00 ± 0.00	NZ	12.67 ± 0.58	R	
13	<i>C. albicans</i> U15/2	8.00 ± 0.00	10.33 ± 0.58	NZ	12.33 ± 1.15	R	
14	<i>C. albicans</i> U19/1	7.67 ± 0.58	11.33 ± 0.58	NZ	11.67 ± 0.58	R	
15	<i>C. albicans</i> U21/1	8.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	NZ	17.00 ± 1.00	S-DD	
16	<i>C. albicans</i> U25/1	8.33 ± 0.58	12.00 ± 1.00	NZ	10.33 ± 1.15	R	
17	<i>C. albicans</i> ATCC 90028 (Reference)	7.00 ± 0.00	11.33 ± 0.58	NZ	32.00 ± 2.00	✓	

หมายเหตุ: * หมายถึง ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

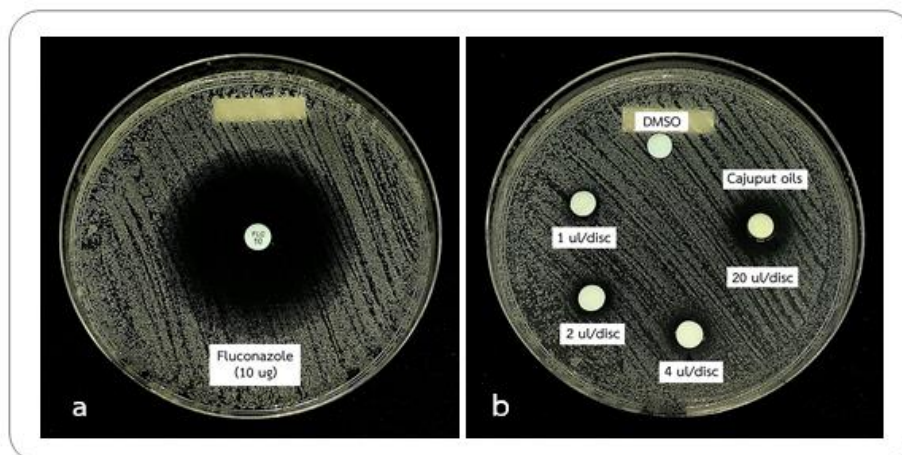
NZ หมายถึง ไม่พบบริเวณยับยั้งเชื้อ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์เท่ากับ 6 มิลลิเมตร

S-DD หมายถึง susceptible-dose dependent หรือเชื้อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล

โดยขึ้นกับปริมาณยาที่ได้รับ

R หมายถึง resistant หรือเชื้อดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

✓ หมายถึง เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด



ภาพที่ 29 ผลการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาว โดยวิธี Disc diffusion

4.6.2 ผลการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (MFC) ของน้ำมันเสม็ดขาวต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Broth macrodilution

จากการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาวต่อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Broth macrodilution ด้วยน้ำมันเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลท และสายพันธุ์มาตรฐานใกล้เคียงกัน โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.31-1.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และมีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.63-2.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 11) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาวมีค่าไม่แตกต่างกัน (ไม่เกิน 4 เท่า) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแบบฆ่าเชื้อรา (fungicidal effect)

สำหรับชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งใช้ *C. albicans* ATCC 90028 เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบโดยวิธี Broth macrodilution ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC 90028 โดยมีค่า MIC_{FLC} อยู่ในช่วง 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด คือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 11)

และชุดควบคุมการเจริญหรือชุดควบคุมสารละลาย คือ ชุดกล้าเชื้อทดสอบที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose + 1% DMSO) พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อราเกิดจากฤทธิ์ของน้ำมันเมล็ดขาวจริง และในชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อ ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท

นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดขาวต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล โดยการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่าได้ค่า $r = 0.38$ และค่า sig. (2-tailed) = 0.146 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดขาวไม่มีความสัมพันธ์กัน (ภาคผนวก ญ)

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเมล็ดขาวต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ค่า MIC ของ น้ำมันเมล็ดขาว* (ไมโครลิตร/มิลลิลิตร)	ค่า MFC ของ น้ำมันเมล็ดขาว* (ไมโครลิตร/มิลลิลิตร)	ค่า MIC ของ ยาฟลูโคนาโซล* (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	<i>C. albicans</i> S7/1	1.25	1.25	8
2	<i>C. albicans</i> S8/1	1.25	1.25	16
3	<i>C. albicans</i> S9/1	1.25	1.25	≥64
4	<i>C. albicans</i> S10/1	1.25	1.25	≥64
5	<i>C. albicans</i> S14/1	1.25	1.25	8
6	<i>C. albicans</i> S15/1	1.25	1.25	≥64
7	<i>C. albicans</i> U6/1	1.25	1.25	≥64
8	<i>C. albicans</i> U6/2	1.25	1.25	≥64
9	<i>C. albicans</i> U7/1	1.25	1.25	≥64
10	<i>C. albicans</i> U8/1	1.25	1.25	16
11	<i>C. albicans</i> U11/1	0.31	0.63	16
12	<i>C. albicans</i> U15/1	1.25	1.25	≥64
13	<i>C. albicans</i> U15/2	0.31-0.63	0.63	32
14	<i>C. albicans</i> U19/1	0.31	0.63	32
15	<i>C. albicans</i> U21/1	0.63	1.25	16

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ค่า MIC ของ น้ำมันเสม็ดขาว* (ไมโครลิตร/มิลลิลิตร)	ค่า MFC ของ น้ำมันเสม็ดขาว* (ไมโครลิตร/มิลลิลิตร)	ค่า MIC ของ ยาฟลูโคนาโซล* (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
16	<i>C. albicans</i> U25/1	1.25	1.25	≥64
17	<i>C. albicans</i> ATCC 90028 (Reference)	1.25	1.25	0.5-1 (✓)

หมายเหตุ: * หมายถึง ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

✓ หมายถึง เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด

4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเสม็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยวิธี Checkerboard microdilution

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเสม็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Checkerboard microdilution ด้วยสารผสมระหว่างยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) และแปลผลจากค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (Fractional Inhibitory Concentration Index, FICI) พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ *C. albicans* S7/1, *C. albicans* U6/2 และ *C. albicans* U15/1 โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.189, 0.159 และ 0.144 ตามลำดับ และไม่พบการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างน้ำมันเสม็ดขาวและยาฟลูโคนาโซลในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ *C. albicans* U8/1 และ *C. albicans* U19/1 และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยมีค่า FICI เท่ากับ 1.032, 2 และ 1.004 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

สำหรับชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งใช้ *C. albicans* ATCC 90028 เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบโดยวิธี Broth microdilution ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) พบว่ายาลฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 โดยมีค่า MIC_{FLC} เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12)

และชุดควบคุมการเจริญหรือชุดควบคุมสารละลาย คือชุดกล้ำเชื้อทดสอบที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose + 1% DMSO) พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อราเกิดจากฤทธิ์ของน้ำมันเมล็ดชาจริง และในชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ คือชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อ ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดชาในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ต่อต่อยาฟลูโคนาโซล

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	รูปแบบยีนที่ตรวจพบ	สารทดสอบ	ค่า MIC alone	ค่า MIC combine	ค่า FIC	ค่า FICI *	แปลผล
1	<i>C. albicans</i>	<i>CDR1, CDR2, ST7/1, MDR1, ERG11</i>	ฟลูโคนาโซล	8	1	0.125	0.189	Synergistic
			น้ำมันเมล็ดชา	1.25	0.08	0.064		
2	<i>C. albicans</i>	<i>CDR1, CDR2, U6/2, MDR1, ERG11</i>	ฟลูโคนาโซล	64	2	0.031	0.159	Synergistic
			น้ำมันเมล็ดชา	1.25	0.16	0.128		
3	<i>C. albicans</i>	<i>CDR1, MDR1, U15/1, ERG11</i>	ฟลูโคนาโซล	64	1	0.016	0.144	Synergistic
			น้ำมันเมล็ดชา	1.25	0.16	0.128		
4	<i>C. albicans</i>	<i>MDR1, ERG11, U8/1</i>	ฟลูโคนาโซล	16	16	2	1.032	Indifferent
			น้ำมันเมล็ดชา	1.25	0.04	0.032		
5	<i>C. albicans</i>	<i>ERG11, U19/1</i>	ฟลูโคนาโซล	32	32	1	2	Indifferent
			น้ำมันเมล็ดชา	0.31	0.31	1		
6	<i>C. albicans</i>	-	ฟลูโคนาโซล	0.5	0.25	0.5	1.004	Indifferent
			ATCC 90028	น้ำมันเมล็ดชา	1.25	0.63		

หมายเหตุ: * หมายถึง ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ครั้ง

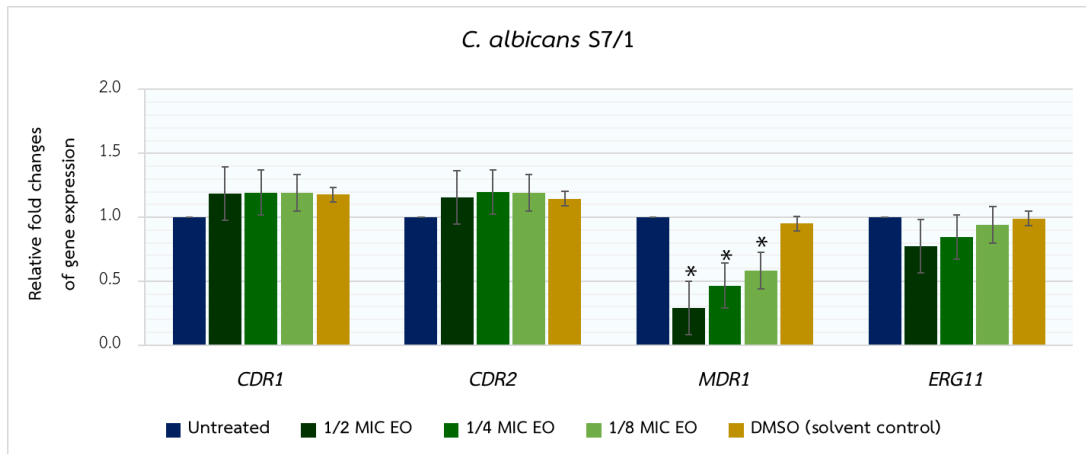
Synergistic หมายถึง สารผสมระหว่างยาและน้ำมันเมล็ดชามีการเสริมฤทธิ์ร่วมกัน ($FICI \leq 0.5$)

Indifferent หมายถึง สารผสมมีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว ($1.0 < FICI \leq 4.0$)

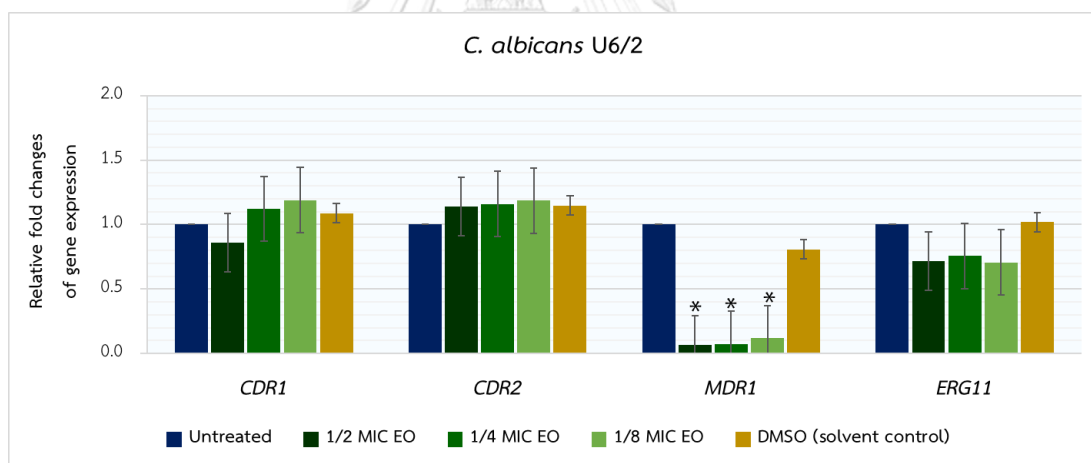
4.8 ผลการศึกษาผลกระทบของน้ำมันเมล็ดขาวต่อการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล โดยเทคนิค ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบเรียลไทม์ย้อนกลับ (qRT-PCR)

จากการศึกษาผลกระทบของน้ำมันเมล็ดขาวต่อการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลท ที่มีรูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มคุณสมบัติในการดื้อต่อยาต่างกัน ด้วยเทคนิค qRT-PCR และวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณสัมพัทธ์ (relative quantification) เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าว ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง (normalization) และแสดงผลเป็นสัดส่วนความเปลี่ยนแปลง (fold change) ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดขาว (calibrator) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับน้ำมันเมล็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC และ $\frac{1}{8}$ MIC เป็นเวลา 90 นาที (treated) ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันเมล็ดขาวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในเชื้อทดสอบ โดยระดับการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม น้ำมันเมล็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC กลับมีประสิทธิภาพในการลดระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเชื้อทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว ยังสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ในเชื้อทดสอบได้ทุกไอโซเลท แต่ระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *ERG11* จะมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดขาวที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 30 ถึงภาพที่ 34

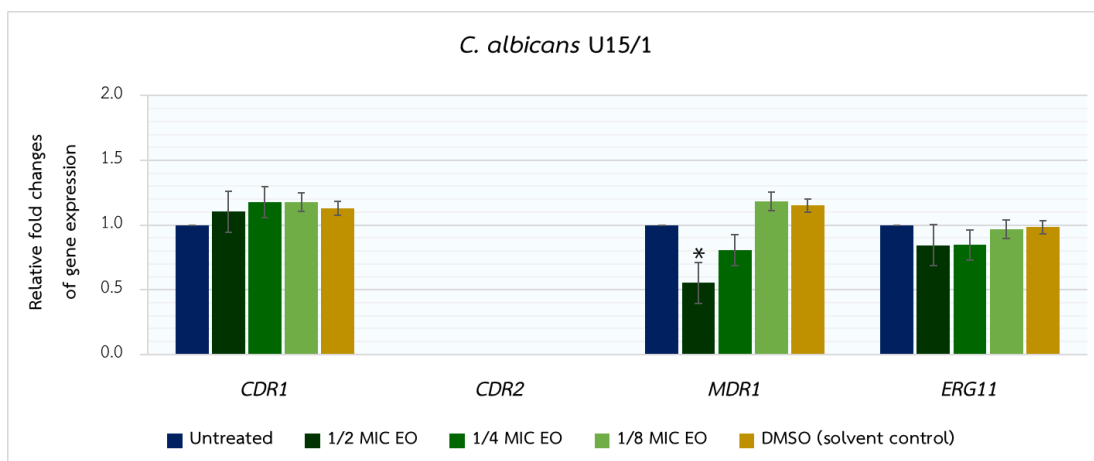
สำหรับการตรวจสอบยืนยันผลผลิต PCR ของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่ได้จากปฏิกริยา qRT-PCR ด้วยวิธีการวิเคราะห์ melting curve พบว่าผลผลิต PCR ของยีนแต่ละชนิดมีลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature, T_m) เฉพาะตัวแตกต่างกันและเกิดเป็น peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (ภาคผนวก ฉ)



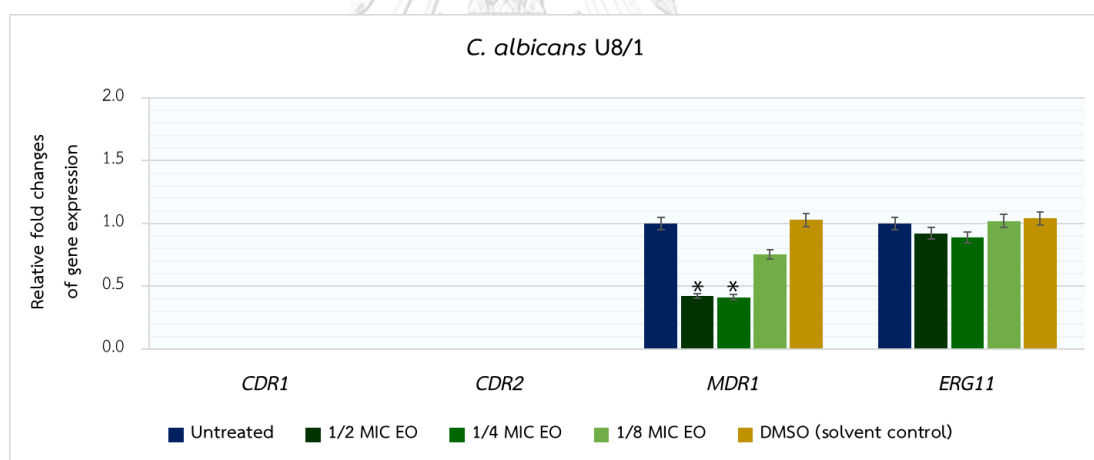
ภาพที่ 30 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* S7/1 ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดขาว (untreated) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับ น้ำมันเมล็ดขาวความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC และ 1/8MIC เป็นเวลา 90 นาที (treated) * หมายถึง ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)



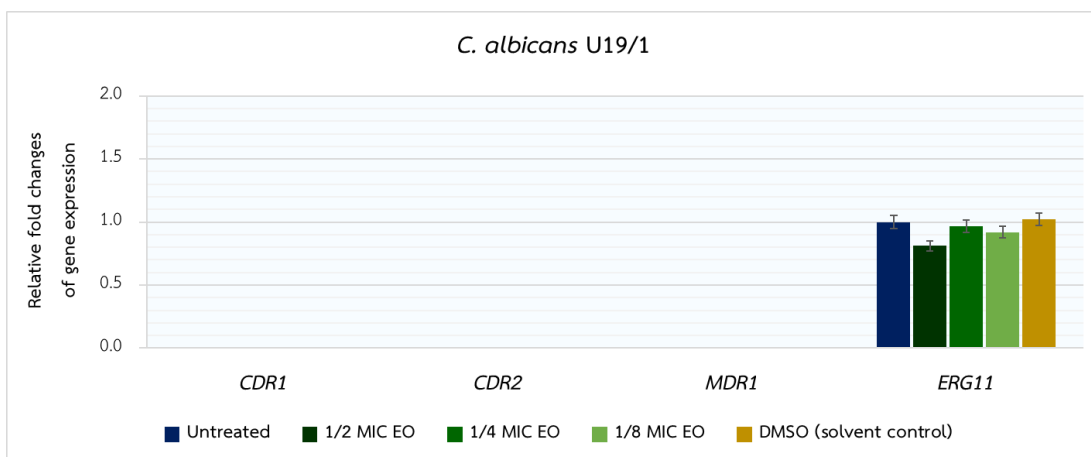
ภาพที่ 31 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* U6/2 ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดขาว (untreated) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับ น้ำมันเมล็ดขาวความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC และ 1/8MIC เป็นเวลา 90 นาที (treated) * หมายถึง ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)



ภาพที่ 32 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* U15/1 ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดชา (untreated) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับ น้ำมันเมล็ดชาความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC และ 1/8MIC เป็นเวลา 90 นาที (treated)
* หมายถึง ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)



ภาพที่ 33 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* U8/1 ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดชา (untreated) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับ น้ำมันเมล็ดชาความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC และ 1/8MIC เป็นเวลา 90 นาที (treated)
* หมายถึง ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)



ภาพที่ 34 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซลใน *C. albicans* U19/1 ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดชา (untreated) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับ น้ำมันเมล็ดชาความเข้มข้น 1/2MIC, 1/4MIC และ 1/8MIC เป็นเวลา 90 นาที (treated)
* หมายถึง ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เมื่อนำใบและกิ่งอ่อนของต้นเสม็ดขาวสายพันธุ์ *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ป่าชุมชน ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี มาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าได้น้ำมันเสม็ดขาวที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน ปราศจากตะกอนและสารแขวนลอย มีกลิ่นเฉพาะตัว และได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 0.35 โดยมวล (%W/W) เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้มีองค์ประกอบหลัก 6 ชนิด ได้แก่ 1,8-Naphthyridine derivatives (ร้อยละ 10.46), alpha-Pyrone (ร้อยละ 10.11), Terpinolene (ร้อยละ 9.26), gamma-Terpinene (ร้อยละ 8.00), trans-Caryophyllene (ร้อยละ 6.36) และ beta-Elementene (ร้อยละ 5.09)

ผลการตรวจสอบลักษณะจุลสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทเป็นยีสต์เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเชื้อ *C. albicans* จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าบนอาหาร SDA พบว่าเชื้อทดสอบมีลักษณะการเจริญของเชื้อ *C. albicans* เมื่อทำการตรวจสอบยีนย่นชนิดของเชื้อ *C. albicans* บนอาหาร BCA พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทให้โคโลนีสีขาว แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อ *C. albicans* อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการตรวจสอบยีนย่นชนิดของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท (ร้อยละ 96.43) เป็นเชื้อ *C. albicans* จริง และเชื้อสายพันธุ์คลินิกอีก 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 3.57) ไม่ใช่ *C. albicans*

ผลการศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท โดยวิธี Broth microdilution ตามมาตรฐานของ CLSI (2017) ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 0.12-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) พบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิกเป็นเชื้อที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 40.74) และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท (ร้อยละ 60.71)

ผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส พบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลทมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซล โดยมีความถี่ในการตรวจพบยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* คิดเป็นร้อยละ 68.75, 62.5, 87.5 และ 100 ตามลำดับ และสามารถจำแนกรูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลได้ 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 ประกอบด้วย *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* รูปแบบที่ 2 ประกอบด้วย *CDR1*, *MDR1* และ *ERG11* รูปแบบที่ 3 ประกอบด้วย *MDR1* และ *ERG11* และรูปแบบที่ 4 ประกอบด้วย *ERG11* เพียงยีนเดียว

จากการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดขาวต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท โดยวิธี Disc diffusion พบว่าดิสก์บรรจุน้ำมันเมล็ดขาว ขนาด 1 ไมโครลิตรต่อดิสก์ (5 %V/V) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลท โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.67 ± 0.58 ถึง 10.00 ± 0.00 มิลลิเมตร และเมื่อใช้ดิสก์ทดสอบที่บรรจุน้ำมันเมล็ดขาวเพิ่มขึ้นเป็น 4 ไมโครลิตรต่อดิสก์ (20 %V/V) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะมีขนาดกว้างขึ้นเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.67 ± 0.58 ถึง 12.33 ± 1.53 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าน้ำมันเมล็ดขาวประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญต่อเชื้อทดสอบ และยังพบว่าเมื่อใช้ดิสก์ทดสอบที่บรรจุน้ำมันเมล็ดขาวเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตั้งแต่ 1, 2, 4 และ 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะมีขนาดกว้างมากขึ้นตามปริมาณของน้ำมันเมล็ดขาว และจากการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเมล็ดขาวต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท โดยวิธี Broth macrodilution พบว่าน้ำมันเมล็ดขาวมีฤทธิ์ต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลทใกล้เคียงกัน โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.31-1.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (0.031-0.125 %V/V) และมีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.63-2.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (0.063-0.25 %V/V) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเมล็ดขาวมีค่าไม่แตกต่างกัน (ไม่เกิน 4 เท่า) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันเมล็ดขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแบบฆ่าเชื้อรา (fungicidal effect)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันเมล็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีรูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต่างกัน และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Checkerboard

microdilution พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวและยาฟลูโคนาโซลมีการทำงานแบบเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ S7/1, U6/2 และ U15/1 โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.189, 0.159 และ 0.144 ตามลำดับ และไม่พบการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างน้ำมันเสม็ดขาวและยาฟลูโคนาโซลในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ U8/1 และ U19/1 และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยมีค่า FICI เท่ากับ 1.032, 2 และ 1.004 ตามลำดับ

จากการศึกษาผลกระทบของน้ำมันเสม็ดขาวต่อการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีรูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดต่อยาต่างกัน โดยใช้เทคนิค qRT-PCR และวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณสัมพันธ์ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC มีประสิทธิภาพในการลดระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) และยังสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ได้ แต่ระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p > 0.05$) โดยระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *ERG11* มีแนวโน้มลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันเสม็ดขาวที่เพิ่มขึ้น และพบว่าน้ำมันเสม็ดขาวไม่สามารถลดการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลได้ โดยระดับการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p > 0.05$)

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบและกิ่งอ่อนของต้นเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ป่าชุมชน ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน ปราศจากตะกอนและสารแขวนลอย มีกลิ่นเฉพาะตัว และได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 0.35 โดยมวล (%W/W) ซึ่งปริมาณผลผลิตที่ได้นี้มีค่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Petrachaianan T. และคณะ ที่สกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่จังหวัดนครนายก ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 0.31 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแห้ง (%V/W) (111) และการศึกษาของ Brophy JJ. และคณะ

ที่สกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ทำการเกษตรรักษาพันธุ์สัตว์ป่าพรุโต๊ะแดง อำเภอสู่โขง โกลก จังหวัดนราธิวาส ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 0.42 โดยมวล (%W/W) (30) แต่ปริมาณผลผลิตที่ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ค่อนข้างมีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Kim JH. และคณะ ซึ่งสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาวสาย *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่แตกต่างกัน 6 แห่งในจังหวัดนราธิวาส ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และได้ปริมาณผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 0.56-0.97 โดยมวล (%W/W) (112)

จากข้อมูลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าเมื่อนำพืชชนิดเดียวกันมาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการเดียวกัน อาจได้ปริมาณผลผลิตที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ กฤษณีย์นั เจริญจิตร และคณะ พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ป่าเสม็ดเสื่อมโทรม ตำบลสนามไชย อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี และพื้นที่ป่าเสม็ดสมบูรณ์ตามธรรมชาติ ตำบลบ่อ อำเภอลือ จังหวัดจันทบุรี มีความแตกต่างกัน โดยคิดเป็นร้อยละ 0.81 และ 0.15 โดยมวล (%W/W) ตามลำดับ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่พืชเจริญเติบโต (113) และการศึกษาของ มะลิวัลย์ หุตทันธนา และคณะ พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่แตกต่างกัน 4 แห่ง ได้แก่ 1) พื้นที่ป่าชายหาด อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี 2) พื้นที่ราบดินทราย อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี 3) พื้นที่ป่าเสม็ดธรรมชาติ อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง และ 4) พื้นที่ป่าละเมาะมีน้ำขัง อำเภอแกลง จังหวัดระยอง มีความแตกต่างกัน โดยคิดเป็นร้อยละ 0.85, 1.01, 0.50 และ 1.36 โดยมวล (%W/W) ตามลำดับ (114) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่เก็บสะสมในพืช มีความแปรปรวนสูง เมื่อสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการและตัวทำละลายเดียวกัน ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและสารพฤกษเคมีที่ออกมาอาจแตกต่างกัน โดยจะแปรเปลี่ยนไปตามหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและส่วนของพืช สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต ปริมาณการผลิตต่อม้ำมันและการเก็บสะสมน้ำมันในพืช รวมทั้งช่วงเวลาและอายุในการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม เป็นต้น (95) นอกจากนี้ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ อาจขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดที่ต่างกัน โดยในการศึกษาทำการสกัดแยกน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ ไม่ต้องใช้สารเคมีเหมาะสมสำหรับพืชที่ผลิตต่อม้ำมันไว้ในใบ และทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยปริมาณมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kiran V. และคณะ ได้ศึกษาวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลเพลาร์โกเนียม พบว่าวิธีการกลั่นด้วยน้ำจะได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าวิธีการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ หรือ

วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (115) และการศึกษาของ โอฬาร ตันทวีรุหงษ์ และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบและกิ่งอ่อนของต้นที่ทรี *M. alternifolia* ในพื้นที่แปลงทดลองบ้านทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ และการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยคิดเป็นร้อยละ 2.84, 2.81 และ 1.80 โดยมวล (%W/W) ตามลำดับ ซึ่งวิธีการกลั่นด้วยน้ำจะทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด (116)

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จากเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้มีองค์ประกอบหลัก 6 ชนิด ได้แก่ 1,8-Naphthyridine derivatives (ร้อยละ 10.46), alpha-Pyrone (ร้อยละ 10.11), Terpinolene (ร้อยละ 9.26), gamma-Terpinene (ร้อยละ 8.00), trans-Caryophyllene (ร้อยละ 6.36) และ beta-Elemene (ร้อยละ 5.09) ซึ่งองค์ประกอบหลักที่พบในการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ กฤษณีย์น เจริญจิตร และคณะ ที่พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ป่าเสม็ดเสื่อมโทรม ตำบลสนามไย อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี มีองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ได้แก่ 1,8-Naphthyridine derivatives (ร้อยละ 21.29), Benzaldehyde, 2,4,5 trimethoxy 3,6 dimethyl (ร้อยละ 20.45) และ trans-Caryophyllene (ร้อยละ 14.21) เช่นเดียวกับน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ป่าเสม็ดสมบูรณ์ตามธรรมชาติ ตำบลบ่อ อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี ที่พบองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ได้แก่ 1,8-Naphthyridine derivatives (ร้อยละ 29.20), trans-Caryophyllene (ร้อยละ 11.92) และ alpha-Terpinolene (ร้อยละ 6.46) (113) และองค์ประกอบหลักบางชนิดที่พบในการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในพืชชนิดเดียวกันของ Petrachaianan T. และคณะ ที่พบ Terpinolene (ร้อยละ 21.61), gamma-Terpinene (ร้อยละ 17.81) และ trans-Caryophyllene (ร้อยละ 12.22) เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวในพื้นที่จังหวัดนครนายก (111) และการศึกษาของ Brophy JJ. และคณะ ที่พบ Terpinolene (ร้อยละ 24.74) และ gamma-Terpinene (ร้อยละ 22.84) เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวในพื้นที่ทำการเกษตรรักษาพันธุ์สัตว์ป่าพรุโต๊ะแดง อำเภอสู้โงกโลก จังหวัดนราธิวาส (30)รวมทั้งการศึกษาของ Kim JH. และคณะ ที่พบ beta-Elemene (ร้อยละ 6.57-14.01) และ Terpinolene (ร้อยละ 2.67-7.92) เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันจากเสม็ดขาวในพื้นที่อำเภอสู้โงกโลก จังหวัดนราธิวาส และพบ Terpinolene (ร้อยละ 11.67-18.34), gamma-Terpinene (ร้อยละ 8.44-15.09) และ p-Cymene (ร้อยละ 6.82-14.97)

เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันจากเสม็ดขาวในพื้นที่อำเภอสุโขทัยและอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส (112) แต่องค์ประกอบหลักที่พบในการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยในพืชชนิดเดียวกันของ Retnosari S. และคณะ ที่พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จากใบเสม็ดขาว *M. cajuputi* ในพื้นที่เมืองมาลิ่ง เกาะบูรู และเมืองเมราอุเก สาธารณรัฐอินโดนีเซีย มีองค์ประกอบหลักเป็น 1,8-Cineole (ร้อยละ 41.60-59.90) และ alpha-Terpineol (ร้อยละ 4.85-18.19) (117) และการศึกษาในพืชสกุลเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์กันของ โอฬาร ตันตวิรุฬห์ และคณะ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากต้นที่ทรี *M. alternifolia* ในพื้นที่แปลงทดลองบ้านทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ มีองค์ประกอบหลักเป็น terpinen-4-ol (ร้อยละ 33.68-35.93) และ 1,8-cineole (ร้อยละ 6.73-10.92) (116)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าพืชสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกันอาจให้น้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือแตกต่างกันได้ แต่ตามมาตรฐานสากล ISO 4730:2017 กำหนดให้น้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุล *Melaleuca* spp. ที่มีคุณภาพและมีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจต้องมีองค์ประกอบหลักเป็น terpinen-4-ol อยู่ระหว่างร้อยละ 35.00-48.00 และ 1,8-cineole น้อยกว่าร้อยละ 10.00 (97) เมื่อทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี 15 ชนิด ของน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้ในการศึกษานี้ กับตามมาตรฐานสากล ISO 4730:2017 ของน้ำมันที่ทรีที่สกัดได้จากที่ทรี *M. alternifolia* พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้มีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ Terpinolene, alpha-Pinene, Sabinene, Aromadendrene, delta-Cadinene, Limonene, Globulol และ Viridiflorol และไม่เป็นไปตามมาตรฐานสากล จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ Terpinen-4-ol, gamma-Terpinene, alpha-Terpinene, 1,8-Cineole, p-Cymene, alpha-Terpineol และ Ledene ถึงแม้ว่าน้ำมันเสม็ดขาว ที่สกัดได้จะมีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีที่เป็นไปตามมาตรฐานสากลถึง 8 ชนิด แต่กลับพบสารที่บ่งชี้คุณภาพและมีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจ ได้แก่ Terpinen-4-ol และ 1,8-Cineole ในปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นที่ศึกษาองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเสม็ดขาว *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (30, 111-113)

โดยชนิดและปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยอาจแปรเปลี่ยนได้ตามหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและส่วนของพืช สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต ช่วงเวลาและอายุในการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม รวมถึงอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยด้านชนิดย่อย (subspecies) ได้ มีรายงานว่า

น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว *M. cajuputi* subsp. *cajuputi* ที่พบในสาธารณรัฐอินโดนีเซีย จะมีองค์ประกอบหลักเป็น 1,8-Cineole (ร้อยละ 15-60), Globulol (ร้อยละ 0.2-9), Viridiflorol (ร้อยละ 0.2-10) และ Spathulenol (ร้อยละ 0.4-30) เช่นเดียวกับน้ำมันหอมระเหยจาก *M. alternifolia* ที่พบในประเทศออสเตรเลีย ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว *M. cajuputi* subsp. *cumingiana* ที่พบทั่วไปในประเทศไทยและสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม จะมีองค์ประกอบหลักเป็น gamma-Terpinene (ร้อยละ 14-17) และ Terpinolene (ร้อยละ 10-23) (117) จึงสันนิษฐานได้ว่าสาเหตุที่ตรวจพบสาร Terpinen-4-ol และ 1,8-Cineole ในปริมาณน้อยหรือไม่พบเลยในน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้ในการศึกษานี้ น่าจะเกิดจากปัจจัยด้านชนิดย่อยของเสม็ดขาว อย่างไรก็ตาม การตรวจพบสารดังกล่าวในปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย ก็ไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จะไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใด ๆ เนื่องจากน้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้นี้ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพหลากหลาย ได้แก่ 1,8-Naphthyrindine derivatives ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ เช่น ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ระงับความเจ็บปวด (analgesic) ยาระงับประสาทที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมก้าวร้าว (anti-aggressive) ลดความดันโลหิต (antihypertensive) ป้องกันอาการแพ้ (antiallergic) ต้านมะเร็งและเนื้องอก (anticancer & antitumor) รวมถึงด้านแบคทีเรียและเชื้อรา (antibacterial & antifungal) เป็นต้น (118) alpha-Pyrone ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial) ต้านเนื้องอก และมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) (119) และ beta-Elemene ซึ่งมีฤทธิ์สำคัญในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ มะเร็ง (antiproliferative effect) และนิยมใช้เป็นยาเคมีบำบัด (chemotherapeutic agents) (120) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสาร Terpinolene, gamma-Terpinene และ trans-Caryophyllene ที่มีรายงานการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิด (121, 122)

การตรวจสอบชนิดของเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดแข็ง เป็นวิธีการศึกษาเชื้อราเบื้องต้นทางจุลชีววิทยาที่ทำให้สามารถตรวจสอบและระบุชนิดของเชื้อราได้จากลักษณะเซลล์และโคโลนีที่จำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง แต่เนื่องจากเชื้อสกุล *Candida* อาจมีลักษณะเซลล์ที่ใกล้เคียงกันได้และ *C. albicans* เองมีลักษณะเซลล์และโคโลนีที่หลากหลาย วิธีการนี้จึงมีความจำเพาะต่ำ ต้องอาศัยการสันนิษฐานและเปรียบเทียบร่วมกัน โดยสามารถบ่งชี้ได้เพียงเบื้องต้นว่าเชื้อทดสอบ

อาจเป็น *Candida* spp. แต่ต้องอาศัยการทดสอบอื่นร่วมด้วยเพื่อให้สามารถอ่านผลในระดับสปีชีส์ได้ (35) การตรวจสอบยีนยีนชนิดของเชื้อ *Candida* spp. บนอาหาร Brilliance Candida Agar (BCA) เป็นวิธีการทดสอบการสร้างสีของโคโลนีบนอาหาร Chromogenic Candida agar โดยอาศัยหลักการที่เอ็นไซม์ hexosaminidase และ alkaline phosphatase จากเชื้อจะไปย่อยสลาย chromogenic substrate 2 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อแต่ละชนิดเกิดสีโคโลนีแตกต่างกัน ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทให้โคโลนีสีเขียวบนอาหาร BCA จึงทำให้สามารถแปลผลได้ว่าเชื้อทดสอบเป็นเชื้อ *C. albicans* อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อเบื้องต้น (presumptive identification method) และรายงานผล *Candida* แบบ presumptive identification *C. albicans* เท่านั้น เนื่องจากเชื้อ *Candida* spp. อื่น ๆ ที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมอย่างมากกับเชื้อ *C. albicans* เช่น *C. dubliniensis* จะมีลักษณะเซลล์และลักษณะโคโลนีคล้ายกับเชื้อ *C. albicans* รวมทั้งเชื้อ *C. dubliniensis* และ *C. albicans* ยังสร้างโคโลนีสีเขียวใกล้เคียงกันบนอาหาร Chromogenic Candida agar จึงทำให้การแปลผลชนิดของเชื้อผิดพลาดได้ (123) จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าวิธีการระบุชนิดของเชื้อ *C. albicans* ในเบื้องต้นทางจุลชีววิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เหมาะสมในการอ่านผลในระดับสปีชีส์ โดยเฉพาะกรณีที่เชื้อมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมอย่างมาก อาจทำให้ผลการจำแนกชนิดเชื้อเป็นไปอย่างล่าช้าหรือผิดพลาดได้

เมื่อนำเชื้อทดสอบที่ได้รับการระบุชนิดเบื้องต้นด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยาแล้วว่าเป็น presumptive identification *C. albicans* มาตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *26S rRNA* ในบริเวณโดเมน D1/D2 ของเชื้อ *C. albicans* และวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับชุดควบคุมผลบวก และ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส ซึ่งผลผลิต PCR ของยีน *26S rRNA* จะมีขนาดเท่ากับ 175 คู่เบส ผลการทดสอบพบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท (ร้อยละ 96.43) เป็นเชื้อ *C. albicans* จริง และเชื้อสายพันธุ์คลินิกอีก 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 3.57) ไม่ใช่ *C. albicans* โดยเชื้อดังกล่าวอาจเป็นเชื้อ *C. dubliniensis* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Candida non-albicans* ซึ่งต้องทำการทดสอบด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเชื้อ *C. dubliniensis* ต่อไป ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mannarelli BM. และ Kurtzman CP. ที่พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *C. albicans* ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเพิ่มจำนวนยีน *26S rRNA* ในบริเวณโดเมน D1/D2 ของเชื้อ *C. albicans* (101)

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ เอนก ภูทอง และคณะ และ Sandra AM. และคณะ ที่ทำการศึกษาวิธีการจำแนกชนิด *Candida* spp. ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเปรียบเทียบกับเทคนิคทางจุลชีววิทยา และแสดงให้เห็นว่าวิธีการทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเชื้อโดยตรง มีความไวและความจำเพาะสูง และทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *C. albicans* ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำกว่าวิธีการเบื้องต้นทางจุลชีววิทยา (124, 125)

จากการศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท โดยวิธี Broth microdilution ตามมาตรฐานของ CLSI (2017) ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 0.12-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) และอ่านผลการทดสอบโดยดูการเจริญของเชื้อที่ตกตะกอนพร้อมเปรียบเทียบกับชุดควบคุมต่าง ๆ ในชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในการทดสอบ พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน โดยมีค่า MIC_{FCZ} อยู่ในช่วง 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าระบบการทดสอบข้างต้นมีความน่าเชื่อถือและสามารถอ่านผลการทดลองได้

สำหรับชุดควบคุมการเจริญหรือชุดควบคุมสารละลาย คือ ชุดกล้าเชื้อทดสอบที่เจือจางในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ผสมกับสารละลาย 0.5% DMSO พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารดังกล่าว แสดงว่าสารละลาย 0.5% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายยาฟลูโคนาโซลไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบหรือฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบไม่ใช่ผลบวกปลอมที่เกิดจากตัวทำละลาย นอกจากนี้ ในชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ คือ ชุดอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) ปราศจากเชื้อ ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ใด ๆ ในชุดการทดสอบของเชื้อทุกไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในระบบการทดสอบ

ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อสายพันธุ์คลินิก จำนวน 27 ไอโซเลท พบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิกเป็นเชื้อที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 40.74) และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท (ร้อยละ 59.26) จะเห็นได้ว่าเชื้อทดสอบในการศึกษานี้ มีอัตราการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลสูงกว่าไวต่อยาฟลูโคนาโซล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bergman S. และคณะ เกี่ยวกับข้อมูลการตรวจความไวต่อยาต้านเชื้อราของเชื้อ *Candida* spp. ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในของศูนย์การแพทย์เนแบรสกาในสหรัฐอเมริกา ตามมาตรฐานของ CLSI (2017) พบว่าเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก มีอัตราการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลสูงถึงร้อยละ 97.2 (126)

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zaidi KU. และคณะ ที่ทำการศึกษารูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 200 ไอโซเลท โดยวิธี Broth microdilution และพบอัตราการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลถึงร้อยละ 56.5 (127) อย่างไรก็ตาม เชื้อทดสอบในการศึกษานี้เป็นเชื้อที่สุ่มเลือกมาจากเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ได้รับจากโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี และเก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ (stock culture) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยภาวะติดเชื้อราแทรกซ้อนหรือการติดเชื้อซ้ำ จึงอาจพบเชื้อที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลได้สูงถึงร้อยละ 59.26 นอกจากนี้จากรายงานของ Hitkova HY. และคณะ ได้ทำการศึกษารูปแบบความไวต่อยาต้านเชื้อราของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จากโรงพยาบาลระดับตติยภูมิในสาธารณรัฐบัลแกเรีย พบว่าเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกจะมีอัตราการดื้อยาในกลุ่มเอโซลสูงที่สุด โดยเฉพาะยาฟลูโคนาโซล และสันนิษฐานว่าการดื้อยาในกลุ่มเอโซลอาจเกิดจากการพัฒนากลไกการดื้อยาหลายกลไกร่วมกัน เช่น การเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายของยาโดยการเกิดมิวเทชันเฉพาะที่ (point mutation) การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เป็นบริเวณเป้าหมายของยา (*ERG11*) รวมทั้งการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการขนส่งยาออกนอกเซลล์ (*CDR1*, *CDR2* และ *MDR1*) (128) ซึ่งกลไกการเพิ่มการแสดงออกของยีนดังกล่าว อาจส่งผลให้เชื้อ *C. albicans* มีอัตราการดื้อยาในกลุ่มเอโซลเพิ่มสูงขึ้นและอาจพัฒนาให้เกิดการดื้อยาข้ามกลุ่มได้

ในการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับชุดควบคุมผลบวกและ DNA มาตรฐานชนิด 100 คู่เบส พบว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลทมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล โดยมีความถี่ในการตรวจพบยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* คิดเป็นร้อยละ 68.75, 62.5, 87.5 และ 100 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า *ERG11* เป็นยีนที่มีความถี่ในการตรวจพบมากที่สุด เนื่องจาก *ERG11* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ 14 α -demethylase ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา จึงสามารถตรวจพบได้ในเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท สำหรับ *CDR1*, *CDR2* และ *MDR1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ

โปรตีน Cdr1, Cdr2 และ Mdr1 ที่แทรกอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มีหน้าที่ขนส่งสารเข้าและออกจากเซลล์ และอาจมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (17, 18) จึงสามารถตรวจพบได้ในเชื้อทดสอบบางไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Monapathi ME. และคณะ ที่ทำการตรวจหายีน *CDR1*, *CDR2* และ *MDR1* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 37 ไอโซเลท และตรวจพบยีนดังกล่าวในเชื้อทุกไอโซเลท โดยมีความถี่ในการตรวจพบคิดเป็นร้อยละ 97.28, 97.28 และ 78.38 ตามลำดับ (129)

นอกจากนี้ ในการศึกษานี้ได้จำแนกรูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล เป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 ประกอบด้วย *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* รูปแบบที่ 2 ประกอบด้วย *CDR1*, *MDR1* และ *ERG11* รูปแบบที่ 3 ประกอบด้วย *MDR1* และ *ERG11* และรูปแบบที่ 4 ประกอบด้วย *ERG11* เพียงยีนเดียว และทำการเปรียบเทียบระดับค่า MIC_{FLC} ในเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ มีระดับค่า MIC_{FLC} ไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับระดับการแสดงของแต่ละยีนในแต่ละไอโซเลท อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนความไวต่อยาในกลุ่ม azoles กับการแสดงออกของยีนดื้อยา พบว่า *C. albicans* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม azoles จะมีการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์ที่ไวต่อยาในกลุ่ม azoles (20) และยังมีอีกหลายรายงานการศึกษาที่ให้ผลสอดคล้องกัน (18, 21-26) ดังนั้น การตรวจพบยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลในการศึกษานี้ จึงทำให้สันนิษฐานได้ว่ายีนดังกล่าวอาจเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม azoles และการยับยั้งการทำงานของยีนเหล่านี้ อาจส่งผลให้เชื้อกลับมาไวต่อยาในกลุ่ม azoles ได้อีกครั้ง

จากการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดชาต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท โดยวิธี Disc diffusion ผลการทดสอบในชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและทดสอบด้วยดิสก์ยาฟลูโคนาโซล พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 32.00 ± 2.00 มิลลิเมตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนดคือ 27-38 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าระบบการทดสอบข้างต้นมีความน่าเชื่อถือและสามารถอ่านผลการทดลองได้

สำหรับชุดควบคุมผลบวกซึ่งใช้ดิสก์ยาฟลูโคนาโซล พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลทอยู่ในระดับต่ำ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 8.67 ± 0.58 ถึง 17.33 ± 1.15 มิลลิเมตร และชุดควบคุมผลลบ พบว่าดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทุกไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าสารละลาย DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายน้ำมันเสม็ดขาวไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเกิดจากฤทธิ์ของน้ำมันเสม็ดขาวจริง นอกจากนี้ ผลการทดสอบในชุดควบคุมผลบวกยังทำให้สามารถยืนยันผลได้ว่าเชื้อทดสอบมีการติดต่อยาฟลูโคนาโซลจริง โดยจัดเป็นเชื้อที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 13 ไอโซเลท และเป็นเชื้อที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซลลดลง จำนวน 3 ไอโซเลท อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบรูปแบบความไวต่อยาของเชื้อ *Candida* spp. ด้วยวิธี Disc diffusion อาจไม่เหมาะสมเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน Broth microdilution เนื่องจากเกิดความคลาดเคลื่อนได้จากหลายปัจจัย เช่น ค่า pH และความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความชื้นบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดของกล้าเชื้อทดสอบ อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเชื้อ รวมถึงอัตราการเจริญของเชื้อราบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (130) แต่มีบางรายงานการศึกษาที่ทำการตรวจสอบรูปแบบความไวต่อยาของเชื้อ *Candida* spp. ด้วยวิธี Disc diffusion (131) ซึ่งผลการศึกษาของ Mashad NE. และคณะ พบว่าวิธีการตรวจสอบรูปแบบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของ *C. albicans* ด้วยวิธี Disc diffusion และวิธี Broth microdilution ให้ผลที่สอดคล้องกันประมาณร้อยละ 81 (132) และ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ก็ระบุให้สามารถใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจสอบเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากดำเนินการได้สะดวก รวดเร็ว คุ้มค่า และทันต่อการรักษาผู้ป่วยในเบื้องต้น (104)

ผลการการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาว พบว่าดิสก์บรรจุน้ำมันเสม็ดขาวขนาด 1 ไมโครลิตรต่อดิสก์ (5 %V/V) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลท โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.67 ± 0.58 ถึง 10.00 ± 0.00 มิลลิเมตร และเมื่อใช้ดิสก์ทดสอบที่บรรจุน้ำมันเสม็ดขาวเพิ่มขึ้นเป็น 4 ไมโครลิตรต่อดิสก์ (20 %V/V) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะมีขนาดกว้างขึ้นเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.67 ± 0.58 ถึง 12.33 ± 1.53 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าน้ำมันเสม็ดขาวประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญต่อเชื้อทดสอบ และยังพบว่าเมื่อใช้ดิสก์ทดสอบที่บรรจุน้ำมันเสม็ดขาวเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตั้งแต่ 1, 2, 4 และ 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะมีขนาดกว้างมากขึ้นตามปริมาณของน้ำมันเสม็ดขาว ทำให้ทราบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจะแปรผันตรงกับปริมาณของน้ำมันเสม็ดขาว

เมื่อเปรียบเทียบจากผลงานวิจัยของ ภัทรมาศ เรืองสวัสดิ์ และคณะ ที่ทำการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาวชนิดเดียวกัน ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าดิสก์บรรจุน้ำมันเสม็ดขาว (25 %V/V) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์มาตรฐาน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อประมาณ 8.33 ± 0.57 มิลลิเมตร (133) และงานวิจัยที่ทดสอบในพืชสกุลเดียวกัน เช่น Agarwal V. และคณะ พบว่าดิสก์บรรจุน้ำมันที่ทรี *M. alternifolia* (100 %) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อประมาณ 11.00 มิลลิเมตร (134) และ Devkotte AN และคณะ พบว่าดิสก์บรรจุน้ำมันที่ทรี *M. alternifolia* (100 %) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้ออยู่ระหว่าง 11.00-24.00 มิลลิเมตร (135) จะเห็นได้ว่าน้ำมันเสม็ดขาวที่ใช้ในการศึกษานี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าว ทั้งนี้อาจเกิดจากชนิดของพืช องค์ประกอบทางเคมี หรือความสามารถของสารในการแพร่ออกไปสู่ตัวกลางที่เป็นวุ้นได้แตกต่างกัน จึงทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อต่างกันได้กว้างขึ้น อย่างไรก็ตาม การตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาวด้วยวิธี Disc diffusion ถือเป็น การทดสอบถึงคุณภาพที่สามารถบอกผลได้เบื้องต้นว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ และทำให้สามารถประมาณได้ว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีเพียงใด ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบยืนยันผลด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันเสม็ดขาวที่สามารถยับยั้งเชื้อหรือฆ่าเชื้อได้ต่อไป

ในการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาวต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท โดยวิธี Broth macrodilution ผลการทดสอบในชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและทดสอบด้วยยาฟลูโคนาโซล พบว่ายาฟลูโคนาโซลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน โดยมีค่า MIC_{FLC} อยู่ในช่วง 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด คือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าระบบการทดสอบข้างต้นมีความน่าเชื่อถือและสามารถอ่านผลการทดลองได้สำหรับชุดควบคุมการเจริญหรือชุดควบคุมสารละลาย พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลาย 1% DMSO แสดงให้เห็นว่าสารละลาย DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายยาฟลูโคนาโซลไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบและฤทธิ์ต้านเชื้อเกิดจากฤทธิ์ของน้ำมันเสม็ดขาวจริง

และชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ พบว่าไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ใด ๆ ในชุดการทดสอบของเชื้อทุกไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในระบบการทดสอบ

ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MFC พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลทุกไอโซเลทใกล้เคียงกัน โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.31-1.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (0.031-0.125 %V/V) และมีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.63-2.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (0.063-0.25 %V/V) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาวมีค่าไม่แตกต่างกัน (ไม่เกิน 4 เท่า) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแบบฆ่าเชื้อรา (fungicidal effect) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ทดสอบด้วยพืชในสกุลเดียวกัน เช่น Lohakachornpan P. และ Rangsipanuratn W. พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวจาก *M. leucadendron* Linn. ที่มีองค์ประกอบหลักเป็น Terpinolene (ร้อยละ 29.21), alpha-Terpinene (ร้อยละ 22.55), gamma-Carene (ร้อยละ 8.53) และ alpha-Phellandrene (ร้อยละ 7.61) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.63 %V/V (136) Mondello F. และคณะ พบว่าน้ำมันทีทรีจาก *M. alternifolia* ที่มีองค์ประกอบหลักเป็น Terpinen-4-ol (ร้อยละ 42.35), gamma-Terpinene (ร้อยละ 20.65) และ alpha-Terpinene (ร้อยละ 9.76) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25-0.5 %V/V (137) และ Agarwal V. และคณะ พบว่าน้ำมันทีทรีจาก *M. alternifolia* แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.73 และ 0.86 %V/V ตามลำดับ (134) จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลเดียวกันอาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบหลักทางเคมี ซึ่งน้ำมันเสม็ดขาวในการศึกษานี้ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 6 ชนิด ได้แก่ 1,8-Naphthyrindine derivatives, alpha-Pyrone, Terpinolene, gamma-Terpinene, trans-Caryophyllene และ beta-Elementene ที่อาจพบปริมาณน้อยหรือไม่พบในน้ำมันเสม็ดขาวจากการศึกษาอื่น แต่มีรายงานการศึกษาพบว่า 1,8-Naphthyrindine derivatives เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ *Cryptococcus neoformans* เนื่องจากมีสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ทำให้สามารถแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์และทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity) ได้ (118) เช่นเดียวกับ trans-Caryophyllene ที่มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อราชนิดละลายได้ดีในไขมัน (121) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันทีทรีจาก *M. alternifolia* และสาร Terpinen-4-ol พบว่าน้ำมันทีทรี

ที่ประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดสามารถลดการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้ดีกว่า สารบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว (138) จึงสันนิษฐานได้ว่าฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันเสม็ดขาวอาจเกิดจากการทำงานขององค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดร่วมกัน และสารสำคัญเหล่านี้อาจมีกลไกการออกฤทธิ์ หลากหลายที่อาจเสริมฤทธิ์ของยาฟลูโคนาโซลได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันเสม็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อ เชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีรูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ ติดต่อยาต่างกัน โดยวิธี Checkerboard microdilution ผลการทดสอบในชุดควบคุมคุณภาพของ ระบบการทดสอบ ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและทดสอบด้วยยาฟลูโคนาโซล พบว่ายาฟลูโคนาโซล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน โดยมีค่า MIC_{FLC} เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด คือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าระบบการทดสอบข้างต้นมีความน่าเชื่อถือและสามารถอ่านผลการทดลองได้ สำหรับ ชุดควบคุมการเจริญหรือชุดควบคุมสารละลาย พบว่าเชื้อทดสอบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลาย 1% DMSO แสดงให้เห็นว่าสารละลาย DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย สารทดสอบไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบและฤทธิ์ต้านเชื้อราเกิดจากฤทธิ์ของสารทดสอบจริง และชุดควบคุมภาวะปลอดเชื้อ พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ ในชุดการทดสอบของเชื้อ ทุกไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในระบบการทดสอบ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ร่วมกัน พบว่าน้ำมันเสม็ดขาวและยาฟลูโคนาโซล มีการทำงานแบบเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ S7/1, U6/2 (ตรวจพบยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11*) และ U15/1 (ตรวจพบยีน *CDR1*, *MDR1* และ *ERG11*) โดยค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาว จะลดลงประมาณ 8-64 และ 8-16 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhang J. และคณะ ที่พบว่า น้ำมันเสม็ดขาวจาก *M. leucadendra* และยาฟลูโคนาโซลมีการทำงานแบบเสริมฤทธิ์ร่วมกันในการ ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* โดยค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาวจะลดลง 4 และ 10 เท่า ตามลำดับ (139) จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยาฟลูโคนาโซลดีขึ้นเมื่อใช้งานร่วมกับ น้ำมันเสม็ดขาว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันเสม็ดขาวช่วยเสริมกลไกการ ทำงานของยาฟลูโคนาโซล โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายเดียวกับยา คือ ยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ 14 α -demethylase ที่ถอดรหัสโดยยีน *ERG11* ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการ

ขีดขวางกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อราเพิ่มมากขึ้น หรืออาจมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อกลุ่มโปรตีนขนส่งบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น Cdr1, Cdr2 และ Mdr1 ซึ่งเสริมให้ยาทำงานได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ U8/1 (ตรวจพบยีน *MDR1* และ *ERG11*) และ U19/1 (ตรวจพบเฉพาะยีน *ERG11*) และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล พบว่าน้ำมันเมล็ดข้าวและยาฟลูโคนาโซล ออกฤทธิ์ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว

จากการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์และชีวโมเลกุล พบว่ากลไกการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารต้านจุลชีพ แบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ 1) การเสริมฤทธิ์กันโดยมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์หลายตำแหน่ง เช่น บริเวณเอนไซม์, ซับสเตรต (substrates), สารเมแทบอไลต์ (metabolites), ตัวรับต่าง ๆ (receptors), ช่องไอออนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (ion channels), โปรตีนขนส่ง (transport proteins), DNA/RNA, ไรโบโซม (ribosomes) หรือกลไกทางเคมีเชิงฟิสิกส์อื่น ๆ 2) ผลทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ โดยเพิ่มการละลาย อัตราการดูดซึม และเพิ่มชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (bioavailability) 3) ออกฤทธิ์โดยตรงกับกลไกการดื้อยาของจุลชีพ และ 4) ช่วยกำจัดหรือช่วยลดผลข้างเคียงของยา (140) ดังนั้น องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเมล็ดข้าวในการศึกษานี้ อาจมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์หลากหลายที่เสริมให้ยาฟลูโคนาโซลทำงานดีขึ้นได้ ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าน้ำมันเมล็ดข้าวจาก *M. leucadendra* ทำให้ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์เจริญเข้าไปในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และเกิดโครงสร้าง mesosome-like structures ที่ทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ในเชื้อ *C. albicans* ได้ (139) และพบว่าสาร 1,8-Naphthyridine derivatives ที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันเมล็ดข้าวในการศึกษานี้ สามารถแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์และทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ในเชื้อ *C. albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ได้ (118) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารกลุ่ม monoterpenes ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในน้ำมันเมล็ดข้าว สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *MDR1* ใน *Candida* spp. สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลได้ (141) ดังนั้นจึงมีการทดสอบผลกระทบของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลต่อไป

จากการศึกษาผลกระทบของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีรูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต่างกัน โดยใช้เทคนิค qRT-PCR และวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณสัมพันธ์ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ของ Applied Biosystems (110) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ

ยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิง แล้วแสดงผลเป็นสัดส่วนความเปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ น้ำมันเมล็ดข้าวและกลุ่มทดสอบที่ได้รับน้ำมันเมล็ดข้าว สำหรับการตรวจสอบยืนยันผลผลิต PCR ของ ยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่ได้จากปฏิกิริยา qRT-PCR ด้วยวิธีการวิเคราะห์ melting curve พบว่าผลผลิต PCR ของยีนแต่ละชนิดมีลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature, Tm) เฉพาะตัวแตกต่างกันและเกิดเป็น peak เดียวที่อุณหภูมิสูง แสดงให้เห็นว่าผลผลิต PCR ที่ได้เป็นของยีนที่ต้องการจริง รวมทั้งไพรเมอร์ที่ใช้ในแต่ละปฏิกิริยามีความเหมาะสมและมีความจำเพาะสูง เนื่องจากไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอมจากผลผลิตที่ไม่จำเพาะ (non-specific products) หรือการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimers) ซึ่งจะให้ peak ขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำ

ผลการทดสอบ พบว่าน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC มีประสิทธิภาพในการลดระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) และยังสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ได้ แต่ระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* และ *ERG11* มีแนวโน้มลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดข้าวที่เพิ่มขึ้น แต่พบว่าน้ำมันเมล็ดข้าวไม่สามารถลดการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลได้ โดยระดับการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้พบว่ายีนเป้าหมายแต่ละชนิดอาจมีระยะเวลาสัมผัสสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ ในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มทดสอบจะได้รับการทดสอบด้วยน้ำมันเมล็ดข้าวเป็นระยะเวลา 90 นาที เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ricardo E. และคณะ (17) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ของน้ำมันเมล็ดข้าวหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชสายพันธุ์อื่นในวงศ์เดียวกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานผลกระทบของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าวเป็นครั้งแรก

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากพืชชนิดอื่น เช่น Khajeh E. และคณะ พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก *Echinophora platyloba* ที่ระดับค่า MIC (64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถลดการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ (142) และ Aslani P. และคณะ พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก *E. platyloba* ที่ระดับค่า MIC (64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สามารถลดการแสดงออกของยีน *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ แต่ไม่สามารถลดการแสดงออกของยีน *MDR1* ได้ (143) แสดงให้เห็นถึงผลกระทบต่อยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่แตกต่างจาก ผลการศึกษาอื่น อาจเนื่องมาจากชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน และมีรายงานการศึกษาพบว่า สารกลุ่ม Monoterpenes 2 ชนิด ได้แก่ Thymol และ Carvacrol แสดงฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CDR1* และ *MDR1* ในเชื้อ *Candida* spp. สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล (141) จึงสันนิษฐานได้ว่าองค์ประกอบหลักของน้ำมันเสม็ดขาวในการศึกษานี้ที่เป็นสารกลุ่ม Monoterpenes ได้แก่ Terpinolene และ gamma-Terpinene อาจเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญต่อการแสดงออกของยีน *MDR1* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล และยังมีรายงานการศึกษาว่าการยับยั้งการทำงานของยีน *MDR1* ในเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จะทำให้เชื้อมีความไวต่อยาต้านเชื้อราหลายชนิดเพิ่มขึ้น (144) ดังนั้น การใช้น้ำมันเสม็ดขาวจึงส่งผลให้เชื้อดื้อยา กลับมาไวต่อยาฟลูโคนาโซลอีกครั้ง และทำให้การรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันเสม็ดขาวที่เกิดจากการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส (transcription) โดยการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* และพบว่าสามารถลดระดับ mRNA ของยีน *MDR1* และ *ERG11* ได้ ซึ่งน้ำมันเสม็ดขาวอาจมีกลไกการออกฤทธิ์โดยควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (translation) เพื่อสังเคราะห์โปรตีนชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา หรือมีการออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งอื่น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันเสม็ดขาวที่ครอบคลุมและชัดเจนมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษาความปลอดภัยและความเป็นพิษของการใช้น้ำมันที่ทรีจาก *M. alternifolia* ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับเสม็ดขาว พบว่าน้ำมันที่ทรีถูกนำมาใช้ในรูปแบบของยาแผนโบราณเพื่อรักษาภาวะติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกชนิดต่าง ๆ ที่หลากหลาย โดยมีค่าระดับความเป็นพิษต่อร่างกายของมนุษย์ (median lethal dose, LD₅₀) เท่ากับ 1.9-2.6 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายของมนุษย์ได้เมื่อกลิ้งกินในปริมาณสูง แต่จะไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้หรือการระคายเคืองต่อผิวหนังเมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม (145) ดังนั้น จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเชิงลึก หรือการต่อยอดผลงานวิจัยสู่เชิงพาณิชย์ เพื่อนำน้ำมันเสม็ดขาวมาใช้ทดแทนหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเดิมที่ใช้ไม่ได้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดา และนำไปสู่การแก้ปัญหาเชื้อดื้อยาต้านเชื้อราอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 น้ำมันเสม็ดขาวที่สกัดได้จากใบและกิ่งอ่อนของ *M. cajuputi* Powell ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในการศึกษานี้ ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญหลายชนิดที่อาจแตกต่างจากพื้นที่อื่น ซึ่งสารสำคัญแต่ละชนิดอาจมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันได้ จึงควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกลไกการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด เพื่อประโยชน์ในการออกแบบสารต้านเชื้อราชนิดใหม่ทดแทนยาต้นแบบหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเดิมที่ใช้ไม่ได้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อราแคนดิดาได้

5.3.2 งานวิจัยนี้เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันเสม็ดขาวที่เกิดจากการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในระดับการถอดรหัสเท่านั้น ซึ่งน้ำมันเสม็ดขาวอาจมีกลไกการออกฤทธิ์โดยควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา หรือมีการออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งอื่น จึงควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เพิ่มเติม เพื่อทราบประสิทธิภาพของน้ำมันเสม็ดขาวที่ชัดเจนและครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

5.3.3 เนื่องด้วยข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันเสม็ดขาวจาก *M. cajuputi* Powell มีอยู่อย่างจำกัดและอาจไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงปริมาณที่เหมาะสมและปลอดภัยได้ จึงควรมีการศึกษาความเป็นพิษในเซลล์ของสัตว์ทดลองก่อนนำไปใช้กับมนุษย์

5.3.4 ด้วยข้อจำกัดของยาด้านเชื้อราในปัจจุบัน ที่มีราคาแพงและมีผลข้างเคียงจากการใช้ในปริมาณสูง ดังนั้น การพัฒนาต่อยอดการวิจัยทางคลินิกเชิงลึกเพื่อพัฒนาน้ำมันเสม็ดขาวเป็นสารต้านเชื้อราชนิดใหม่ อาจทำให้อัตราการใช้ยาด้านเชื้อราลดลง ผู้ป่วยมีโอกาสเข้าถึงสารต้านเชื้อราที่มีคุณภาพและประสิทธิผลในการรักษาเท่าเทียมกับยาต้นแบบได้เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งสามารถลดภาระค่าใช้จ่ายด้านยาของระบบสาธารณสุขของประเทศไทยได้

5.3.5 การต่อยอดผลงานวิจัยน้ำมันเสม็ดขาวสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ เช่น การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันเสม็ดขาวเพื่อบำบัด รักษา หรือบรรเทาอาการของโรคติดเชื้อรา รวมถึงผลิตภัณฑ์เพื่อความงามและการดูแลรักษาผิว ที่จะทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากต้นเสม็ดขาวในพื้นที่ป่าชุมชนได้อย่างคุ้มค่า และนำไปสู่การพัฒนาชุมชนท้องถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออย่างยั่งยืนสืบต่อไป

บรรณานุกรม

1. Uppuluri P, Khan A, Edwards J. Current trends in Candidiasis. In: R P, editor. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Springer International Publishing AG; 2017.*
2. ยงค์ รงค์รุ่งเรือง. โรคติดเชื้อสำ *Candida* (Candidiasis). In: พรรณทิพย์ ฉายากุล, editor. ตำราโรคติดเชื้อ 2. กรุงเทพฯ: สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย; 2548. p. 778-88.
3. Kadosh D. Morphogenesis in *C. albicans*. In: Prasad R, editor. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Springer International Publishing AG; 2017.*
4. โศภิต คันธวงค์. โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแคนดิดา. จุลสารจุลชีวะวิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2559(8):33-4.
5. Pappas P, Kauffman C, Andes D, Clancy C, Marr K, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62:e1-50.
6. วันทิน ศรีเบญจลักษณ์, อธิบดี มีสิงห์. โรคติดเชื้อแคนดิดาชนิดบูกรุก : ทางเลือกของยาที่ใช้ในการรักษา. วารสารอายุรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2559;2(4):6-13.
7. Tan B, Chakrabarti A, Li R, Patel A, Watcharananan S, Liu Z, et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(10):946-53.
8. Ling M, Apisarnthanarak A, Madriaga G. The burden of healthcare-associated infections in Southeast Asia: a systematic literature review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60:1690-9.
9. Leeyaphan C, Bunyaratavej S, Foongladda S, Rujitharanawong C, Maneeprasopchoke P, Surawan T, et al. Epidemiology, clinical characteristics, sites of infection and treatment outcomes of mucocutaneous Candidiasis caused by non-albicans species of *Candida* at a dermatologic clinic. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2016;99(4):406-11.
10. สานิตย์ คำวัง, สุชาติ ศิริใจชิงกุล, ศรีวีไล วโรภาสตระกูล, วิญญู วงศ์ประทุม, วรางค์รัตน์ เอกอนันต์กุล. การประเมินการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อรา *Candida albicans* ในช่องคลอดด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟี ในโรงพยาบาลน่าน. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด.

- 2555;24(2):128-34.
11. ประนอม บุพศิริ. การอักเสบของช่องคลอดซ้ำซากจากเชื้อรา. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2549;21(3):246-8.
 12. ทราญ ทศเกตุ, อริยา จินตามพร , กรวรรณ จักกะพาก , พรเพ็ญ อัครวัชรางกูร. ความชุกของโรคติดเชื้อราที่เล็บเท้าในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 : การศึกษาในแผนกผู้ป่วยนอกและเวชปฏิบัติทั่วไป โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา พ.ศ.2557. วารสารโรคผิวหนัง. 2557;30(3):159-74.
 13. เอมอร ชัยประทีป. เม็ดสอดช่องคลอดจากสารสกัดกระเทียมและชาเพื่อบรรเทาอาการติดเชื้อแคนดิดา. Thailand tech show 2017. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2560. p. 131.
 14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. US: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2019.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts (CLSI supplement M60). 1st, editor. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
 16. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. International Journal of Microbiology. 2012;2012:1-26.
 17. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of *CDR* genes. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research. 2009;9:618-25.
 18. Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(5):2085-93.
 19. Ariana N, Nazemi A, Nasrollahi Omran A. Using PCR to compare the expression of *CDR1*, *CDR2*, and *MDR1* in *Candida Albicans* isolates resistant and susceptible to fluconazole. Medical Laboratory Journal. 2015;9(4):33-7.
 20. Golabek K, Strzelczyk JK, Owczarek A, Cuber P, Slempl-Migiel A, Wiczkowski A. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs.

- Acta Biochimica Polonica. 2015;62(2):247-51.
21. Khosravi RK, Falahati M, Roudbary M, Farahyar S, Nami S. Overexpression of *MDR-1* and *CDR-2* genes in fluconazole resistance of *Candida albicans* isolated from patients with vulvovaginal candidiasis. *Current Medical Mycology*. 2016;2(4):24-9.
 22. Chen L, Xu Y, Zhou C, Zhao J, Li C, Wang R. Overexpression of *CDR1* and *CDR2* genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *The Journal of International Medical Research*. 2010;38(2):536-45.
 23. Armaki MT, Yadegari MH, Bazl MR, Farahbakhsh E, Katiraei F. Over expression of efflux pumps genes in resistant *Candida albicans* clinical isolated from oral colonization in Iranian HIV-positive patients. *International Journal of Development Research*. 2014;4(9):1970-7.
 24. Watamoto T, Samaranayake LP, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. *Journal of Medical Microbiology*. 2011;60:1241-7.
 25. Perea S, Lopez-Ribot J, Kirkpatrick W, McAtee R, Santillan R, Martinez M, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(10):2676-84.
 26. Tsao S, Rahkhoodae F, Raymond M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53:1344-52.
 27. กระทรวงสาธารณสุขและองค์การภาครัฐ-เอกชน. แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564. 2559. จำนวน 200 หน้า p.
 28. ประสาทพร บริสุทธิ์ไพฑูริย์ พกแพ, editor การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข ครั้งที่ 9 สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้; 2551; ขอนแก่น: คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
 29. ศูนย์ศึกษาและพัฒนานวนศาสตร์ชุมชนที่ 2 จังหวัดสระแก้ว. การใช้ประโยชน์จากเสม็ดขาว: สำนักจัดการป่าชุมชน กรมป่าไม้; 2551.
 30. Brophy JJ, Thubthimthed S, Kitirattrakarn T, Anantachoke C. Volatile leaf oil of

- Melaleuca cajuputi*. the Forestry Conference 2002; Bangkok, Thailand: The Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources and Environment; 2002. p. 304-13.
31. รุ่งระวี เต็มฤกษ์ศิริกุล. การพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อสรีรวิทยาการผลิตสัตว์และสุขภาพของมวลมนุษย์. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2544.
 32. นิภา เบญจพงศ์. แผลงกับสมุนไพร. วารสารองค์การเภสัชกรรม. 2539;22(3):35-42.
 33. Bharat CS, Praveen D. Evaluation of in vitro antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. International Journal of Green Pharmacy. 2016;10(1):27-32.
 34. Gow NA, Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. Microbiology. 2017;163:1145-47.
 35. Refai M, El-Enbaawy M, Hassan A. Monograph on *Candida albicans*: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University; 2015.
 36. Thompson D, Carlisle P, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryotic Cell. 2011;10(9):1173-82.
 37. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends in Microbiology. 2004;12(7):317-24.
 38. Mayer F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.
 39. Murciano C, Moyes D, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer L, et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. PLoS One. 2012;7(3):e33362.
 40. Wachtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during Interaction with oral epithelial cells. PLoS One. 2011;6(2):e17046.
 41. Wachtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Forster S, Dalle F, Schaller M. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. PLoS One. 2012;7:e36952.
 42. Fanning S, Mitchell A. Fungal biofilms. PLoS Pathogen. 2012;8(4):e1002585.
 43. Cole G, Halawa A, Anaissie E. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from laboratory to the bedside. Clinical Infectious

- Diseases. 1996;22(2):S73-S88.
44. Campbell J, Zaccaria E, Baker C. Systemic candidiasis in extremely low birth weight infants receiving topical petrolatum ointment for skin care: a case control study. *Ped.* 2000;105:100-5.
 45. De Antonio D, Violante B, Mazzone A. A nosocomial cluster of *Candida* infections in patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998;36:792-5.
 46. Stappers MH, Brown GD. Host immune responses during infections with *Candida albicans*. In: Prasad R, editor. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*: Springer International Publishing AG; 2017.
 47. จรัสศรี พียาพรรณ. การติดเชื้อแคนดิดาที่ผิวหนังและเยื่อหู [อินเทอร์เน็ต] กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2560 [Available from: <http://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=1029>].
 48. Kalra MG, Higgins KE, Kinney BS. Intertrigo and secondary skin infections. *American Family Physician.* 2014;89(7):569-73.
 49. Reich D, Psomadakis CE, Buka B. Interdigital Candidiasis. *Top 50 Dermatology Case Studies for Primary Care*: Springer International Publishing Switzerland; 2017. p. 67-72.
 50. Bahunuthula RK, Thappa DM, Kumari R, Singh R, Munisamy M, Parija SC. Evaluation of role of *Candida* in patients with chronic paronychia. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.* 2015;81(5):485-90.
 51. Karsani AHA, Azolaibani A, Farouq Y, Zedan K, Alotaibi MM, Bin Saif G, et al. *Candida albicans* and napkin dermatitis: relationship and lesion severity correlation. *Sudan Journal of Medical Sciences.* 2017;12(3):174-86.
 52. Parkarwar CR, Mohammed Qadri S, Mohd Ziauddin S, Zaidi N, Kale L, Pansambal VL, et al. Oral Candidiasis: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical.* 2017;6(3):975-85.
 53. Choi JH, Lee CG, Lim YJ, Kang HW, Lim CY, Choi J-S. Prevalence and risk factors of esophageal Candidiasis in healthy individuals: a single center experience in Korea. *Yonsei Medical Journal.* 2013;54(1):160-5.
 54. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรคติดเชื้อแคนดิดา (Candidiasis). วารสารกรมการแพทย์.

2558(ฉบับประจำเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม):41-2.

55. Bassetti M, Marchetti M, Chakrabarti A, Colizza S, Garnacho-Montero J, Kett D, et al. A research agenda on the management of intra-abdominal candidiasis: results from a consensus of multinational experts. *Intensive Care Medicine*. 2013;39:2092-106.
56. Dupont H, Paugam-Burtz C, Muller-Serieys C, Fierobe L, Chosidow D, Marmuse J-P, et al. Predictive factors of mortality due to polymicrobial peritonitis with *Candida* isolation in peritoneal fluid in critically ill patients. *Archives of Surgery - Journals*. 2002;137:1341-6.
57. Martin J, Hamilton B, Osterman M, Curtin S, Matthews T. Births: final data for 2013. *National Vital Statistics Reports - Journals*. 2015;64:1-65.
58. Leibovitz E, Livshiz-Riven I, Borer A, Taraboulos-Klein T, Zamir O, Shany E, et al. A prospective study of the patterns and dynamics of colonization with *Candida* spp. in very low birth weight neonates. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2013;45:842-8.
59. Violaris K, Carbone T, Bateman D, Olawepo O, Doraiswamy B, Lacorte M. Comparison of fluconazole and nystatin oral suspensions for prophylaxis of systemic fungal infection in very low birthweight infants. *American Journal of Perinatology*. 2010;27:73-8.
60. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche H, Quan S, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R) registry, 2004–2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;74:323-31.
61. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;73:45-8.
62. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TCW. Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*. 2012;4(165):165rv13.
63. Hoffmann-Santos H, Paula C, Yamamoto A, Tadano T, Hahn R. Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. *Mycopathologia*. 2013;176:409-15.

64. เฉลิมเกียรติ สงคราม. ยาต้านเชื้อรา. In: โอลภา วัชรคุปต์, editor. เคมีของยา ฉบับ 1. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พรีนซ์; 2551.
65. โอฟาริก อະสุพล. ยาต้านเชื้อรา. วารสารเภสัชกรรมโรงพยาบาล. 2554;21(2):168-74.
66. Hatipoglu N, Hatipoglu H. Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children and adults. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2013;11:523-35.
67. Stevens D. Advances in systemic antifungal therapy. Clinics in Dermatology. 2012;30:657-61.
68. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now. Intensive Care Medicine. 2014;40(9):1241-55.
69. ศิริลักษณ์ อนันต์รัฐศิริ ABAในอ, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร และ ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, บก. ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 2. กรุงเทพฯ: ตรีเทพบุ๊คโพรเซส, 2558: 390-413. Amphotericin B: antifungus. In: นลินี อัครโภคี, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร, ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, editors. ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 2. กรุงเทพฯ: ตรีเทพบุ๊คโพรเซส; 2558. p. 390-413.
70. พอพล โรจนพันธ์. Fluconazole, itraconazole. In: นลินี อัครโภคี, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร, ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, editors. ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 2. กรุงเทพฯ: ตรีเทพบุ๊คโพรเซส; 2558. p. 344-72.
71. มาเรีย นิโน จิตะสมบัติ. New triazoles: voriconazole, posaconazole. In: นลินี อัครโภคี, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร, ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, editors. ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 2. กรุงเทพฯ: ตรีเทพบุ๊คโพรเซส; 2558. p. 373-89.
72. เมธี ชยะกุลศิริ. Echinocandins. In: นลินี อัครโภคี, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร, ธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ, editors. ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 2. กรุงเทพฯ: ตรีเทพบุ๊คโพรเซส; 2558. p. 438-58.
73. Kaur I, Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents. Expert Opinion on Drug Delivery. 2010;7:1303-27.
74. Pornpan P, Witawat T, Natthanej L. Medical Mycology. Journal of Medicine and Health Sciences. 2013;20(2):31-44.
75. บงกชวรรณ สุตะพาหะ. การตรวจพิสูจน์เชื้อราก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ. 2 พ, editor. เชียงใหม่: หจก. ดาราวรรณการพิมพ์; 2551.
76. Pinjon E, Moran G, Coleman D, Sullivan D. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. Biochemical Society Transactions. 2005;33(5):1210-4.

77. Sanglard D, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*. 1997;143(2):405-16.
78. Lamping E, Monk B, Niimi K, Holmes A, Tsao S, Tanabe K, et al. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 2007;6:1150-65.
79. Tanabe K, Lamping E, Nagi M, Okawada A, Holmes A, Miyazaki Y, et al. Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. *Molecular Microbiology*. 2011;82:416-33.
80. Maebashi K, Niimi M, Kudoh M, Fischer F, Makimura K, Niimi K, et al. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. 2001;47:527-36.
81. Nakamura K, Niimi M, Niimi K, Holmes AR, Yates JE, Decottignies A, et al. Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(12):3366-74.
82. Coste A, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2* eukaryotic cell. 2004;3(6):1639-52.
83. De Deken X, Raymond M. Constitutive activation of the *PDR16* promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(7):2700-3.
84. Karababa M, Coste A, Rognon B, Bille J, Sanglard D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strain exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(8):3064-79.
85. Prasad R, Sharma M, Kaur Rawal M. Functionally relevant residues of Cdr1p: a multidrug ABC transporter of human pathogenic *Candida albicans*. *Journal of Amino Acids*. 2011;2011:1-12.
86. Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, et al. MFS

- transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. BMC Genomics. 2008;9(579):1-12.
87. Morschhauser J, Barker K, Liu T, Bla-Warmuth J, Homayouni R, Rogers P. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. PLoS Pathogens. 2007;3(11):1603-16.
 88. Sanglard D, Coste A. Activity of isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015;60:229-38.
 89. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2010;66(4):373-84.
 90. Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. Infection and Drug Resistance. 2017;10:237-45.
 91. Akins R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. Medical Mycology. 2005;43(4):285-318.
 92. นิจศิริ เรื่องรังสี, ธวัชชัย มังคละคุปต์. เสมีด (Samet). สมุนไพรไทย เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บี เฮลท์ ตี; 2547.
 93. จำลอง เพ็งคล้าย, ขวลิต นิยมธรรม, วิวัฒน์ เอื้อจิรกาล. พรรณไม้ป่าพรุ จังหวัดนราธิวาส โดยโครงการศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดนราธิวาส. กรุงเทพฯ: ส. สมบูรณ์การพิมพ์; 2534.
 94. เสมีดขาว [ออนไลน์] [Internet]. 2561 [cited 15 พฤษภาคม 2561]. Available from: <http://www.rspg.or.th/>.
 95. กองการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวิชาการ “สุคนธบำบัด”. กรุงเทพฯ: สำนักกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2550.
 96. Barbosa LCA, Silva CJ, Teixeira RR, Meira RMSA, Pinheiro AL. Chemistry and biological activities of essential oils from *Melaleuca L. Species*. Agriculturae Conspectus Scientificus. 2013;78(1):11-23.
 97. British Standards Institution [BSI]. BS ISO 4730:2017+A1:2018 Essential oil of

- Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil). London, UK: BSI Group; 2018.
98. Lee CJ, Chen LW, Chen LG, Chang TL, Huang CW, Huang MC, et al. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2013;21:169-76.
 99. Brophy JJ, Boland DJ, Lassak EV. Leaf essential oils of *Melaleuca* and *Leptospermum* species from Tropical Australia. *Tree for the Tropics: Growing Australia Multipurpose Trees and Shrubs in Developing Countries: Australian Centre for International Agricultural Research*; 1989. p. 193-203.
 100. Moore D, Dowhan D. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2002;59(1):1-10.
 101. Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(6):1634-41.
 102. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 103. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
 104. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
 105. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Zone Diameter Interpretive Standards, Corresponding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Breakpoints, and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI supplement M44-S3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
 106. Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Minireview combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48:693-715.

107. Bassole IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 2012;17:3989-4006.
108. TRIzol Reagent User Guide [online] [Internet]. 2016 [cited 2018 May 15]. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf.
109. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit [online] [Internet]. 2016 [cited 2018 May 15]. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716_RevertAid_First_Strand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf.
110. Applied Biosystems. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Foster City, California, United States 2004. 60 pages p.
111. Petrachaianan T, Chaiyasirisuwan S, Athikomkulchai S, Sareedenchai V. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity in essential oil from Myrtaceae. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;43(1):63-8.
112. Kim JH, Liu KH, Yoon Y, Somnuwat Y, Kitirattrakarn T, Anantachoke C. Essential leaf oils from *Melaleuca cajuputi*. WOCMAP III Congress on Medicinal and Aromatic Plants - Volume 6: Traditional Medicine and Nutraceuticals 2005; Chiang Mai, Thailand 2005. p. 65-72.
113. กฤษณัยน์ เจริญจิตร, กาญจนา หริ่มเพ็ง, คารณ เลียดประถม. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการการกระจายเชิงพื้นที่ของป่าเสม็ดขาวในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทยและศักยภาพการเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่อำนวยประโยชน์ต่อชุมชนท้องถิ่น. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2560. 74 หน้า p.
114. มะลิวัลย์ หฤทัศน์านันต์, อุดมลักษณ์ สุขอัสตะ, วรณศิริ วรณรัตน์, ยุทธนา บรรจง, คณพล จุฑามณี. การสำรวจ คัดเลือกแม่ไม้ และการขยายพันธุ์ไม้ยูคาลิปตัสและเสม็ดขาวเพื่อการผลิตน้ำมันหอมระเหยในประเทศไทย: รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2559.
115. Babu KV, Kual K. Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and Fragrance Journal*. 2005;20(2):222-31.
116. โอบาร ตันทวิรุฬห์, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัสตะ, วรวิทย์ ยี่สวัสดิ์, สุดประสงค์ สุวรรณเลิศ, ประภาส ช่างเหล็ก, et al. วิธีการสกัดและองค์ประกอบของน้ำมันหอม

- ระเหยที่ทรี (*Melaleuca alternifolia*) ในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช; กรุงเทพฯ: สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2552. p. 370-7.
117. Retnosari S, Retnosari R, Asmaningrum HP. Profile of the Indonesian essential oil from *Melaleuca cajuputi*. *Advances in Engineering Research*. 2018;171:14-9.
 118. Acosta P, Butassi E, Insuasty B, Ortiz A, Abonia R, Zacchino SA. Microwave-assisted synthesis of novel pyrazolo[3,4-g][1,8]naphthyridin-5-amine with potential antifungal and antitumor activity. *Molecules*. 2015;20:8499-520.
 119. Schäberle TF. Biosynthesis of α -pyrones. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2016;12:571-88.
 120. Jiang Z, Jacob JA, Loganathachetti DS, Nainangu P, Chen B. Beta-elemene: mechanistic studies on cancer cell interaction and its chemosensitization effect. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:1-7.
 121. Pereira FG, Marquete R, Domingos LT, Rocha MEN, Ferreira-Pereira A, Mansur E. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2017;89(4):2817-24.
 122. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo VD. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*. 2017;10(4):E86 1-20.
 123. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการปฏิบัติงานแบบที่เรียบง่ายและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. กรุงเทพฯ: บริษัท พรีเมียร์ มาร์เก็ตติ้ง โซลูชั่น จำกัด; 2561.
 124. เอนก ภูทอง, อรุณี ชันติสิทธิพร, สุวรรณ โควะวินทวีวัฒน์. การจำแนกชนิดของ *Candida* ที่เพาะแยกจากสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ด้วยเทคนิค ITS PCR-RFLP. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 2555;20(3):202-10.
 125. Sandra AM, Alice BT, Otávio SS, Ricardo FC, Carlos ASF, Karen C. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41:286-94.
 126. Bergman S, Schooneveld TV, Fey P. *Candida* Inpatient Antibiogram for Nebraska Medical Center (2016-2018). *Nebraska Medicine USA*; 2019.

127. Zaidi KU, Mani A, Parmar R, Thawani V. Antifungal susceptibility pattern of *Candida Albicans* in human infections. *Open Biological Sciences Journal*. 2018;4:1-6.
128. Hitkova HY, Georgieva DS, Hristova PM, Sredkova MP. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates at a tertiary care hospital in Bulgaria. *Jundishapur J Microbiol*. 2019;12(7):e92079.
129. Monapathi ME, Bezuidenhout CC, Rhode OHJ. Efflux pumps genes of clinical origin are related to those from fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from environmental water. *Water Science & Technology*. 2018;77(4):899-908.
130. Tankhiwale S, Gajbhiye S, Powar R. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by disc diffusion and agar dilution method. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. 2012;1(4):527-31.
131. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of Tea Tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *BioMed Research International* 2015;2015(Article ID 590470):1-9.
132. El-Mashad N, Foad MF, Saady N, Salem DA. Susceptibility tests of oropharyngeal *Candida albicans* from Egyptian patients to fluconazole determined by three methods. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;2012:266-73.
133. ภัทรมาศ เรืองสวัสดิ์, จินตนา อธิติเดชารณ, เพ็ญพิชชา วนจันทร์รักษ์. อิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์. *เชียงใหม่ทันตสาร*. 2562;40(3):125-34.
134. Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Effect of plant oils on *Candida albicans*. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43(5):447-51.
135. Devkotte AN, Zore GB, Karuppayil SM. Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*. 2005;5:867-73.
136. Lohakachornpan P, Rangsiapanuratn W. Chemical compositions and antimicrobial activities of essential oil from *Melaleuca leucadendron* var. minor. *Thai J Pharm Sci*. 2001;25:133-9.
137. Mondello F, Bernardis FD, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic

- yeasts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;51:1223-9.
138. Francisoni RS, Bordini EAF, Nogueira MNM, Fontana A, Bedran TBL, Correia MF. Effect of *Melaleuca Alternifolia* and its components on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of US-China Medical Science*. 2015;12:91-8.
139. Zhang J, Wu H, Jiang D, Yang Y, Tang W, Xu K. The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* (L.) L. grown in China and its synergistic effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Natural Product Research*. 2019;33(17):2545-8.
140. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009;16:97–110.
141. Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48:80-6.
142. Khajeh E, Shokouh SJH, Rajabibazl M, Roudbary M, Rafiei S, Aslani P, et al. Antifungal effect of *Echinophora platyloba* on expression of *CDR1* and *CDR2* genes in fluconazole-resistant *Candida albicans*. *British Journal of Biomedical Science*. 2016;73(1):44–8.
143. Aslani P, Yadegari MH, Bazl MR. Investigation the effect of *Echinophora platyloba* and *Satureja bachtiarica* on *MDR1* and *ERG11* gene expression in fluconazole resistance clinical isolates *Candida albicans* using real time PCR. *European Journal of Experimental Biology*. 2014;4(1):375-9.
144. Morschhauser J. *MDR1* and its regulation. In: Prasad R, editor. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*: Springer International Publishing AG; 2017.
145. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44:616–25.

ภาคผนวก ก

เอกสารรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และ
ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ



ที่ ๑๐๒/๒๕๖๒

เอกสารรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย Sci 055/2562
โครงการวิจัยเรื่อง องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและผลกระทบของน้ำมันเมล็ดชาต่อการแสดงออกของยีนตัวยาลึก
ในเชื้อ Fluconazole-resistant *Candida albicans* ที่แยกได้จากคลินิก
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง
หน่วยงานที่สังกัด คณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาแล้วเห็นว่า
โครงการวิจัยดังกล่าวเป็นไปตามหลักการของจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยที่ผู้วิจัยเคารพสิทธิและศักดิ์ศรีในความเป็น
มนุษย์ ไม่มีการล่วงละเมิดสิทธิ สวัสดิภาพ และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวอย่างการวิจัยและผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการวิจัยที่เสนอได้ (ดูตามเอกสารตรวจสอบ)

๑. เอกสารโครงการวิจัยฉบับภาษาไทย ฉบับที่ ๑ วันที่ ๑๓ เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๒. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -
๓. เอกสารแบบแสดงความยินยอมของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -
๔. เอกสารแสดงรายละเอียดเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยซึ่งผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว หรือชุดที่ใช้เก็บข้อมูลจริง
จากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -

การรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ฉบับนี้ มีผลถึงวันที่ ๑๒ เดือน มิถุนายน
พ.ศ. ๒๕๖๓

ออกให้ ณ วันที่ ๑๓ เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๒

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิวิทส์ แจ้งเอี่ยม)

ประธานคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยบูรพา



ที่ 18/2562

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย IBC 015/2562

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

ภาษาไทย องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและผลกระทบของน้ำมันเมล็ดข้าวต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาหลักในเชื้อ fluconazole-resistant *Candida albicans* ที่แยกได้ทางคลินิก

ชื่อ - สกุล ผู้เสนอข้อเสนอการวิจัย	ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง
หน่วยงานที่สังกัด	คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยบูรพา
กระทรวง	กระทรวงศึกษาธิการ

ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ เห็นว่ามีความสอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ ตั้งแต่วันที่ออกใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัย ด้านความปลอดภัยทางชีวภาพฉบับนี้ จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2562

ออกให้ ณ วันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2562

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิหัทธ แจ้งเอี่ยม)

ประธานคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ
มหาวิทยาลัยบูรพา

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA)

ชั่งอาหาร SDA ปริมาณ 65.0 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร หลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำออกมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้อุณหภูมิ ลดลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าแห้ง จึงนำมาใช้ได้ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB)

ชั่งอาหาร SDB ปริมาณ 30.0 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร หลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Brilliance™ Candida agar (BCA)

ชั่งอาหาร BCA ปริมาณ 15.6 กรัม ต่อปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 มิลลิลิตร ลงในขวดอาหารปราศจากเชื้อ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) แล้วหลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าแห้ง จึงนำมาใช้ได้ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. อาหาร RPMI 1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose)

ชั่งอาหาร RPMI 1640 powder ปริมาณ 10.4 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมกับ MOPS ปริมาณ 34.53 กรัม (0.165M) และ glucose ปริมาณ 2.0 กรัม (0.2%) แล้วปรับ pH 7.0 ด้วยสารละลาย NaOH (6M) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองกำจัดเชื้อ (sterile filtration) ด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร จึงนำมาใช้ได้ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. อาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) (w/2% Glucose + Methylene blue)

ชั่งอาหาร MHA ปริมาณ 38.0 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร หลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยไมโครเวฟ ผสมกับ Methylene blue (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ glucose ปริมาณ 20.0 กรัม (2%) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำออกมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้อุณหภูมิลดลง ประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าแห้ง จึงนำมาใช้ได้ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. ยาฟลูโคนาโซล (fluconazole 98.0% potency)

ชั่งยาฟลูโคนาโซล ปริมาณ 13.0612 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้นเริ่มต้น 12800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากยาฟลูโคนาโซล ปริมาณ 1 มิลลิกรัม จะมีปริมาณตัวยาออกฤทธิ์อยู่ที่ 980 ไมโครกรัม

7. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 8.5 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. สารมาตรฐาน McFarland No. 0.5

ปิเปตสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และ สารละลายแบเรียมคลอไรด์ 1.175 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยต้องมีค่าอยู่ในช่วง 0.08-0.10 จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

9. สารละลาย 6M NaOH

ชั่งสาร NaOH ปริมาณ 240.0 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร หลอมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. สารละลาย 0.5M EDTA

ชั่งสาร EDTA ปริมาณ 18.612 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH 8.0 ด้วยสารละลาย 6M NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

11. สารละลาย 5X TBE buffer

ชั่งสาร Tris base ปริมาณ 54.0 กรัม และ Boric acid ปริมาณ 27.5 กรัม ผสมกับสารละลาย 0.5M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

12. ออกาโรสเจล ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ชั่งผงออกาโรส ปริมาณ 2.0 กรัม ผสมกับสารละลาย 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนได้สารละลายใส และตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงใน casting plate ที่วาง comb ไว้ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แผ่นเจลแข็งตัวและค่อย ๆ ดึง comb ออก จึงได้แผ่นออกาโรสเจลที่มีหลุมสำหรับหยดสารทดสอบ

ภาคผนวก ค

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *26SrRNA*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG11* และ *ACT1*

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *26S rRNA*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG11* และ *ACT1* ในเชื้อทดสอบ ด้วยวิธีการ binary sequencing โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลสารพันธุกรรมในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ได้ผลดังนี้

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *26S rRNA*

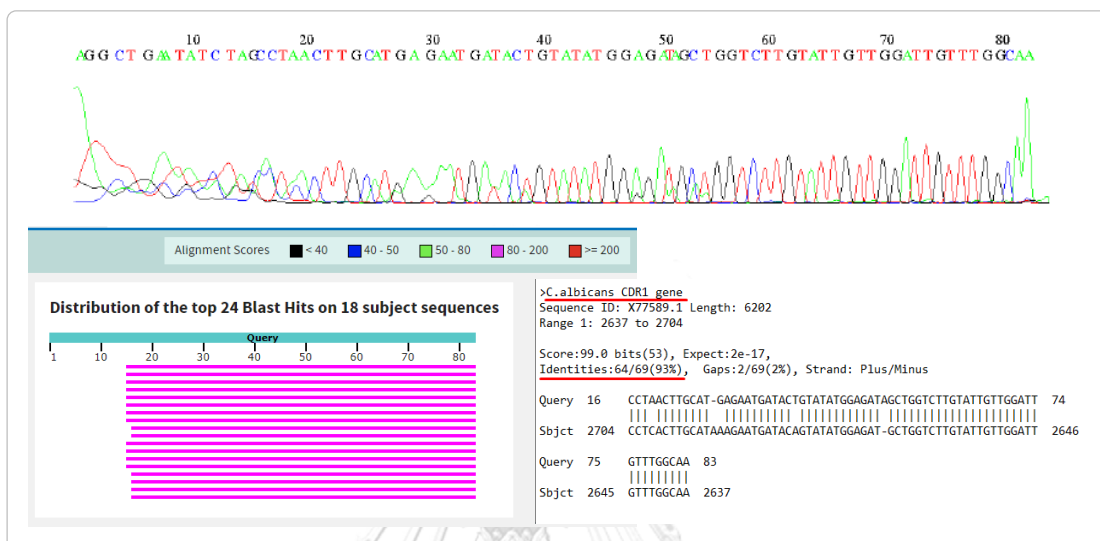
เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *26S rRNA* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* S7/1 และ *C. albicans* U6/2 มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *26S rRNA* ในเชื้อ *C. albicans* ถึงร้อยละ 99 ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ A1



ภาพที่ A1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *26S rRNA* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CDR1*

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CDR1* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* S7/1 และ *C. albicans* U6/2 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *CDR1* ในเชื้อ *C. albicans* ถึงร้อยละ 93 ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ A2



ภาพที่ A2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CDR1* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CDR2*

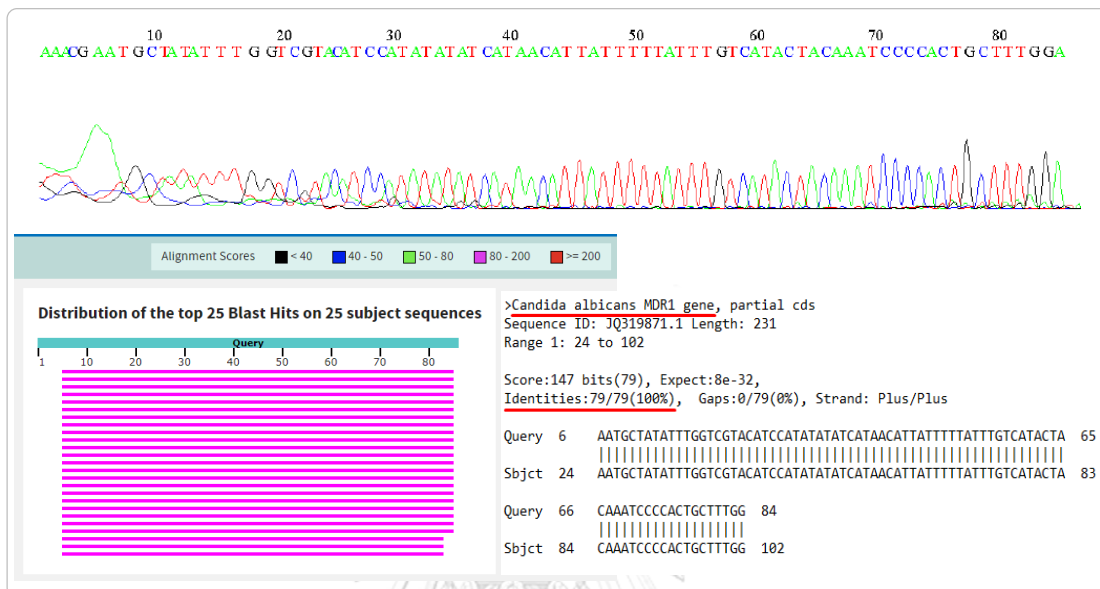
เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CDR2* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* S7/1 และ *C. albicans* U6/2 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *CDR2* ในเชื้อ *C. albicans* ถึงร้อยละ 98 ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ A3



ภาพที่ A3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CDR2* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ

4. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MDR1*

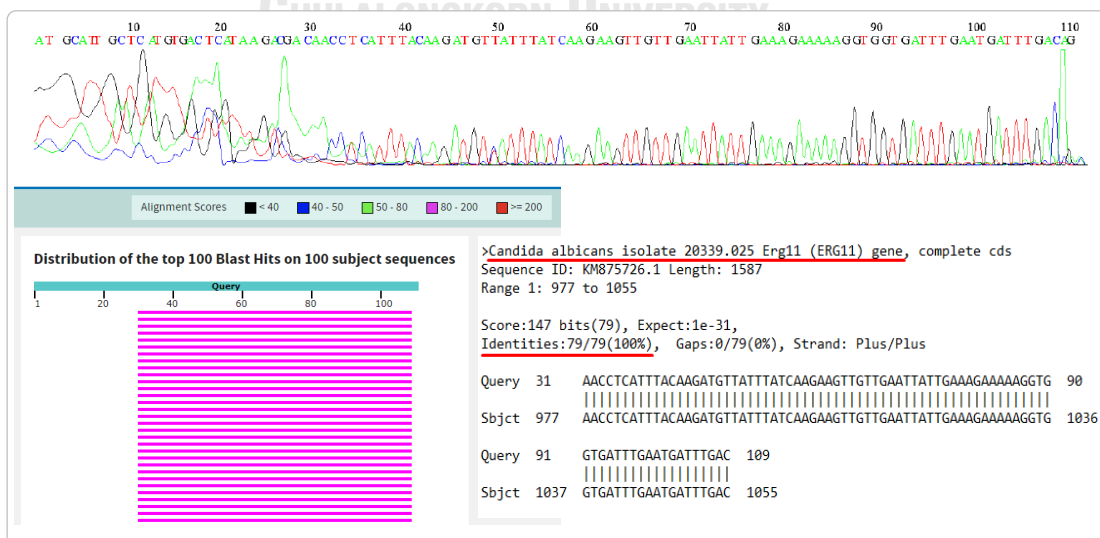
เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MDR1* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* S7/1 และ *C. albicans* U6/2 มาเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *MDR1* ในเชื้อ *C. albicans* ถึงร้อยละ 100 ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ A4



ภาพที่ A4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MDR1* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ

5. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ERG11*

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ERG11* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* S7/1 และ *C. albicans* U6/2 มาเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *ERG11* ในเชื้อ *C. albicans* ถึงร้อยละ 100 ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ A5



ภาพที่ A5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ERG11* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ

6. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACT1*

เมื่อนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACT1* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* ATCC 90028 และ *C. albicans* S7/1 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน *ACT1* ในเชื้อ *C. albicans* ถึงร้อยละ 98 ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ A6



ภาพที่ A6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACT1* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ

ภาคผนวก ง

ผลการตรวจสอบขนาดของกล้าเชื้อทดสอบ

เมื่อนำหลอดกล้าเชื้อทดสอบที่ทำการปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของสารมาตรฐาน 0.5 McFarland แล้ว (คาดว่าจะมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาตรวจสอบขนาดของกล้าเชื้อ (inoculum size) โดยวิธีการเจือจางแบบ ten-fold dilution ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-4} และปิเปตกล้าเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-4} ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหาร SDA เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารและคำนวณปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นพบว่าที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} มีเชื้อเจริญบนผิวหน้าอาหารประมาณ 10-50 โคโลนี แสดงให้เห็นว่าในหลอดกล้าเชื้อทดสอบมีกล้าเชื้อเริ่มต้นประมาณ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จริง ดังภาพที่ A7



หลอดกล้าเชื้อทดสอบ	$\approx 1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
ปิเปตมา 10 ไมโครลิตร	$\approx 1-5 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
ระดับความเจือจาง 10^{-1}	$\approx 1-5 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
ระดับความเจือจาง 10^{-2}	$\approx 1-5 \times 10^2$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ 100-500 โคโลนี
ระดับความเจือจาง 10^{-3}	$\approx 1-5 \times 10^1$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ 10-50 โคโลนี
ระดับความเจือจาง 10^{-4}	$\approx 1-5 \times 10^0$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ 1-5 โคโลนี

ภาพที่ A7 ผลการตรวจสอบขนาดกล้าเชื้อทดสอบ

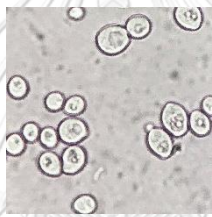


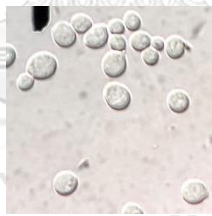


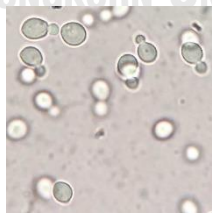

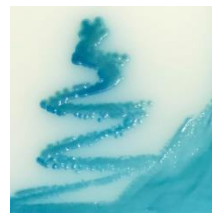
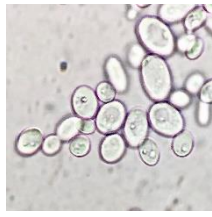

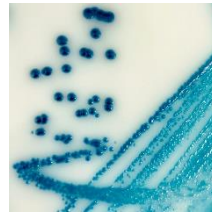
ภาคผนวก จ

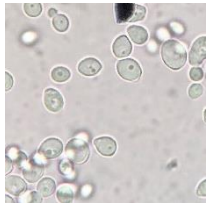


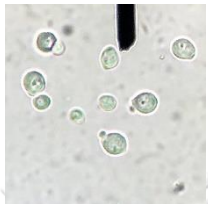


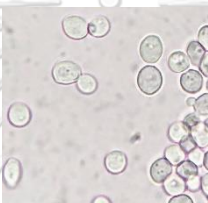


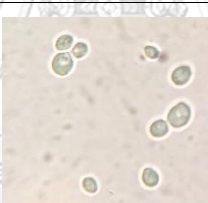


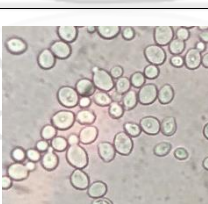



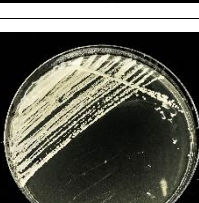

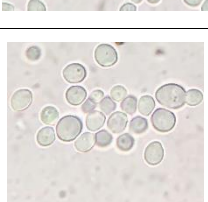

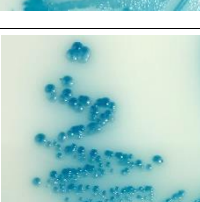
ผลการตรวจสอบชนิดของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

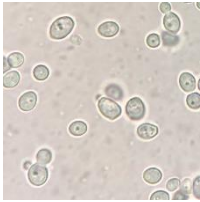


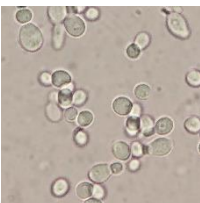


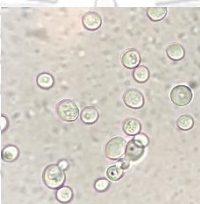

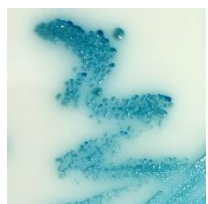
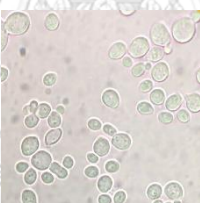




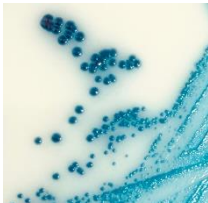
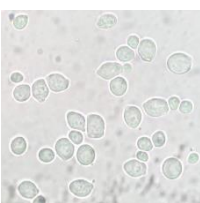


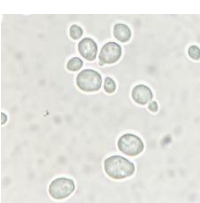


โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

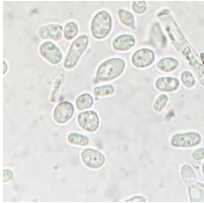


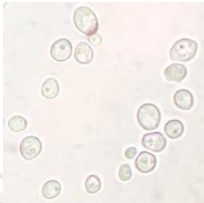




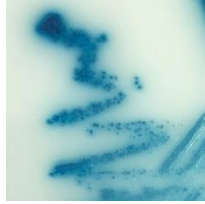
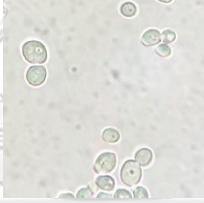


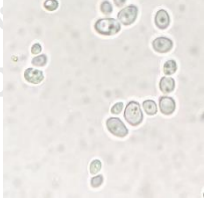

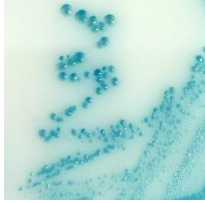
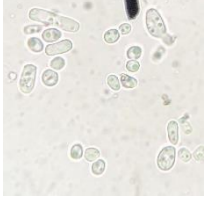

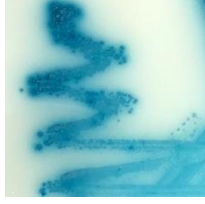



เมื่อนำเชื้อทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท และ *C. albicans* ATCC 90028 มาศึกษาลักษณะจุลสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic morphology) และลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic morphology) บนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) และอาหาร Brilliance Candida Agar (BCA) ได้ผลดังตารางที่ A1

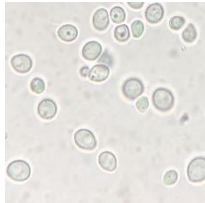

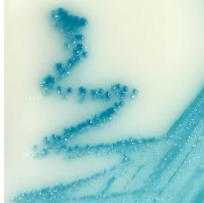
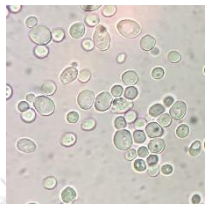


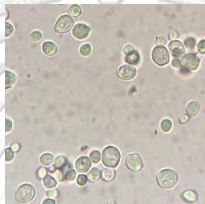


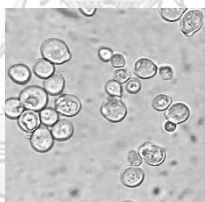


ตารางที่ A1 ผลการตรวจสอบยืนยันชนิดของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	สิ่งส่งตรวจ	ลักษณะ จุลสัณฐานวิทยา	ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า	
				SDA	BCA
1	<i>C. albicans</i> S1/1	เสมหะ			
2	<i>C. albicans</i> S2/1	เสมหะ			
3	<i>C. albicans</i> S3/1	เสมหะ			
4	<i>C. albicans</i> S5/1	เสมหะ			

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	สิ่งส่งตรวจ	ลักษณะ จุลทรรศน์วิทยา	ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า	
				SDA	BCA
5	<i>C. albicans</i> S6/1	เสมหะ			
6	<i>C. albicans</i> S7/1	เสมหะ			
7	<i>C. albicans</i> S8/1	เสมหะ			
8	<i>C. albicans</i> S9/1	เสมหะ			
9	<i>C. albicans</i> S10/1	เสมหะ			
10	<i>C. albicans</i> S14/1	เสมหะ			
11	<i>C. albicans</i> S15/1	เสมหะ			

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	สิ่งส่งตรวจ	ลักษณะ จุลทรรศน์วิทยา	ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า	
				SDA	BCA
12	<i>C. albicans</i> U2/1	ปัสสาวะ			
13	<i>C. albicans</i> U6/1	ปัสสาวะ			
14	<i>C. albicans</i> U6/2	ปัสสาวะ			
15	<i>C. albicans</i> U7/1	ปัสสาวะ			
16	<i>C. albicans</i> U8/1	ปัสสาวะ			
17	<i>C. albicans</i> U9/1	ปัสสาวะ			
18	<i>C. albicans</i> U10/1	ปัสสาวะ			

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	สิ่งส่งตรวจ	ลักษณะ จุลทรรศน์วิทยา	ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า	
				SDA	BCA
19	<i>C. albicans</i> U11/1	ปัสสาวะ			
20	<i>C. albicans</i> U15/1	ปัสสาวะ			
21	<i>C. albicans</i> U15/2	ปัสสาวะ			
22	<i>C. albicans</i> U17/1	ปัสสาวะ			
23	<i>C. albicans</i> U17/2	ปัสสาวะ			
24	<i>C. albicans</i> U19/1	ปัสสาวะ			
25	<i>C. albicans</i> U21/1	ปัสสาวะ			

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	สิ่งส่งตรวจ	ลักษณะ จุลทรรศน์วิทยา	ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า	
				SDA	BCA
26	<i>C. albicans</i> U23/1	ปัสสาวะ			
27	<i>C. albicans</i> U24/1	ปัสสาวะ			
28	<i>C. albicans</i> U25/1	ปัสสาวะ			
29	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-			

ภาคผนวก ฉ

ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

จากการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก จำนวน 28 ไอโซเลท โดยวิธี Broth microdilution ด้วยยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ A2 และภาพที่ A8-A11

ตารางที่ A2 ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิก

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				แปลผล
		1	2	3	Range	
1	<i>C. albicans</i> S1/1	2	2	2	2	S
2	<i>C. albicans</i> S2/1	0.5	0.5	0.5	0.5	S
3	<i>C. albicans</i> S3/1	2	4	2	2-4	S
4	<i>C. albicans</i> S6/1	2	2	2	2	S
5	<i>C. albicans</i> S7/1	8	8	8	8	R
6	<i>C. albicans</i> S8/1	16	16	16	16	R
7	<i>C. albicans</i> S9/1	≥64	≥64	≥64	≥64	R
8	<i>C. albicans</i> S10/1	≥64	≥64	≥64	≥64	R
9	<i>C. albicans</i> S14/1	8	8	8	8	R
10	<i>C. albicans</i> S15/1	≥64	≥64	≥64	≥64	R
11	<i>C. albicans</i> U2/1	1	2	1	1-2	S
12	<i>C. albicans</i> U6/1	≥64	≥64	≥64	≥64	R
13	<i>C. albicans</i> U6/2	≥64	≥64	≥64	≥64	R
14	<i>C. albicans</i> U7/1	≥64	≥64	≥64	≥64	R
15	<i>C. albicans</i> U8/1	16	16	16	16	R
16	<i>C. albicans</i> U9/1	0.5	0.5	0.5	0.5	S
17	<i>C. albicans</i> U10/1	0.5	0.5	0.5	0.5	S
18	<i>C. albicans</i> U11/1	16	16	16	16	R
19	<i>C. albicans</i> U15/1	≥64	≥64	≥ 64	≥64	R

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซล (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)				แปลผล
		1	2	3	Range	
20	<i>C. albicans</i> U15/2	32	32	32	32	R
21	<i>C. albicans</i> U17/1	0.5	1	0.5	0.5-1	S
22	<i>C. albicans</i> U17/2	0.5	0.5	0.5	0.5	S
23	<i>C. albicans</i> U19/1	32	32	32	32	R
24	<i>C. albicans</i> U21/1	16	16	16	16	R
25	<i>C. albicans</i> U23/1	1	1	1	1	S
26	<i>C. albicans</i> U24/1	1	1	1	1	S
27	<i>C. albicans</i> U25/1	≥64	≥64	≥64	≥64	R
28	<i>C. albicans</i> ATCC 90028 (Reference)	1	0.5	1	0.5-1	✓

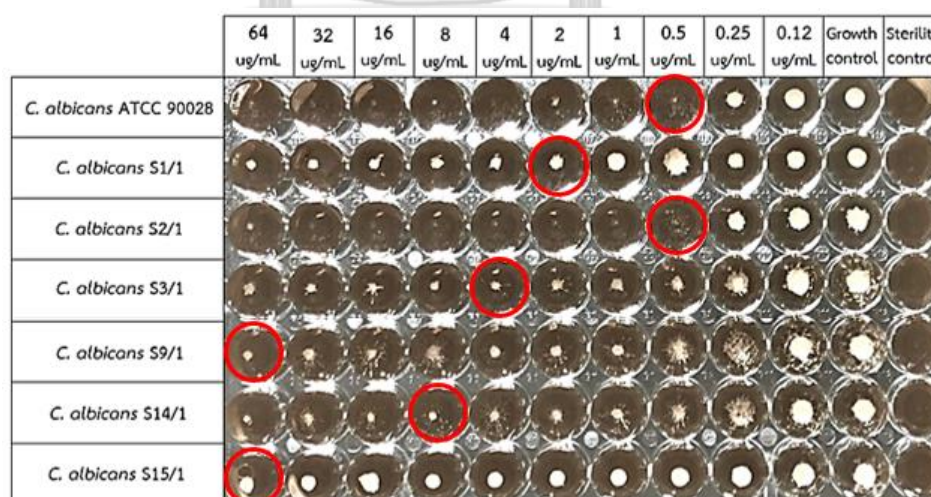
หมายเหตุ: S หมายถึง susceptible หรือเชื่อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล ($MIC_{FLC} \leq 2$)

SDD หมายถึง susceptible dose dependent หรือเชื่อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล

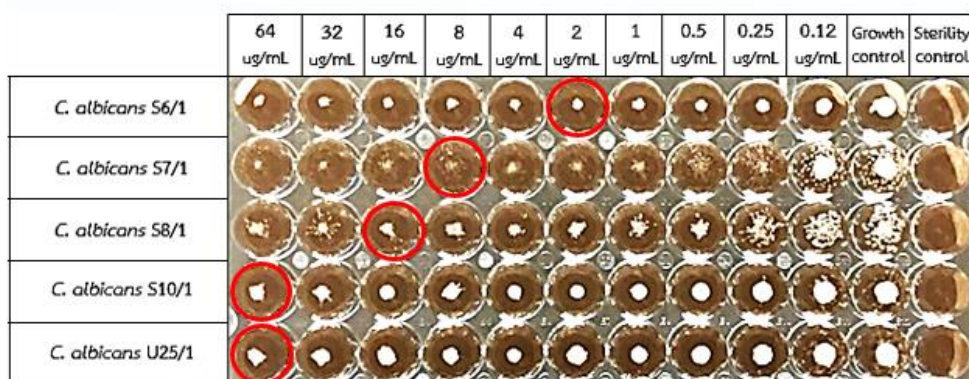
โดยขึ้นกับปริมาณยาที่ได้รับ ($MIC_{FLC} = 4$)

R หมายถึง resistant หรือเชื่อดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล ($MIC_{FLC} \geq 8$)

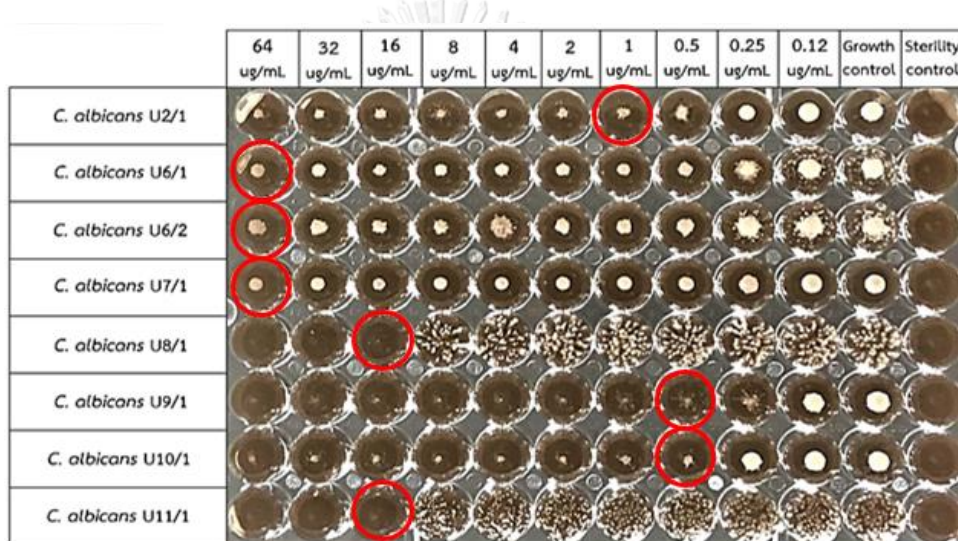
✓ หมายถึง เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด



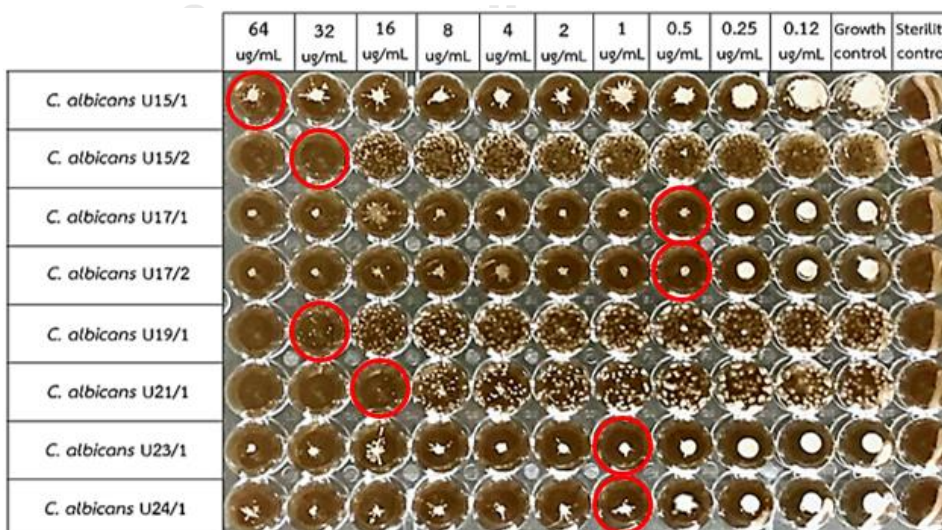
ภาพที่ A8 ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อทดสอบ (90% inhibition)



ภาพที่ A9 ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อทดสอบ (90% inhibition)



ภาพที่ A10 ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อทดสอบ (90% inhibition)



ภาพที่ A11 ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อทดสอบ (90% inhibition)

ภาคผนวก ข

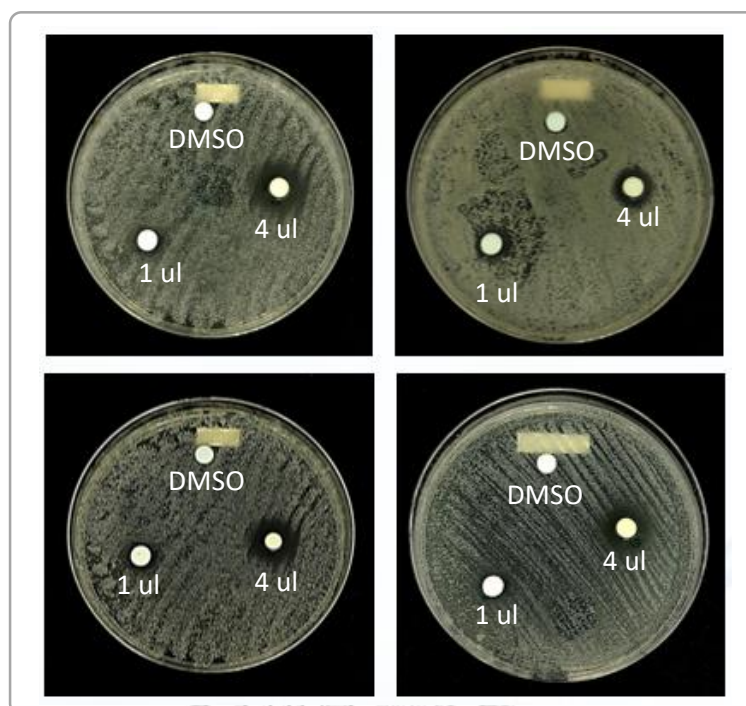
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดชา

จากการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเมล็ดชาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Disc diffusion ด้วยดิสก์บรรจุน้ำมันเมล็ดชาขนาด 1 และ 4 ไมโครลิตรต่อดิสก์ บนอาหาร MHA + GMB โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ A3 และ ภาพที่ A12

ตารางที่ A3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อของน้ำมันเมล็ดชา

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร)										
		น้ำมันเมล็ดชา (1 ไมโครลิตร)				น้ำมันเมล็ดชา (4 ไมโครลิตร)				DMSO (20 ไมโครลิตร)		
		1	2	3	Mean ± S.D.	1	2	3	Mean ± S.D.	1	2	3
1	<i>C. albicans</i> S7/1	8	8	8	8.00 ± 0.00	11	12	11	11.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
2	<i>C. albicans</i> S8/1	8	8	8	8.00 ± 0.00	12	11	11	11.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
3	<i>C. albicans</i> S9/1	8	8	8	8.00 ± 0.00	10	10	10	10.00 ± 0.00	NZ	NZ	NZ
4	<i>C. albicans</i> S10/1	8	10	9	9.00 ± 1.00	10	11	10	10.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
5	<i>C. albicans</i> S14/1	8	10	10	9.33 ± 1.15	10	12	11	11.00 ± 1.00	NZ	NZ	NZ
6	<i>C. albicans</i> S15/1	9	9	9	9.00 ± 0.00	11	12	12	11.67 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
7	<i>C. albicans</i> U6/1	8	8	8	8.00 ± 0.00	11	11	10	10.67 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
8	<i>C. albicans</i> U6/2	10	10	10	10.00 ± 0.00	14	12	11	12.33 ± 1.53	NZ	NZ	NZ
9	<i>C. albicans</i> U7/1	8	7	8	7.67 ± 0.58	11	10	10	10.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
10	<i>C. albicans</i> U8/1	6	7	7	6.67 ± 0.58	7	8	8	7.67 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
11	<i>C. albicans</i> U11/1	8	8	8	8.00 ± 0.00	10	10	11	10.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
12	<i>C. albicans</i> U15/1	8	8	9	8.33 ± 0.58	12	12	12	12.00 ± 0.00	NZ	NZ	NZ
13	<i>C. albicans</i> U15/2	8	8	8	8.00 ± 0.00	10	11	10	10.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
14	<i>C. albicans</i> U19/1	8	7	8	7.67 ± 0.58	12	11	11	11.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ
15	<i>C. albicans</i> U21/1	8	8	8	8.00 ± 0.00	10	10	10	10.00 ± 0.00	NZ	NZ	NZ
16	<i>C. albicans</i> U25/1	9	8	8	8.33 ± 0.58	12	13	11	12.00 ± 1.00	NZ	NZ	NZ
17	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	7	7	7	7.00 ± 0.00	12	11	11	11.33 ± 0.58	NZ	NZ	NZ

หมายเหตุ: NZ หมายถึง ไม่พบบริเวณยับยั้งเชื้อ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์เท่ากับ 6 มิลลิเมตร



ภาพที่ A12 ผลการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยวิธี Disc diffusion

นอกจากนี้ จากการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลต และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028 (ชุดควบคุมผลบวก) โดยวิธี Disc diffusion ด้วยยาฟลูโคนาโซลขนาด 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์บนอาหาร MHA + GMB โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ A4 และภาพที่ A13

ตารางที่ A4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซล

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร)				แปลผลความไวต่อยา
		1	2	3	Mean \pm S.D.	
1	<i>C. albicans</i> S7/1	13	13	12	12.67 \pm 0.58	R
2	<i>C. albicans</i> S8/1	16	10	14	13.33 \pm 3.06	R
3	<i>C. albicans</i> S9/1	15	13	13	13.67 \pm 1.15	R
4	<i>C. albicans</i> S10/1	10	10	10	10.00 \pm 0.00	R
5	<i>C. albicans</i> S14/1	13	13	13	13.00 \pm 0.00	R
6	<i>C. albicans</i> S15/1	9	8	9	8.67 \pm 0.58	R
7	<i>C. albicans</i> U6/1	17	18	17	17.33 \pm 0.58	SDD
8	<i>C. albicans</i> U6/2	18	18	16	17.33 \pm 1.15	SDD
9	<i>C. albicans</i> U7/1	15	12	12	13.00 \pm 1.73	R

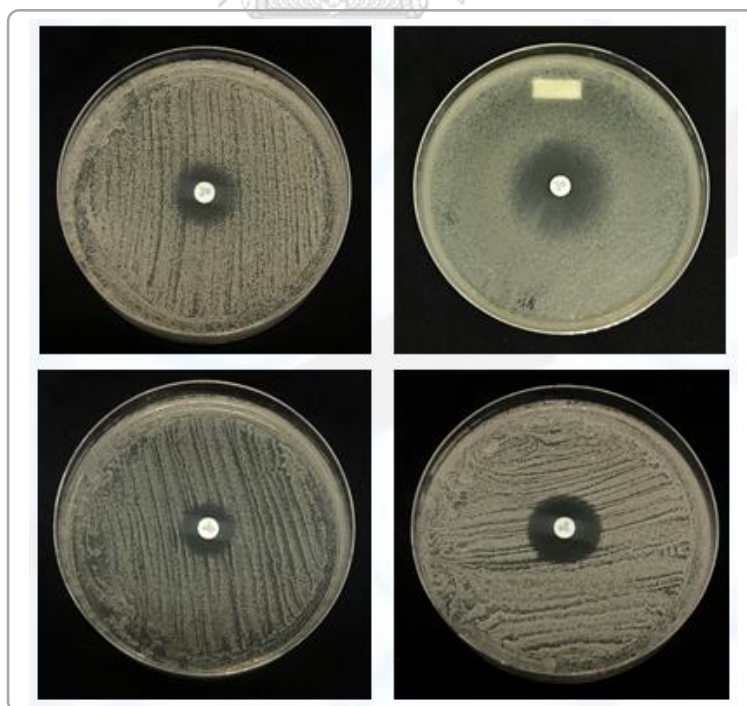
ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร)				แปลผลความไวต่อยา
		1	2	3	Mean \pm S.D.	
10	<i>C. albicans</i> U8/1	14	13	14	13.67 \pm 0.58	R
11	<i>C. albicans</i> U11/1	15	13	12	13.33 \pm 1.53	R
12	<i>C. albicans</i> U15/1	13	12	13	12.67 \pm 0.58	R
13	<i>C. albicans</i> U15/2	13	13	11	12.33 \pm 1.15	R
14	<i>C. albicans</i> U19/1	12	12	11	11.67 \pm 0.58	R
15	<i>C. albicans</i> U21/1	17	18	16	17.00 \pm 1.00	SDD
16	<i>C. albicans</i> U25/1	11	11	9	10.33 \pm 1.15	R
17	<i>C. albicans</i> ATCC 90028 (Reference)	32	34	30	32.00 \pm 2.00	✓

หมายเหตุ: S หมายถึง susceptible หรือเชื้อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล (≥ 18 มิลลิเมตร)

SDD หมายถึง susceptible dose dependent หรือเชื้อมีความไวต่อยาฟลูโคนาโซล โดยขึ้นกับปริมาณยาที่ได้รับ (14-17 มิลลิเมตร)

R หมายถึง resistant หรือเชื้อดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล (< 14 มิลลิเมตร)

✓ หมายถึง เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด



ภาพที่ A13 ผลการทดสอบความไวต่อยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี Disc diffusion

ภาคผนวก ข

ผลการศึกษาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาว และ
ประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล

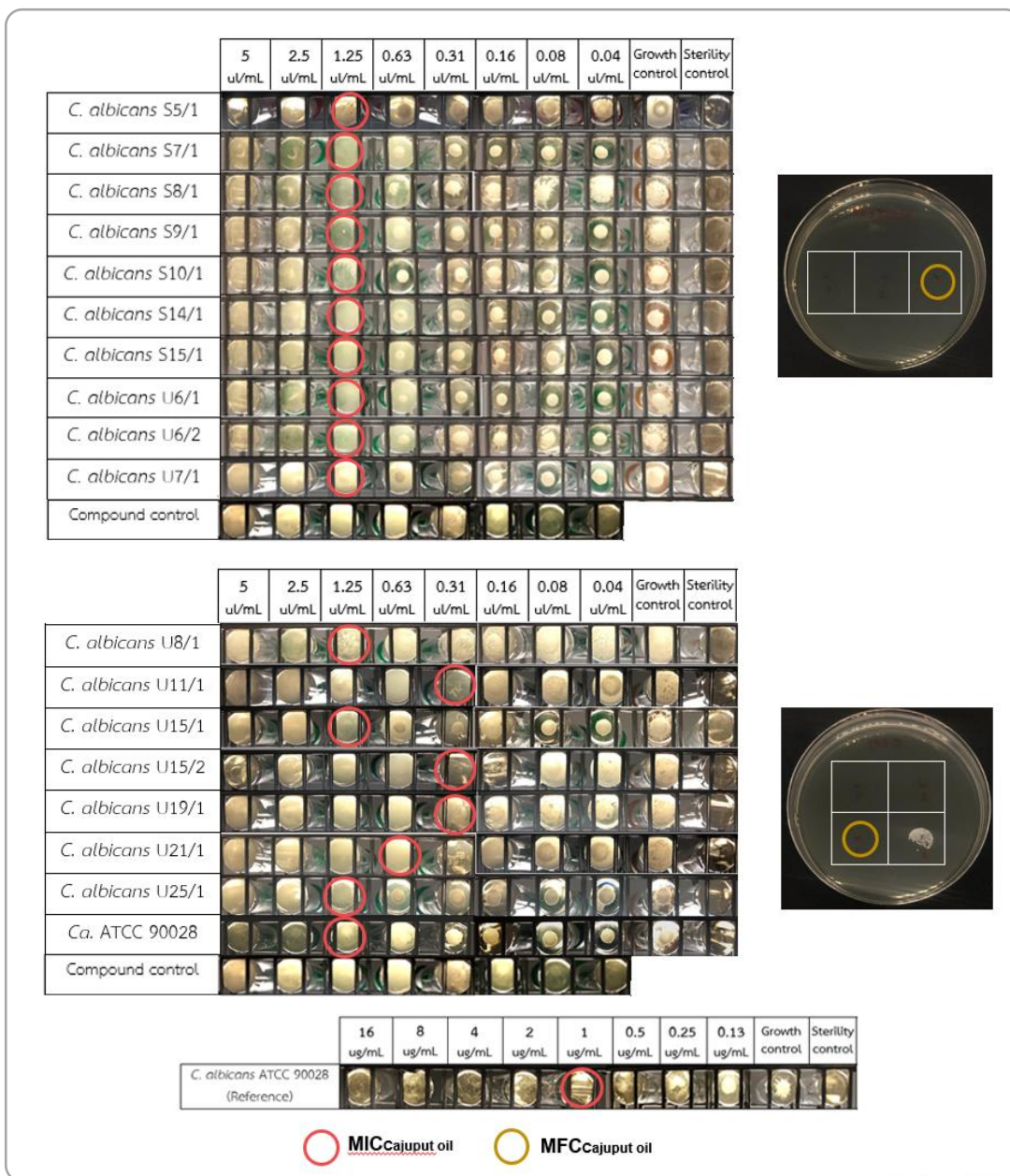
จากการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาวต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์
คลินิกที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. albicans* ATCC 90028
โดยวิธี Broth macrodilution ด้วยน้ำมันเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31,
0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครลิตรต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2%
Glucose) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ A5 และภาพที่ A14

ตารางที่ A5 ค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาว

ลำดับ	เชื้อทดสอบ	ค่า MIC ของน้ำมันเสม็ดขาว (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)				ค่า MFC ของน้ำมันเสม็ดขาว (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)			
		1	2	3	MIC Range	1	2	3	MFC Range
1	<i>C. albicans</i> S7/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
2	<i>C. albicans</i> S8/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
3	<i>C. albicans</i> S9/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
4	<i>C. albicans</i> S10/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
5	<i>C. albicans</i> S14/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
6	<i>C. albicans</i> S15/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
7	<i>C. albicans</i> U6/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
8	<i>C. albicans</i> U6/2	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
9	<i>C. albicans</i> U7/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
10	<i>C. albicans</i> U8/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
11	<i>C. albicans</i> U11/1	0.31	0.31	0.31	0.31	0.63	0.63	0.63	0.63
12	<i>C. albicans</i> U15/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
13	<i>C. albicans</i> U15/2	0.31	0.31	0.63	0.31-0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
14	<i>C. albicans</i> U19/1	0.31	0.31	0.31	0.31	0.63	0.63	0.63	0.63
15	<i>C. albicans</i> U21/1	0.63	0.63	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25	1.25
16	<i>C. albicans</i> U25/1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
17	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
18	<i>C. albicans</i> ATCC 90028 (*Reference)	0.5	1	0.5	0.5-1 (✓)	-	-	-	-

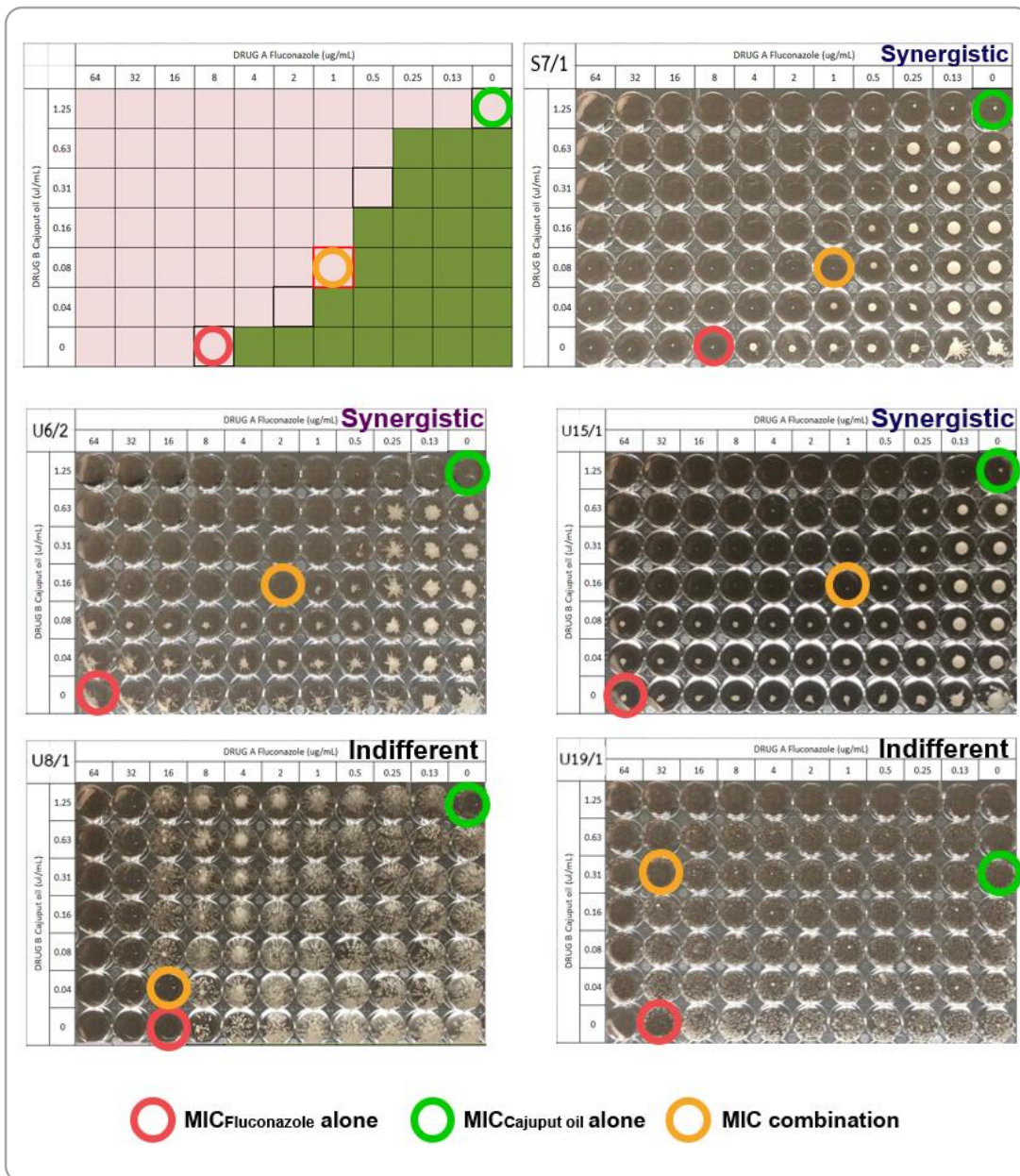
หมายเหตุ: * Reference หมายถึง ชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ (ทดสอบด้วยยาฟลูโคนาโซล)

✓ หมายถึง เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ CLSI (2017) กำหนด



ภาพที่ A14 ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของน้ำมันเสม็ดขาวต่อเชื้อทดสอบ

นอกจากนี้ จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเสม็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซลต่อเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลท ที่มีรูปแบบของยีนดื้อยาแตกต่างกัน โดยวิธี Checkerboard microdilution ด้วยสารผสมระหว่างยาฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร RPMI-1640 (w/MOPS + 0.2% Glucose) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ได้ผลดังภาพที่ A15

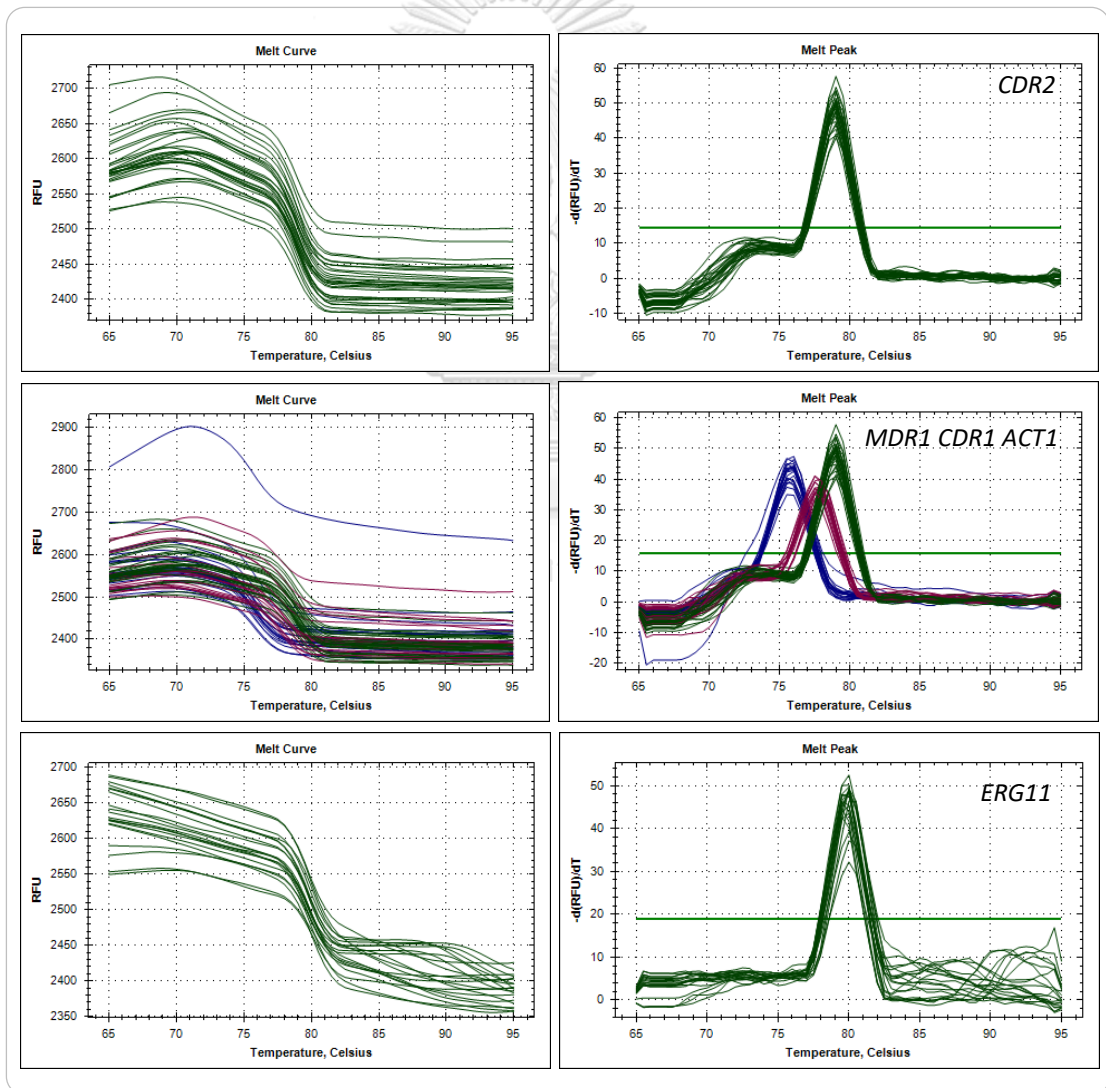


ภาพที่ A15 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันเสม็ดขาวในการเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล ต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี Checkerboard microdilution

ภาคผนวก ฅ

ผลการตรวจสอบยืนยันผลิตผล PCR ของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่ได้จากปฏิกิริยา qRT-PCR

จากการตรวจสอบยืนยันผลิตผล PCR ของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเรียลไทม์ย้อนกลับ (qRT-PCR) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ melting curve พบว่าผลิตผล PCR ของยีนแต่ละชนิดมีลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature, T_m) เฉพาะตัวแตกต่างกันและเกิดเป็น peak เดียวที่อุณหภูมิสูง แสดงให้เห็นว่าผลิตผล PCR ที่ได้เป็นของยีนที่ต้องการจริง ดังภาพที่ A16



ภาพที่ A16 ผลการวิเคราะห์ melting curve ของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11*

ภาคผนวก ญ

ผลการทดสอบทางสถิติ

1. การศึกษาความแตกต่างของระดับค่า MIC_{FLC} ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล ที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ

เมื่อเปรียบเทียบระดับค่า MIC_{FLC} ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยการทดสอบสถิติ H ด้วยวิธีของครัสคาล-วัลลิส (Kruskal-Wallis H test) ซึ่งมีสมมติฐานการทดสอบ ดังนี้

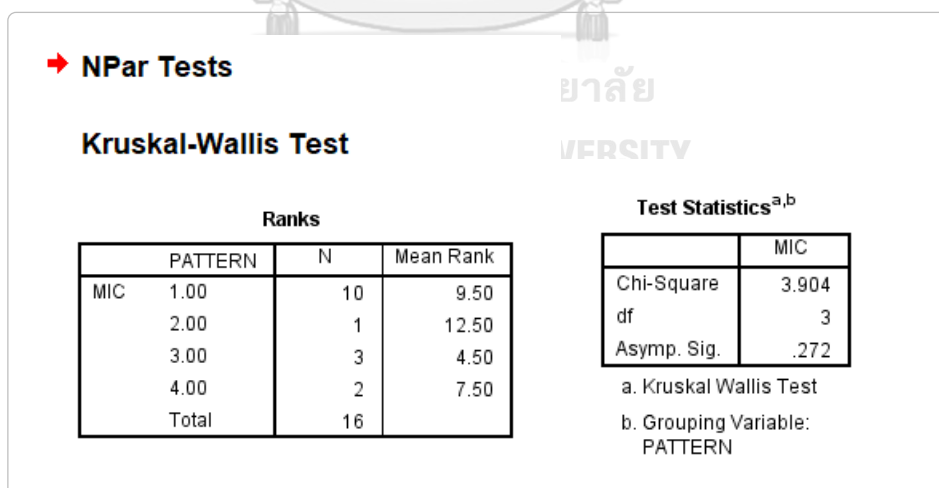
H₀: เชื้อทดสอบที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ มีระดับค่า MIC_{FLC}

ไม่แตกต่างกัน (H₀: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$)

H₁: เชื้อทดสอบที่มีรูปแบบของยีนต่างกัน อย่างน้อย 2 รูปแบบที่มีระดับค่า MIC_{FLC}

แตกต่างกัน (H_a: $\mu_i \neq \mu_j$)

ผลการทดสอบสมมติฐาน พบว่าได้ค่า p-value = 0.27 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ มีระดับค่า MIC_{FLC} ไม่แตกต่างกัน ดังภาพที่ A17



ภาพที่ A17 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับค่า MIC_{FLC} ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลที่มีรูปแบบของยีนต่างกันทั้ง 4 รูปแบบ

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาว

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product-moment correlation) ซึ่งมีสมมติฐานการทดสอบ ดังนี้

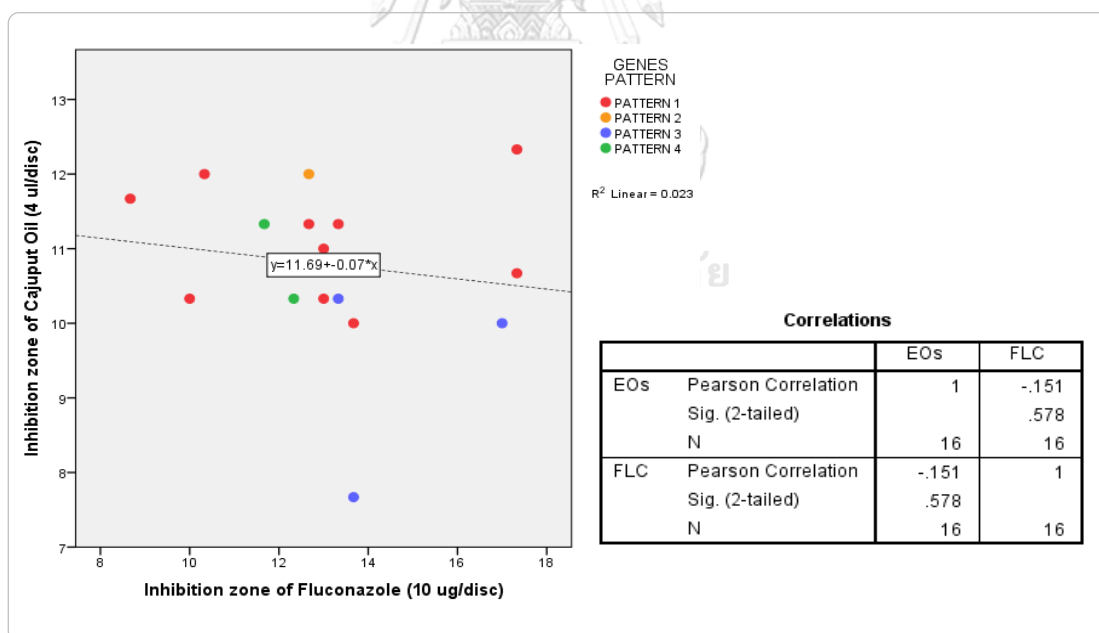
H_0 : ไม่มีสหสัมพันธ์ระหว่างขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซล

และน้ำมันเสม็ดขาว, $r = 0$

H_1 : มีสหสัมพันธ์ระหว่างขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซล

และน้ำมันเสม็ดขาว, $r \neq 0$

ผลการทดสอบสมมติฐาน พบว่าได้ค่า $r = -0.151$ และค่า sig. (2-tailed) = 0.578 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ จึงยอมรับสมมติฐานหลัก คือ r มีค่าเท่ากับ 0 จึงสรุปได้ว่าขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาวต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังภาพที่ A18



ภาพที่ A18 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเสม็ดขาว

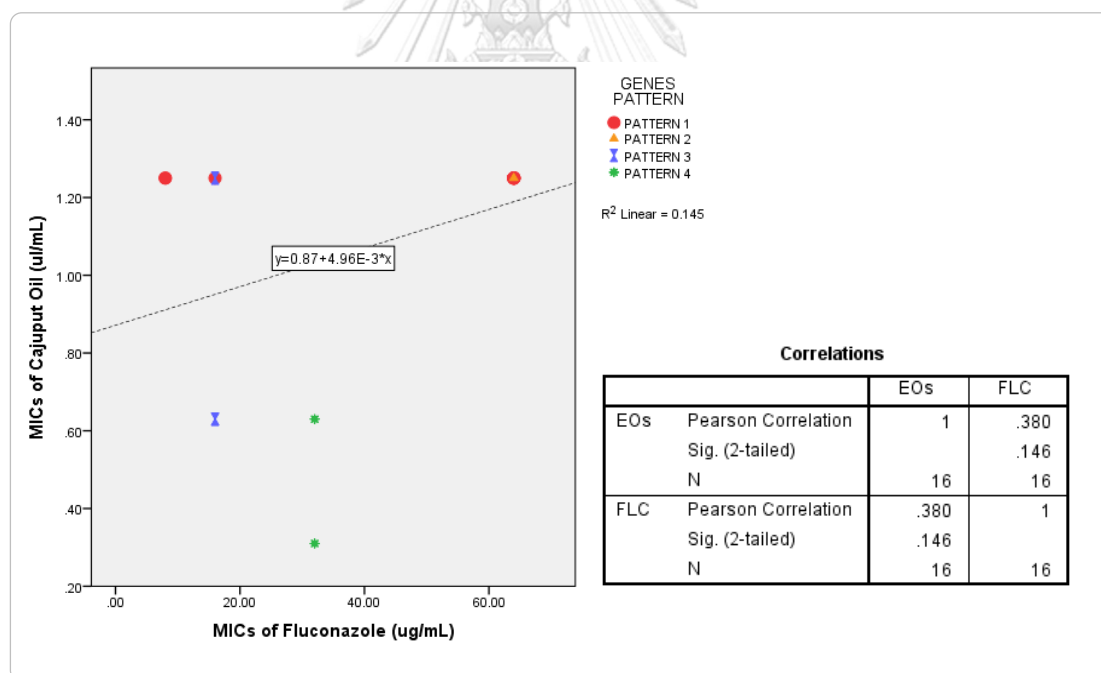
3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชา

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 16 ไอโซเลท ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product-moment correlation) ซึ่งมีสมมติฐานการทดสอบ ดังนี้

H_0 : ไม่มีสหสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชา, $r = 0$

H_1 : มีสหสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชา, $r \neq 0$

ผลการทดสอบสมมติฐาน พบว่าได้ค่า $r = 0.38$ และค่า sig. (2-tailed) = 0.146 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ จึงยอมรับสมมติฐานหลัก คือ r มีค่าเท่ากับ 0 จึงสรุปได้ว่าค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชาต่อเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังภาพที่ A19



ภาพที่ A19 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซลและน้ำมันเมล็ดชา

4. การศึกษาความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC และ $\frac{1}{8}$ MIC

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* และ *ERG11* ในเชื้อสายพันธุ์คลินิกที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีรูปแบบของยีนต่างกัน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันเมล็ดข้าว (pre-test) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC และ $\frac{1}{8}$ MIC (post-test) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยทำการทดสอบสถิติที่ ด้วยวิธี Paired Sample t-test ซึ่งมีสมมติฐานการทดสอบ ดังนี้

H_0 : ระดับการแสดงออกของยีน X ในเชื้อสายพันธุ์ Y ก่อนและหลังได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น Z ไม่แตกต่างกัน ($H_0: \mu_{\text{pre-test}} - \mu_{\text{post-test}} = 0$)

H_1 : ระดับการแสดงออกของยีน X ในเชื้อสายพันธุ์ Y ก่อนและหลังได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น Z แตกต่างกัน ($H_a: \mu_{\text{pre-test}} - \mu_{\text{post-test}} \neq 0$)

โดย X แทน ยีน *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* หรือ *ERG11*

Y แทน เชื้อสายพันธุ์ S7/1, U6/2, U15/1, U8/1 หรือ U19/1

Z แทน ระดับความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC และ $\frac{1}{8}$ MIC

ผลการทดสอบสมมติฐาน พบว่า (1) กรณีได้ค่า p-value มากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จะยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าระดับการแสดงออกของยีน X ในเชื้อสายพันธุ์ Y ก่อนและหลังได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น Z ไม่แตกต่างกัน และ (2) กรณีได้ค่า p-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จะปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่าระดับการแสดงออกของยีน X ในเชื้อสายพันธุ์ Y ก่อนและหลังได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้น Z แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังภาพที่ A20-A33

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	2.0400	2	.28284	.20000
	VAR00002	1.8000	2	.38184	.27000
Pair 2	VAR00001	2.0400	2	.28284	.20000
	VAR00003	1.7850	2	.21920	.15500
Pair 3	VAR00001	2.0400	2	.28284	.20000
	VAR00004	1.8300	2	.18385	.13000
Pair 4	VAR00001	2.0400	2	.28284	.20000
	VAR00005	1.8050	2	.19092	.13500

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.24000	.09899	.07000	-.64943	1.12943	3.429	1	.181
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	.25500	.06364	.04500	-.31678	.82678	5.667	1	.111
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.21000	.09899	.07000	-.67943	1.09943	3.000	1	.205
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.23500	.09192	.06500	-.59090	1.06090	3.615	1	.172

ภาพที่ A20 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *CDR1* ใน *C. albicans* S7/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.2950	2	.26163	.18500
	VAR00002	-.1900	2	.38184	.27000
Pair 2	VAR00001	.2950	2	.26163	.18500
	VAR00003	-.3800	2	.09899	.07000
Pair 3	VAR00001	.2950	2	.26163	.18500
	VAR00004	-.3750	2	.36062	.25500
Pair 4	VAR00001	.2950	2	.26163	.18500
	VAR00005	.0950	2	.37477	.26500

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.48500	.12021	.08500	-.59503	1.56503	5.706	1	.110
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	.67500	.16263	.11500	-.78621	2.13621	5.870	1	.107
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.67000	.09899	.07000	-.21943	1.55943	9.571	1	.066
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.20000	.11314	.08000	-.81650	1.21650	2.500	1	.242

ภาพที่ A21 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *CDR2* ใน *C. albicans* S7/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	2.9500	2	.28284	.20000
	VAR00002	4.7300	2	.38184	.27000
Pair 2	VAR00001	2.9500	2	.28284	.20000
	VAR00003	4.0500	2	.22627	.16000
Pair 3	VAR00001	2.9500	2	.28284	.20000
	VAR00004	3.7250	2	.23335	.16500
Pair 4	VAR00001	2.9500 ^a	2	.28284	.20000
	VAR00005	3.0200 ^a	2	.28284	.20000

a. The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0.

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-1.78000	.09899	.07000	-2.66943	-.89057	-25.429	1	.025
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-1.10000	.05657	.04000	-1.60825	-.59175	-27.500	1	.023
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-.77500	.04950	.03500	-1.21972	-.33028	-22.143	1	.029

ภาพที่ A22 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *MDR1*

ใน *C. albicans* S7/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดชาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	-1.2150	2	.27577	.19500
	VAR00002	-.8500	2	.38184	.27000
Pair 2	VAR00001	-1.2150	2	.27577	.19500
	VAR00003	-.9750	2	.23335	.16500
Pair 3	VAR00001	-1.2150	2	.27577	.19500
	VAR00004	-1.1300	2	.24042	.17000
Pair 4	VAR00001	-1.2150	2	.27577	.19500
	VAR00005	-1.2100	2	.29698	.21000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.36500	.10607	.07500	-1.31797	.58797	-4.867	1	.129
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-.24000	.04243	.03000	-.62119	.14119	-8.000	1	.079
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-.08500	.03536	.02500	-.40266	.23266	-3.400	1	.182
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	-.00500	.02121	.01500	-.19559	.18559	-.333	1	.795

ภาพที่ A23 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *ERG11*

ใน *C. albicans* S7/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดชาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

T-Test**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	.6400	2	.29698	.21000
	VAR00002	.8600	2	.25456	.18000
Pair 2	VAR00001	.6400	2	.29698	.21000
	VAR00003	.4700	2	.25456	.18000
Pair 3	VAR00001	.6400	2	.29698	.21000
	VAR00004	.3900	2	.25456	.18000
Pair 4	VAR00001	.6400	2	.29698	.21000
	VAR00005	.5150	2	.16263	.11500

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.22000	.04243	.03000	-.60119	.16119	-7.333	1	.086
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	.17000	.04243	.03000	-.21119	.55119	5.667	1	.111
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.25000	.04243	.03000	-.13119	.63119	8.333	1	.076
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.12500	.13435	.09500	-1.08209	1.33209	1.316	1	.414

ภาพที่ A24 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *CDR1* ใน *C. albicans* U6/2 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	-1.5650	2	.30406	.21500
	VAR00002	-1.7550	2	.24749	.17500
Pair 2	VAR00001	-1.5650	2	.30406	.21500
	VAR00003	-2.0100	2	.36770	.26000
Pair 3	VAR00001	-1.5650	2	.30406	.21500
	VAR00004	-2.0350	2	.21920	.15500
Pair 4	VAR00001	-1.5650	2	.30406	.21500
	VAR00005	-1.7600	2	.21213	.15000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.19000	.05657	.04000	-.31825	.69825	4.750	1	.132
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	.44500	.06364	.04500	-.12678	1.01678	9.889	1	.064
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.47000	.08485	.06000	-.29237	1.23237	7.833	1	.081
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.19500	.09192	.06500	-.63090	1.02090	3.000	1	.205

ภาพที่ A25 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *CDR2* ใน *C. albicans* U6/2 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	1.6500	2	.29698	.21000
	VAR00002	5.5050	2	.24749	.17500
Pair 2	VAR00001	1.6500	2	.29698	.21000
	VAR00003	5.3900	2	.25456	.18000
Pair 3	VAR00001	1.6500	2	.29698	.21000
	VAR00004	4.7200	2	.22627	.16000
Pair 4	VAR00001	1.6500	2	.29698	.21000
	VAR00005	1.9500	2	.22627	.16000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-3.85500	.04950	.03500	-4.29972	-3.41028	-110.143	1	.006
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-3.74000	.04243	.03000	-4.12119	-3.35881	-124.667	1	.005
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-3.07000	.07071	.05000	-3.70531	-2.43469	-61.400	1	.010
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	-.30000	.07071	.05000	-.93531	.33531	-6.000	1	.105

ภาพที่ A26 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ใน *C. albicans* U6/2 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	-1.5000	2	.28284	.20000
	VAR00002	-1.0200	2	.02828	.02000
Pair 2	VAR00001	-1.5000	2	.28284	.20000
	VAR00003	-1.0950	2	.41719	.29500
Pair 3	VAR00001	-1.5000	2	.28284	.20000
	VAR00004	-1.0000	2	.19799	.14000
Pair 4	VAR00001	-1.5000	2	.28284	.20000
	VAR00005	-1.5250	2	.31820	.22500

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	-1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.48000	.31113	.22000	-3.27537	2.31537	-2.182	1	.274
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-.40500	.13435	.09500	-1.61209	.80209	-4.263	1	.147
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-.50000	.08485	.06000	-1.26237	.26237	-8.333	1	.076
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.02500	.03536	.02500	-.29266	.34266	1.000	1	.500

ภาพที่ A27 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *ERG11* ใน *C. albicans* U6/2 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	1.6200	2	.24042	.17000
	VAR00002	1.4750	2	.10607	.07500
Pair 2	VAR00001	1.6200	2	.24042	.17000
	VAR00003	1.1550	2	.09192	.06500
Pair 3	VAR00001	1.6200	2	.24042	.17000
	VAR00004	1.1600	2	.07071	.05000
Pair 4	VAR00001	1.6200	2	.24042	.17000
	VAR00005	1.4450	2	.09192	.06500

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	.14500	.13435	.09500	-1.06209	1.35209	1.526	1	.369
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	.46500	.14849	.10500	-.86915	1.79915	4.429	1	.141
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.46000	.16971	.12000	-1.06474	1.98474	3.833	1	.162
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.17500	.14849	.10500	-1.15915	1.50915	1.667	1	.344

ภาพที่ A28 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *CDR1* ใน *C. albicans* U15/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	4.9400	2	.24042	.17000
	VAR00002	5.7900	2	.25456	.18000
Pair 2	VAR00001	4.9400	2	.24042	.17000
	VAR00003	5.2500	2	.09899	.07000
Pair 3	VAR00001	4.9400	2	.24042	.17000
	VAR00004	4.6950	2	.20506	.14500
Pair 4	VAR00001	4.9400	2	.24042	.17000
	VAR00005	4.7400	2	.08485	.06000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.85000	.01414	.01000	-.97706	-.72294	-85.000	1	.007
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-.31000	.14142	.10000	-1.58062	.96062	-3.100	1	.199
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.24500	.03536	.02500	-.07266	.56266	9.800	1	.065
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.20000	.15556	.11000	-1.19768	1.59768	1.818	1	.320

ภาพที่ A29 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *MDR1* ใน *C. albicans* U15/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	-1.3000	2	.21213	.15000
	VAR00002	-1.0550	2	.24749	.17500
Pair 2	VAR00001	-1.3000	2	.21213	.15000
	VAR00003	-1.0600	2	.26870	.19000
Pair 3	VAR00001	-1.3000	2	.21213	.15000
	VAR00004	-1.2550	2	.20506	.14500
Pair 4	VAR00001	-1.3000	2	.21213	.15000
	VAR00005	-1.2800	2	.22627	.16000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.24500	.03536	.02500	-.56266	.07266	-9.800	1	.065
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-.24000	.05657	.04000	-.74825	.26825	-6.000	1	.105
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-.04500	.00707	.00500	-.10853	.01853	-9.000	1	.070
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	-.02000	.01414	.01000	-.14706	.10706	-2.000	1	.295

ภาพที่ A30 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *ERG11*

ใน *C. albicans* U15/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	4.3950	2	.31820	.22500
	VAR00002	5.6450	2	.24749	.17500
Pair 2	VAR00001	4.3950	2	.31820	.22500
	VAR00003	5.6700	2	.25456	.18000
Pair 3	VAR00001	4.3950	2	.31820	.22500
	VAR00004	4.8000	2	.26870	.19000
Pair 4	VAR00001	4.3950	2	.31820	.22500
	VAR00005	4.3600	2	.24042	.17000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-1.25000	.07071	.05000	-1.88531	-.61469	-25.000	1	.025
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-1.27500	.06364	.04500	-1.84678	-.70322	-28.333	1	.022
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-.40500	.04950	.03500	-.84972	.03972	-11.571	1	.055
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.03500	.07778	.05500	-.66384	.73384	.636	1	.639

ภาพที่ A31 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *MDR1*

ใน *C. albicans* U8/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	-1.2250	2	.31820	.22500
	VAR00002	-1.1000	2	.25456	.18000
Pair 2	VAR00001	-1.2250	2	.31820	.22500
	VAR00003	-1.0450	2	.24749	.17500
Pair 3	VAR00001	-1.2250	2	.31820	.22500
	VAR00004	-1.2500	2	.25456	.18000
Pair 4	VAR00001	-1.2250	2	.31820	.22500
	VAR00005	-1.2800	2	.24042	.17000

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000
Pair 4	VAR00001 & VAR00005	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.12500	.06364	.04500	-.69678	.44678	-2.778	1	.220
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-.18000	.07071	.05000	-.81531	.45531	-3.600	1	.172
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	.02500	.06364	.04500	-.54678	.59678	.556	1	.677
Pair 4	VAR00001 - VAR00005	.05500	.07778	.05500	-.64384	.75384	1.000	1	.500

ภาพที่ A32 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน ERG11 ใน *C. albicans* U8/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

→ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	-1.2250	2	.30406	.21500
	VAR00002	-.9250	2	.23335	.16500
Pair 2	VAR00001	-1.2250	2	.30406	.21500
	VAR00003	-1.1700	2	.25456	.18000
Pair 3	VAR00001	-1.2250	2	.30406	.21500
	VAR00004	-1.1000	2	.25456	.18000
Pair 4	VAR00001	-1.2250 ^a	2	.30406	.21500
	VAR00005	-1.2550 ^a	2	.30406	.21500

a. The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0.

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	2	1.000	.000
Pair 2	VAR00001 & VAR00003	2	1.000	.000
Pair 3	VAR00001 & VAR00004	2	1.000	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	-.30000	.07071	.05000	-.93531	.33531	-6.000	1	.105
Pair 2	VAR00001 - VAR00003	-.05500	.04950	.03500	-.49972	.38972	-1.571	1	.361
Pair 3	VAR00001 - VAR00004	-.12500	.04950	.03500	-.56972	.31972	-3.571	1	.174

ภาพที่ A33 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน ERG11 ใน *C. albicans* U19/1 เมื่อได้รับน้ำมันเมล็ดข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิชญพงศ์ ศิริเดช
วัน เดือน ปี เกิด	12 พฤศจิกายน 2534
สถานที่เกิด	จังหวัดตรัง
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2557
ที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 33/110 เดอะกรีนเกรสคอนโด บางแสน ถนนลงหาดบางแสนสาย4เหนือ ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20130
ผลงานตีพิมพ์	1. พิชญพงศ์ ศิริเดช, กาญจนา หริ่มเพ็ง และเขมาภรณ์ บุญบำรุง. การจำแนกชนิดของเชื้อ <i>Candida albicans</i> สายพันธุ์คลินิก ด้วยเทคนิค ทางอณูชีววิทยา. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 12; ชลบุรี: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก; 2562. หน้า 294-301. 2. Keereedach P, Hrimpeng K, Boonbumrung K. Antifungal Activity of Thai Cajuput Oil and The Effect on Efflux-Pump Genes Expression in Fluconazole-Resistant <i>Candida albicans</i> Clinical Isolates. <i>International Journal of Microbiology</i> . (Submitted: February 9, 2020)