การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มและคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของเชื้อ *Candida parapsilosis*

ศรีสุดา ปัณณานุสรณ์* และ ณัฐธิดา ม่วงสุนทร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Srisuda Pannanusorn* and Natthida Muangsuntorn

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre

Received: July 26, 2020; Accepted: January 18, 2021

บทคัดย่อ

Candida parapsilosis จัดเป็นจุลชีพประจำถิ่นของมนุษย์ แต่เชื้อนี้ถูกจัดเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสได้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะในทารกแรกเกิด *C. parapsilosis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มซึ่งมีโครงสร้างที่สามารถปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวินะและระบบภูมิคุ้มกัน คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์ (Cell surface hydrophobicity) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มบนวัสดุที่แตกต่างกันสองชนิดคือหลอดทดลองแบบพลาสติก และหลอดทดลองแบบแก้ว และศึกษาคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำด้วยวิธี Microbial ahdesion to hydrocarbons (MATH) ในเชื้อ *C. parapsilosis* จำนวน 66ไอโซเลทที่แยกได้จากผู้ป่วย ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มพบว่าการสร้างไบโอฟิล์มบนวัสดุทดสอบทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กัน เชื้อแต่ละไอโซเลทสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน เช่นเดียวกับคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำที่มีค่าอยู่ระหว่าง 1.370-90.217 อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่ทดสอบ

คำสำคัญ : *Candida parapsilosis*; ไบโอฟิล์ม; ความไม่ชอบน้ำ; ปัจจัยก่อโรค; การทดสอบ MATH

Abstract

Candida parapsilosis, a normal flora found on the human body, is recognized as an opportunistic pathogen in immunocompromised individuals, especially in the neonate. *C. parapsilosis* also can form a biofilm to protect cells from the external environment. Therefore, biofilm results in resistance to antimicrobial agents and host immunity, leading to a severe infection in the patients. Cell surface hydrophobicity (CSH) is one factor that affected biofilm formation. This research aimed to study biofilm formation using two different materials (polypropylene tube and borosilicate tube) and CSH using

**Corresponding author: alex.lektao34@gmail.com*

microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) test in 66 *C. parapsilosis* clinical isolates. The results showed that biofilm formation in 66 isolates was strain-dependent, and biofilm was related to two different materials. Using MATH method, the hydrophobicity of the isolates was between 1.370 - 90.217%. However, the correlation between hydrophobicity and biofilm formation of all isolates was not shown in this study.

Keywords: *Candida parapsilosis*; biofilm; hydrophobicity; virulence factors; MATH assay

1. บทนำ

Candida parapsilosis จัดเป็นจุลชีพประจำถิ่นที่สามารถพบได้ตามเล็บและผิวหนังของร่างกายมนุษย์ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อนี้ได้ตามสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ พืช (Cordeiro *et al.*, 2010; Kordowska-Wiater *et al.*, 2017; Novak Babič *et al.*, 2016) หรือตามพื้นผิวอุปกรณ์ต่าง ๆ ทั้งในบ้านและโรงพยาบาล (Döğen *et al.*, 2017; Pannanusorn *et al.*, 2020) โดยเชื้อยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้บนพื้นผิวที่แห้งบนวัสดุชนิดพลาสติกได้นานถึง 28 วัน (Welsh *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตามเชื้อนี้สามารถกลายเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ได้ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการให้อาหารทางหลอดเลือดดำ เช่น ผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤติ (Intensive Care Unit) (Brillowska-Dabrowska *et al.*, 2009; van Asbeck *et al.*, 2009) จากรายงานอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Candida* จากประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก พบว่าเชื้อ *C. parapsilosis* มีความสำคัญรองลงมาจากเชื้อ *C. albicans* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกลุ่มนี้ (Cisterna *et al.*, 2010; Puig-Asensio *et al.*, 2014; Takakura *et al.*, 2004) สำหรับประเทศไทยพบว่า เชื้อ *C. parapsilosis* สามารถพบได้บ่อยรองลงมาจาก *C. tropicalis* และ *C. albicans* ตามลำดับ (Pharkjaksu *et al.*, 2018)

ปัจจัยก่อโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งของ *C. parapsilosis* คือความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ได้ ไบโอฟิล์มพัฒนามาจากเซลล์ที่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวทั้งที่มีชีวิต (biotic surface) หรือไม่มีชีวิต (abiotic surface) เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนและเกาะกลุ่มกัน และมีการสร้างเยื่อเมือก (extracellular polymeric substance (EPS) matrix) มาห่อหุ้มโครงสร้างทั้งหมด (Chandra *et al.*, 2001) และจากลักษณะของโครงสร้างไบโอฟิล์มดังนี้ จึงทำให้การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อให้เกิดปัญหาทางการแพทย์ที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ การดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาการติดเชื้อนั้น ๆ เนื่องจากโครงสร้างเยื่อเมือกป้องกันการแพร่ผ่านของยาไม่ให้เข้าไปภายในโครงสร้างไบโอฟิล์มได้ (Silva *et al.*, 2017) ถึงแม้ว่าจะยังไม่สามารถสรุปได้ว่า *Candida* สปีชีส์ใดสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด แต่ก็มีรายงานการวิจัยที่เปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มใน *Candida* สปีชีส์ต่าง ๆ พบว่า *C. parapsilosis* มีความสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า *Candida* สปีชีส์อื่น ๆ (Shin *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009)

คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ (cell surface hydrophobicity; CSH) เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ส่งผลต่อการยึดเกาะ (adhesion) การสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm formation และเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการติดเชื้อ) (Silva-Dias *et al.*, 2015; Wilson-Nieuwenhuis *et al.*, 2017) (Kumari *et al.*, 2018) เซลล์ที่มีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงจะสามารถยึดเกาะที่ผิวของเซลล์เจ้าบ้าน (host) หรือยึดเกาะกับวัสดุ อุปกรณ์ ทางการแพทย์ ซึ่งมี

ลักษณะความไม่ชอบน้ำสูงเช่นเดียวกันได้ (Mello *et al.*, 2018) ใน *Candida albicans* มีรายงานว่าเซลล์ที่มีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงจะไม่ไวต่อการจับกินโดยเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) เนื่องจากไม่ปรากฏ 1, 2 -B mannotetrose ที่สามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ (Goswami *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการบ่มเซลล์ด้วยยาปฏิชีวนะ (Bruno Ezequiel Carvalho *et al.*, 2017) (Goswami *et al.*, 2017; Nordin *et al.*, 2015)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *C. parapsilosis* คือการสร้างไบโอฟิล์มในวัสดุทดสอบสองชนิดคือหลอดทดลองแบบพลาสติก (Polypropylene) และหลอดทดลองแบบแก้ว (Borosilicate) และศึกษาคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำโดยวิธี microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) พร้อมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เชื้อ *C. parapsilosis* ทั้งหมด 66 ไอโซเลทที่แยกได้จากผู้ป่วย (Pharkjaksu *et al.*, 2018) จะถูกเก็บรักษาไว้ในอาหาร SDA ที่มีกลีเซอรอลผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และในทุกการทดสอบเชื้อ *C. parapsilosis* จะถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นจึงเขี่ยเชื้อจำนวนหนึ่งโคโลนีลงในอาหาร Yeast Nitrogen Base (YNB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ผสมอยู่ และนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยทำซ้ำอีกสองรอบ จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 1-5x10^6 CFU/mL เพื่อใช้ทดสอบต่อไป การทดลองควบคุมจะใช้ *C. parapsilosis* ATCC22019 ในทุกการทดสอบ

2.2 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลอง

เติมเซลล์ของ *C. parapsilosis* ที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ต้องการทดสอบทั้งสองชนิดคือ หลอดทดลองแบบพลาสติก (polypropylene) และหลอดทดลองแบบแก้ว (borosilicate) นำหลอดทดลองไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที เพื่อให้เซลล์ยีสต์ยึดเกาะกับพื้นผิว จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก และเติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และทำซ้ำจำนวน 2 รอบ เพื่อล้างเซลล์ยีสต์ที่ไม่ยึดเกาะพื้นผิวออกไป จากนั้นเติมอาหาร YNB+กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลอง จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งและล้างเซลล์ 2 รอบด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร วางหลอดทดลองทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย Crystal violet ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที เพื่อย้อมไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง จากนั้นจึงดูดสีย้อม Crystal

violet ทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 รอบ แล้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที เพื่อชะสีย้อมออกจากไบโอฟิล์ม จากนั้นจึงดูดสารละลาย ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงสู่ไมโครเพลทขนาด 96 หลุม เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2.3 การทดสอบคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำด้วยวิธี Microbial Adhesion to Hydrocarbons (MATH) assay

คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของเชื้อ *C. parapsilosis* สามารถประเมินได้จากความไม่ชอบน้ำที่ปรากฏบนผิวเซลล์ (Cell surface hydrophobicity: CSH) ด้วยวิธี MATH assay (Microbial adhesion to hydrocarbons) (Rosenberg, 1984) โดยปรับเปลี่ยนวิธีการดังนี้ ปรับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นที่ OD_{520nm} ให้ได้ค่าประมาณ 0.4-0.5 (A) จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสาร Octane ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป ผสมสารให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสารละลาย จากนั้นจึงดูดสารละลายในชั้น aqueous ไปวัดค่าการดูดกลืนที่ OD_{520nm} (B) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำ (% CSH) โดย % CSH = [(A-B)/A] x 100

2.4 การทดสอบทางสถิติ

ใช้โปรแกรม GrapPad Prism version 5.01 เพื่อทดสอบทางสถิติ โดยใช้ t-test เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของการสร้างไบโอฟิล์มบนวัสดุทดสอบสองชนิด ใช้ correlation test เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของไบโอฟิล์มที่สร้างได้จากวัสดุทดสอบทั้งสองชนิด และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความไม่ชอบน้ำกับไบโอฟิล์ม และ One-way ANOVA เพื่อทดสอบค่าเฉลี่ยความไม่ชอบน้ำระหว่างกลุ่ม โดยกำหนดค่า p-value เท่ากับ 0.05

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลองแบบพลาสติกและแบบแก้ว

การทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 66 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแต่ละตัวมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน ซึ่งความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มนี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของแต่ละไอโซเลท ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบชนิดของวัสดุที่ใช้เป็นพื้นผิวเพื่อให้เชื้อยึดเกาะเพื่อสร้างไบโอฟิล์มทั้งสิ้นสองชนิดคือหลอดทดลองแบบพลาสติก (polypropylene) และหลอดทดลองแบบแก้ว (borosilicate)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการสร้างไบโอฟิล์มบนวัสดุทดสอบทั้งสองชนิดพบว่าปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละไอโซเลทบนวัสดุทดสอบทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันเชิงบวก ($r=0.5810$) (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละไอโซเลทมีคุณสมบัติคงที่ อย่างไรก็ตามการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลองแบบแก้วจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลองแบบพลาสติก ($P < 0.0001$) (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าชนิดของวัสดุที่เป็นพื้นผิวสำหรับการยึดเกาะของเซลล์นั้นมีผลต่อปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างได้

3.2 คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและความสัมพันธ์กับการสร้างไบโอฟิล์ม

ผลการทดสอบคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำด้วยวิธี MATH พบว่า ความไม่ชอบน้ำของเชื้อ C. parapsilosis ทั้ง 66 ไอโซเลทมีความแปรผันมาก โดยมีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ร้อยละ 1.36 - 90.21

คิดเป็นค่าเฉลี่ยความไม่ชอบน้ำเท่ากับร้อยละ 32.85 และไม่พบความสัมพันธ์ของความไม่ชอบน้ำกับไบโอฟิล์มที่สร้างในหลอดทดลองแบบพลาสติก (รูปที่ 3 (A)) และหลอดทดลองแบบแก้ว (รูปที่ 3 (B)) โดยมีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.02522 และ 0.1162

เมื่อจัดจำแนกเชื้อตามความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มโดยเกณฑ์ (cutoff) ที่กำหนดโดย Marcos-Zambrano และคณะ (Marcos-Zambrano et al., 2014) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ คือ (1) สร้างไบโอฟิล์มน้อย; LBF (OD540nm < 0.44) (2) สร้างไบโอฟิล์มปานกลาง; MBF (0.44< OD540nm <1. 17) และ (3) สร้างไบโอฟิล์มมาก; HBF (OD540nm > 1. 17) และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำตามกลุ่มการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง 3 กลุ่มในวัสดุทดสอบทั้งสองชนิด พบว่าค่าเฉลี่ยความไม่ชอบน้ำของเชื้อที่จำแนกตามความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งหลอดทดลองแบบพลาสติก (P = 0.1459, รูปที่ 4 (A)) และหลอดทดลองแบบแก้ว (P = 0.6519, รูปที่ 4 (B))

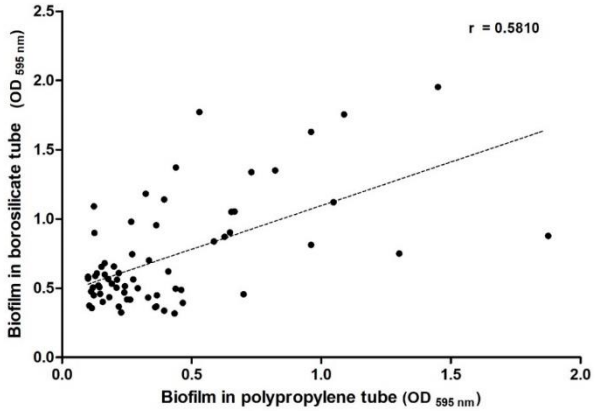

Figure 1 Positive correlation of biofilm formed on borosilicate tube and polypropylene tube (r) = 0.5810

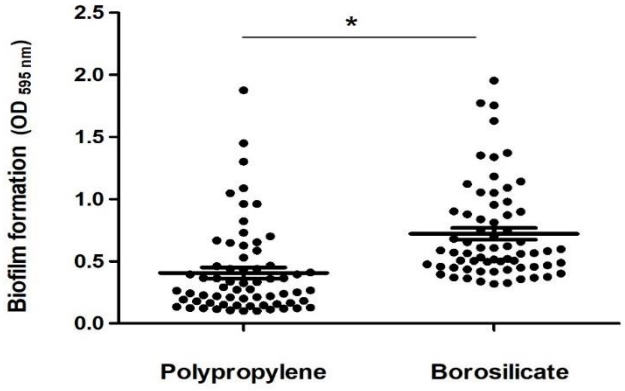

Figure 2 Biofilm formed on polypropylene tube and borosilicate tube of 66 *C. parapsilosis* isolatates. * indicates statistically significant difference (P<0.0001).

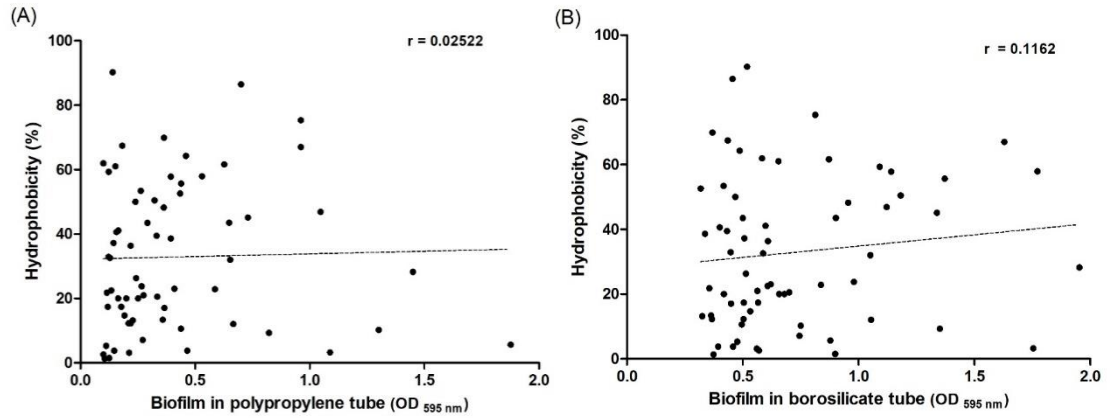

Figure 3 Correlation of hydrophobicity and biofilms of 66 *C. parapsilosis* isolates. (A) is biofilms on polypropylene tube and (B) is biofilms on borosilicate tube.

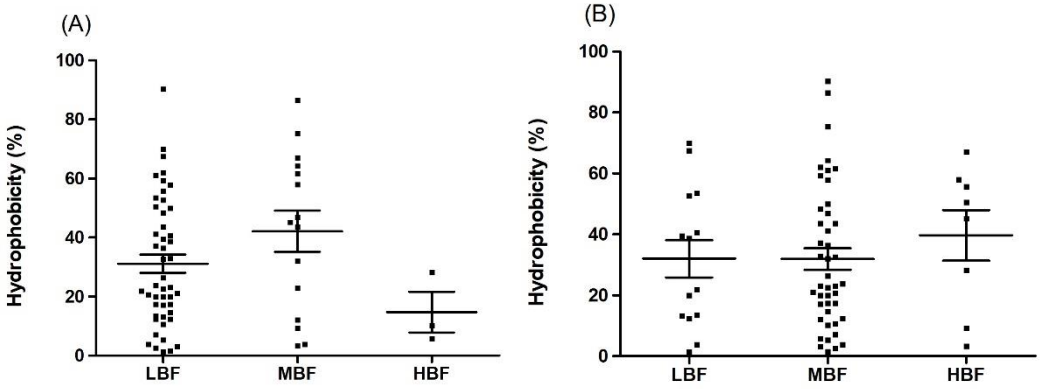

Figure 4 Hydrophobicity of 66 *C. parapsilosis* isolates according to capability of biofilm formation on polypropylene tube (A) and on borosilicate tube (B). LBF: low biofilm formation, MBF: medium biofilm formation and HBF: high biofilm formation.

C. parapsilosis มีความสำคัญเป็นอันดับสองหรือสามรองลงมาจาก *C. albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกลุ่มนี้ ดังนั้นการศึกษาปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ที่สำคัญต่าง ๆ ของเชื้อชนิดนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้ปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของ *C. parapsilosis* เช่น การสร้างไบโอฟิล์ม ความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์จำพวกโปรตีน (proteinase) ไขมัน (lipase) ฟอสโฟลิปิด (phospholilase) หรือเม็ดเลือดแดง เป็นต้น (da Silva *et al.*, 2015; Neji *et al.*, 2017; Pharkjaksu *et al.*, 2018; Tóth *et al.*, 2018)

งานวิจัยนี้ทดสอบปัจจัยก่อโรคที่สำคัญสองชนิดคือ การสร้างไบโอฟิล์ม และความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์ โดยทดสอบในเชื้อ *C. parapsilosis* จำนวน 66 ไอโซเลทที่แยกได้จากผู้ป่วย ในการทดสอบไบโอฟิล์มซึ่งเลือกใช้วัสดุที่แตกต่างกันเพื่อให้เซลล์ยึด

เกาะคือ หลอดทดลองแบบพลาสติก (polypropylene) และหลอดทดลองแบบแก้ว (borosilicate) โดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นในวัสดุทดสอบทั้งสองชนิด ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* เป็นคุณสมบัติที่คงที่ แต่วัสดุที่นำมาทดสอบอาจมีผลต่อปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นได้ ดังเห็นได้จากงานวิจัยนี้ที่การสร้างไบโอฟิล์มจะเพิ่มขึ้นในหลอดทดลองแบบแก้วเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดทดลองแบบพลาสติก และยังสามารถสรุปได้ว่า ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้งหมดที่ทดสอบนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อเนื่องจากเชื้อแต่ละตัวสร้างไบโอฟิล์มได้ปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันไป โดยข้อมูลนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นความผันแปรของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละไอโซเลทในสปีชีส์นี้ (da Silva *et al.*, 2015; Pannanusorn *et al.*, 2013; Pannanusorn *et al.*, 2014; Silva-Dias *et al.*, 2015) ซึ่งรวมไปถึงเชื้อ *Candida* สปีชีส์ อื่น ๆ เช่น *C. tropicallis*, *C. glabrata* และ *C. albicans* เป็นต้น (Silva *et al.*, 2009) ทั้งนี้ข้อมูลจากรายงานวิจัยจนถึง ณ ปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* นั้นสัมพันธ์กับบริเวณที่เกิดการติดเชื้อหรือไม่ ดังเห็นได้จากผลรายงานวิจัยที่ขัดแย้ง เช่น Shin และคณะรายงานผลการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่แยกได้จากกระแสเลือด (invasive isolates) จะสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากบริเวณอื่น ๆ (noninvasive isolates) (Shin *et al.*, 2002) หรือ Hasan และคณะ รายงานถึงการสร้างไบโอฟิล์มสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคในสัตว์ทดลอง (Hasan *et al.*, 2009) ขณะที่ da Silva และคณะ รายงานว่าผลการสร้างไบโอฟิล์มไม่สัมพันธ์กับบริเวณที่แยกเชื้อได้จากผู้ป่วย (da Silva *et al.*, 2015)

คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำที่ผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ (Cell surface hydrophobicity, CSH) จัดเป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ที่สำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อ ทั้งนี้เพื่อช่วยให้เกิดการยึดเกาะกับพื้นผิวต่าง ๆ ทั้งชนิดที่ไม่มีชีวิต (อุปกรณ์ทางการแพทย์ต่าง ๆ ที่มีการใช้กับผู้ป่วย) และมีชีวิต (เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมนุษย์) นอกจากนี้เซลล์จุลินทรีย์ที่มีความไม่ชอบน้ำสูงยังสามารถเกาะกลุ่มได้เอง สังเกตุได้จากการเกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดใหญ่ (clumping) ระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเหลว (Lather *et al.*, 2016) ซึ่งเมื่อเกิดการยึดเกาะของจุลินทรีย์กับพื้นผิวต่าง ๆ แล้วจะช่วยให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อภายในร่างกายของผู้ป่วยได้ นอกจากนี้แล้วความไม่ชอบน้ำของจุลินทรีย์ยังมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิว โดยที่เนื่องจากพื้นผิววัสดุส่วนใหญ่มีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูง (Yoshijima *et al.*, 2009) ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ซึ่งมีความไม่ชอบน้ำสูงสามารถเกาะที่วัสดุเหล่านั้นได้ดี หรือในทางกลับกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์จะลดลงในวัสดุที่มีความชอบน้ำสูง (Wilson-Nieuwenhuis *et al.*, 2017) ดังนั้นหากจุลินทรีย์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวได้ดี ผลที่ตามมาคือจุลินทรีย์นั้นจะสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีขึ้น แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าปัญหาของการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคคือ การดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา เนื่องจากโครงสร้างของไบโอฟิล์มที่มีชั้นนอกสุดที่ประกอบด้วยสารหลัก ๆ จำพวกคาร์โบไฮเดรตจะสามารถป้องกันการซึมผ่านของยาปฏิชีวนะจากภายนอกเข้าสู่ภายในไบโอฟิล์ม จึงทำให้เซลล์จุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มนี้ไม่ถูกทำลายได้ (Tsui *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียดื้อยาจะมีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบ

กับแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ (Lather *et al.*, 2016)

ในการทดสอบคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของเชื้อ *C. parapsilosis* ด้วยวิธี MATH assay จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบจำนวน 66 ไอโซเลทมีค่าร้อยละความไม่ชอบน้ำที่แปรผันมากตั้งแต่ร้อยละ 1.36 - 90.21 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 32.85 % ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้าโดย Silva-Dias และคณะ (Silva-Dias *et al.*, 2015) ซึ่งรายงานค่าเฉลี่ยความไม่ชอบน้ำของ *C. parapsilosis* อยู่ที่ประมาณ 30 % แต่อย่างไรก็ตาม Dias และคณะ ได้รายงานความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *C. parapsilosis* ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยครั้งนี้ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของความไม่ชอบน้ำกับความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้ง 66 ไอโซเลท รวมถึงค่าเฉลี่ยความไม่ชอบน้ำไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มเชื้อที่จำแนกตามความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ความไม่สอดคล้องกันนี้สามารถอธิบายได้จากปัจจัยต่าง ๆ ในการทดลองซึ่งอาจมีผลกระทบต่อคุณสมบัติการไม่ชอบน้ำ และการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ โดยรายงานวิจัยก่อนหน้า (Bruno Ezequiel Carvalho *et al.*, 2017) ได้ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อ *C. albicans* และ *C. parapsilosis* พบว่าอาหาร RPMI จะส่งผลให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มสูงสุดและเชื้อทดสอบจะแสดงค่าความไม่ชอบน้ำสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ รวมถึงงานวิจัยอื่น ๆ ที่ได้ใช้อาหาร RPMI ในการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มได้แสดงให้เห็นว่าอาหาร RPMI ส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีและมีผลต่อลักษณะเซลล์ที่ปรากฏภายในไบโอฟิล์มคือจะมีการสร้างสายรามากขึ้น (Kucharı´kova *et al.*, 2011) โดยสายรานี้มีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงกว่ายีสต์ (Goswami *et al.*, 2017) แต่งานวิจัยนี้ผู้วิจัยทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มและคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำในอาหารชนิด YNB ที่เติมกลูโคส 10 mM ซึ่งมีรายงานคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำค่อนข้างต่ำในเชื้อ *C. albicans* นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและการสร้างไบโอฟิล์มได้ในกลุ่มเชื้อ *Candida* เช่น อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ เป็นต้น (Hasan *et al.*, 2009) ถึงแม้คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและการสร้างไบโอฟิล์มที่ได้จากงานวิจัยนี้ที่ทดสอบใน *C. parapsilosis* จำนวน 66 ไอโซเลทจะไม่สัมพันธ์กัน แต่ก็สามารถสรุปได้ว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบ ดังนั้นการใช้คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอต่อการทำนายความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้

4. สรุป

ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของเชื้อ *C. parapsilosis* เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของแต่ละไอโซเลทจึงสามารถสร้างไบโอฟิล์มหรือแสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำได้มากหรือน้อยแตกต่างกันไป ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำในเชื้อทดสอบจากงานวิจัยครั้งนี้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.นพ.พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อสำหรับการทดสอบในงานวิจัยนี้

6. References

Brillowska- Dabrowska, A. , Schön, T. , Pannanusorn, S. , Lönnbro, N. , Bernhoff, L. , Bonnedal, J. , Häggström, J. , Wistedt, A. , Fernandez, V. and Arendrup, M. C. , 2009, A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping, Scand. J. Infect. Dis. 41: 135-142.

Bruno Ezequiel Carvalho, P. , Charles Lima, R. , Mauricio de Sousa, O., Evandro Leão, R., Maria do Rosário Rodrigues, S. and Plínio Lázaro Faleiro, N. , 2017, Cell surface hydrophobicity and biofilm formation of *Candida* yeast species in different culture media, Biosci. J. 33:739-746.

Chandra, J. , Kuhn, D. M. , Mukherjee, P. K. , Hoyer, L. L. , McCormick, T. and Ghannoum, M.A., 2001, Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance, J. Bacteriol. 183: 5385-5394.

Cisterna, R. , Ezpeleta, G. , Telleria, O. , Guinea, J. , Regueiro, B. , Garcia- RodrÃguez, J. , Esperalba, J. and Group, a. T. S. C. S. , 2010, Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* Infections in 40 tertiary care hospitals in Spain, J. Clin. Microbiol. 48: 4200-4206.

Cordeiro, R. A. , Brilhante, R. S. , Pantoja, L. D. , Moreira Filho, R. E. , Vieira, P. R. , Rocha, M. F. , Monteiro, A. J. and Sidrim, J. J. , 2010, Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brazil, Braz. J. Infect. Dis. 14: 30-34.

da Silva, B. V. , Silva, L. B. , de Oliveira, D. B. C. , da Silva, P. R. , Ferreira- Paim, K. , Andrade- Silva, L. E. , Silva- Vergara, M. L. and Andrade, A. A. , 2015, Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens, Mycopathologia 180: 333-343.

Döğen, A. , Sav, H. , Gonca, S. , Kaplan, E. , Ilkit, M. , Novak Babič, M. , Gunde- Cimerman, N. and de Hoog, G. S. , 2017, *Candida parapsilosis* in domestic laundry machines, Med. Mycol. 55: 813-819.

Goswami, R. R. , Pohare, S. D. , Raut, J. and Karuppayil, S. M. , 2017, Cell surface hydrophobicity as A virulence factor in *Candida albicans*. Biosci. Biotech. Res. Asia. 14: 1503-1511.

Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N. and Fries, B. C. , 2009, Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence, Microbes Infect. 11: 753-761.

Kordowska- Wiater, M. , Kuzdraliński, A. , Czernecki, T., Targoń́ski, Z., Frąc, M. and Oszust, K. , 2017, The production of arabitol by a novel plant yeast isolate *Candida parapsilosis* 27RL- 4, Open Life Sciences.12: 326-336.

Kucharı´kova, S. a. , Tournu, H. l. n. , Lagrou, K. , Van Dijck, P. and Bujda´kova, H. , 2011, Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under

different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin, J. Med. Microbiol. 60: 1261-1269.

Kumari, A., Mankotia, S., Chaubey, B., Luthra, M. and Singh, R., 2018, Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm- forming capacity of various *Candida* species, J. Med. Microbiol. 67: 889-892.

Lather, P., Mohanty, A. K., Jha, P. and Garsa, A. K., 2016, Contribution of cell surface hydrophobicity in the resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents, Biochem. Res. Int. 2016: 1091290. doi:10.1155/2016/1091290

Marcos- Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E. and Guinea, J., 2014, Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut- off points, Int. J. Med. Microbiol. 304: 1192-1198.

Mello, T. P., Oliveira, S. S. C., Frasés, S., Branquinha, M. H. and Santos, A. L. S., 2018, Surface properties, adhesion and biofilm formation on different surfaces by *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans,* Biofouling. 34: 800-814.

Neji, S., Hadrich, I., Trabelsi, H., Abbes, S., Cheikhrouhou, F., Sellami, H., Makni, F. and Ayadi, A., 2017, Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens, J. Biomed. Sci. 24: 67.

Nordin, M. A., Abdul Razak, F. and Himratul-Aznita, W. H., 2015, Assessment of antifungal activity of bakuchiol on oral-associated *Candida* spp, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015:918624. doi:10.1155/2015/918624.

Novak Babič, M., Zalar, P., Ženko, B., Džeroski, S. and Gunde- Cimerman, N., 2016, Yeasts and yeast- like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances, Fungal Ecol. 20: 30-39.

Pannanusorn, S., Fernandez, V. and Römling, U., 2013, Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection, Mycoses 56: 264-272.

Pannanusorn, S., Nakkao, N. and Cholnakasem, N., 2020, Biofilm formation, proteinase and phospholipase activities of *Candida parapsilosis* isolated from environment, Thai J. Sci. Technol. 9: 129-141.

Pannanusorn, S., Ramírez-Zavala, B., Lünsdorf, H., Agerberth, B., Morschhäuser, J. and Römling, U., 2014, Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. Eukaryot. Cell 13: 438-451.

Pharkjaksu, S., Chongtrakool, P., Suwannakarn, K. and Ngamskulrungroj, P., 2018, Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates

from clinical specimens at Siriraj Hospital, Thailand, from 2011 to 2015, Med. Mycol. 56: 426-433.

Puig- Asensio, M. , Padilla, B. , Garnacho-Montero, J., Zaragoza, O., Aguado, J.M., Zaragoza, R. , Montejo, M. , Muñoz, P. , Ruiz-Camps, I., Cuenca-Estrella, M. and Almirante, B. , 2014, Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population- based surveillance in Spain, Clin. Microbiol. Infect. 20: 245-254.

Rosenberg, M. , 1984, Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett. 22: 289-295.

Shin, J. H. , Kee, S. J. , Shin, M. G. , Kim, S. H. , Shin, D. H. , Lee, S. K. , Suh, S. P. and Ryang, D.W., 2002, Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J. Clin. Microbiol. 40: 1244-1248.

Silva- Dias, A. , Miranda, I. M. , Branco, J. , Monteiro- Soares, M. , Pina- Vaz, C. and Rodrigues, A. G. , 2015, Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp, Front. Microbiol. 6: 205.

Silva, S. , Henriques, M. , Martins, A. , Oliveira, R. , Williams, D. and Azeredo, J. , 2009, Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: quantification, structure and matrix composition, Med. Mycol. 47: 681-689.

Silva, S., Rodrigues, C.F., Araújo, D., Rodrigues, M. E. and Henriques, M. , 2017, *Candida* species biofilms' antifungal resistance, J. fungi (Basel) 3: 8.

Takakura, S. , Fujihara, N. , Saito, T. , Kudo, T. , Iinuma, Y. , Ichiyama, S. and Group, t. J. I. M. S. S. , 2004, National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin, J. Antimicrob. Chemother. 53: 283-289.

Tóth, R. , Cabral, V. , Thuer, E. , Bohner, F. , Németh, T. , Papp, C. , Nimrichter, L. , Molnár, G. , Vágvölgyi, C. , Gabaldón, T. , Nosanchuk, J. D. and Gácser, A. , 2018, Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction, Sci. Rep. 8: 1346.

Tsui, C., Kong, E.F. and Jabra-Rizk, M.A., 2016, Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm, Pathog. Dis. 74(4) , ftw018. https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018.

van Asbeck, E. C. , Clemons, K. V. and Stevens, D. A. , 2009, *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility, Crit. Rev. Microbiol. 35: 283-309.

Welsh, R. M. , Bentz, M. L. , Shams, A. , Houston, H. , Lyons, A. , Rose, L. J. and Litvintseva, A. P. , 2017, Survival, persistence, and

isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface, J. Clin. Microbiol. 55: 2996-3005.

Wilson-Nieuwenhuis, J.S.T., Dempsey-Hibbert, N., Liauw, C.M. and Whitehead, K.A., D., Hirota, K., Ichikawa, T. and Miyake, Y., 2009, Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*, Mycoses, 53: 221-226.

2017, Surface modification of platelet concentrate bags to reduce biofilm formation and transfusion sepsis, Colloids Surf. B Biointerfaces 160: 126-135.

Yoshijima, Y., Murakami, K., Kayama, S., Liu,