

## การแยกเชื้อรา *Candida* จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่ เทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ The Isolation *Candida* of from Oral Cavity in Smokers Comparing with Non-smokers

ชลธิชา จินาพร<sup>1</sup>

E-mail: chontichar.jin@lru.ac.th

### บทคัดย่อ

เชื้อราในจำแนก *Candida* เป็นเชื้อราประเภทยีสต์คล้ายรา ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อรา Candidiasis ที่สำคัญโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือร่างกายอ่อนแอด้วยสาเหตุต่างๆ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อรา *Candida* จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 30 ราย เพื่อเปรียบเทียบความชุกของเชื้อรา *Candida* กับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 30 ราย โดยเก็บตัวอย่างจากบริเวณลิ้น กระพุ้งแก้ม และไรฟัน ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (sterile technique) จากนั้นนำตัวอย่างมาเพาะบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบโคโลนีสีขาวครีมซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *Candida* จากทุกตัวอย่าง โดยสามารถแยกโคโลนีจากช่องปากผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 56 ไอโซเลต และจากช่องปากผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 48 ไอโซเลต จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ โดยทดสอบความสามารถในการสร้าง germ tube (germ tube production) และคุณสมบัติทางชีวเคมีได้แก่ ความสามารถในการใช้น้ำตาล (carbohydrate assimilation test) และความสามารถในการหมักน้ำตาล (fermentation test) จากผลการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อ *Candida* จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดย เทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ตามระบบ API 20 C AUX (bioMerieux, ประเทศฝรั่งเศส) และแบ่งเป็นสปีชีส์ต่างๆดังนี้ *Candida albicans* 46 ไอโซเลต (82.14%), *Candida tropicalis* 5 ไอโซเลต (8.93%), *Candida glabrata* 3 ไอโซเลต (5.36%) และ *Candida famata* 2 ไอโซเลต (3.57%) ในขณะที่ผลจากการทดสอบเพื่อยืนยันชนิดเชื้อ *Candida* จากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่พบ *Candida albicans* 31 ไอโซเลต (64.59%), *Candida tropicalis* 6 ไอโซเลต (12.5%), *Candida glabrata* 4 ไอโซเลต (8.33%), *Candida famata* 4 ไอโซเลต (8.33%) และ *Candida parapsilosis* 3 ไอโซเลต (5.25%) จากผลการศึกษาพบว่าผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำจะมีความชุกของเชื้อรา *Candida* โดยเฉพาะ *C. albicans* ในอัตราที่สูงกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งเชื้อ *C. albicans* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูงที่สุดและเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค Candidiasis

**คำสำคัญ:** *Candida* ความชุก ผู้ที่สูบบุหรี่ ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่

### Abstract

*Candida* is yeast-like fungi, that is a causative agent of candidiasis which occurs in immunocompromised patients, mainly human immunodeficiency virus (HIV) infected patients. In this study, the *Candida* sp. was isolated from oral cavity of smokers comparing with non-smokers, the specimens were plating on Sabouraud dextrose agar (SDA) and then white-creamy colony were observed. 56 yeast isolates from smokers and 48 yeast isolates from non-smokers were collected as *Candida* isolate. The *Candida* isolate were confirmed by germ tube production test and biochemical test by the carbohydrate assimilation test and fermentation test. The result show, the 56 *Candida* isolates from oral cavity of smokers were confirm as *Candida albicans* 46 isolates (82.14%), *Candida tropicalis* 5 isolates (8.93%), *Candida glabrata* 3 isolates (5.36%) and *Candida famata* 2 isolates (3.57%), while the 48 *Candida* isolates from oral cavity of non-smokers were confirm as *Candida albicans* 31 isolates (64.59%), *Candida tropicalis* 6 isolates (12.5%), *Candida glabrata* 4 isolates (8.33%), *Candida famata* 4 isolates (8.33%) and *Candida parapsilosis* 3 isolates (5.25%). The data of this study shown, the prevalence of *Candida* sp. and *Candida albicans* from oral cavity of smokers were higher than non-smokers people.

**Keywords:** *Candida*, smokers, non-smokers

<sup>1</sup>สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

## ความเป็นมาของปัญหา

เชื้อราในเชื้อราจีแนส *Candida* เป็นเชื้อราประเภทยีสต์คล้ายรา ที่มีการ colonize และอยู่แบบ commensal บริเวณเยื่อเมือกในปาก คอ ลำไส้ และทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจตอนต้นและระบบสืบพันธุ์ ของมนุษย์ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราที่สำคัญ เพราะสามารถก่อโรคได้หลายตำแหน่งทั่วร่างกาย และจัดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) นอกจากนี้ยังจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำโดยชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบบ่อยคือ *Candida albicans* *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* เป็นต้น โดยจะสามารถก่อโรคติดเชื้อ *Candida* (Candidiasis) ที่ผิวหนังชั้น mucocutaneous เช่นการติดเชื้อรา *Candida* ที่ช่องปากและช่องคลอด ไปจนถึงการติดเชื้อทั้งระบบ (การติดเชื้อ *Candida* ในกระแสเลือด) เมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอลงอันเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ [1, 4]

บุหรี่ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกม้วนห่อด้วยกระดาษ (ขนาดปกติจะมีความยาวสั้นกว่า 120 มิลลิเมตร และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 10 มิลลิเมตร) มีใบยาสูบหรือชอยบรรจุภายในห่อกระดาษ ปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเปิดสำหรับจุดไฟ และอีกด้านหนึ่งจะมีตัวกรอง ไว้สำหรับใช้ปากสูดควัน คำนี้ปกติจะใช้หมายถึงเฉพาะที่บรรจุใบยาสูบภายใน แต่ในบางครั้งก็อาจใช้หมายถึงมวนกระดาษที่บรรจุสมุนไพรอื่นๆ การสูบบุหรี่ เป็นปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพอนามัยที่สำคัญปัญหาหนึ่งของโลกในปัจจุบัน โรคภัยอันเกี่ยวเนื่องมาจากการสูบบุหรี่อาจบั่นทอนและลดอายุของผู้สูบบุหรี่ โดยเฉลี่ยแล้ว 5-10 ปี ควันยาสูบมีส่วนผสมของสารต่างๆ มากกว่า 4,000 ชนิด ส่วนผสมเหล่านี้มากกว่า 30 ชนิด เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ สารมากกว่า 10 ชนิดทำให้เกิดมะเร็ง เช่น ทาร์ ฟีนอล ครีซอล และเบนโซไพรีน เป็นต้น อีก 10 กว่าชนิดเมื่อสูดเข้าไปจะเป็นพิษ และระคายเคืองต่อหลอดลม และถุงลม ทำให้เกิดโรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง และถุงลมโป่งพอง นอกจากนี้การสูบบุหรี่ยัง เป็นสาเหตุของการเกิดโรค และภาวะความผิดปกติในช่องปากหลายชนิด โดยเฉพาะมะเร็งของลิ้น และริมฝีปาก โรคปริทันต์ และการสูญเสียฟัน ปัจจุบันประเทศไทยมีสถิติจำนวนผู้สูบบุหรี่สูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสวนทางกับอายุของผู้ที่เริ่มต้นสูบบุหรี่ซึ่งน้อยลง โดยผลสำรวจพฤติกรรมกรรมการสูบบุหรี่ของประชากรไทย ปี 2550 ของสำนักงานสถิติแห่งชาติ พบว่า จำนวนผู้สูบบุหรี่เป็นประจำในปี 2550 ในบุคคลที่มีอายุ 15-60 ปี ที่รวมทั้งเพศชายและหญิง เท่ากับ 9,535,484 คน หากไม่มีการรณรงค์แก้ปัญหาใดๆ คาดว่าในปี 2563 จะมีจำนวนผู้สูบบุหรี่ประมาณ 650 ล้านคน

เนื่องจากการสูบบุหรี่อย่างต่อเนื่องเป็นประจำนั้น นอกจากส่งผลทำลายเยื่อเมือกในช่องปากและทางเดินหายใจโดยตรงแล้วยังส่งผลให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลง ซึ่งอาจส่งผลต่อจำนวน และชนิดของเชื้อราจีแนส *Candida* บริเวณช่องปากซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อ *Candida* และเป็นเชื้อมีอัตราการดื้อต่อยาสูง ดังนั้นการศึกษาความชุกและชนิดของเชื้อรา จีแนส *Candida* ในช่องปาก จะทำให้ทราบถึงความชุกและการกระจายตัวที่แท้จริงของเชื้อราจีแนส *Candida* ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ *Candida* รวมไปถึงใช้เป็นแนวทางให้ประชาชนตระหนักถึงการดูแลสุขภาพ เพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นจะส่งผลต่อการพัฒนาประเทศอย่างยั่งยืน

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสำรวจความชุกของเชื้อราจีแนส *Candida* ชนิดต่างๆ ในช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำ เทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ และเพื่อให้ทราบถึงความชุก การกระจายตัวที่แท้จริงของเชื้อราจีแนส *Candida* และสร้างความตระหนักให้แก่ผู้ที่สูบบุหรี่ถึงความเสี่ยงในการเกิดโรค Candidiasis

## วิธีการทดลอง

### 1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ จากตำแหน่งต่างๆ ในช่องปาก ของอาสาสมัคร โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 30 ราย และกลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ จำนวน 30 ราย โดยใช้เกณฑ์การแบ่งกลุ่มตัวอย่างดังนี้คือ

1.1 กลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่ ต้องเป็นผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ปีขึ้นไป

1.2 กลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ต้องเป็นผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่ชนิดใดๆ เลย

ดำเนินการเพาะและบ่มเชื้อที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

### 2. วิธีการศึกษา

#### 2.1 การแยกเชื้อ (isolation)

ทำการแยกเชื้อ *Candida* sp. จากตัวอย่างโดยเพาะเชื้อลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีสีขาวครีม ทำการเก็บเชื้อดังกล่าวไว้เพื่อดำเนินการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

## 2.2 การระบุชนิดของเชื้อ (identification)

### 2.2.1 ทดสอบการสร้าง germ tube (germ tube production)

เป็นวิธีการแยกเชื้อ *C. albicans* ออกจากเชื้อชนิดอื่นในจีส *Candida* ในขั้นต้นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจาก *C. albicans* เป็นเชื้อในจีส *Candida* ที่สามารถพบได้ในปริมาณมาก โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Brain Heart Infusion broth ที่มีส่วนผสมของซีรัมมนุษย์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อ *C. albicans* จะสร้าง germ tube ได้ภายใน 3 ชั่วโมง

### 2.2.2 การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test)

#### 1) ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล (carbohydrate assimilation test)

เนื่องจากเชื้อในจีส *Candida* ชนิดต่างๆมีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆที่แตกต่างกันซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะ โดยการเตรียมเชื้อในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (ปริมาณเชื้อ  $10^7$  cfu/mL) นำเชื้อที่ได้มา spread ลงบนผิวหน้าของ agar plate ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำแผ่นดิสก์ (discs) ที่อิมมัลด้วย น้ำตาลจำนวน 12 ชนิด (dextrose, maltose, sucrose, lactose, galactose, melibiose, cellobiose, inositol, xylose, raffinose, trehalose และ dulcitol) วางลงบนผิวหน้า agar plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเจริญของ เชื้อ *Candida* บริเวณรอบๆแผ่นน้ำตาลแต่ละชนิด [3]

#### 2) ทดสอบความสามารถในการหมัก (fermentation test)

เนื่องจากเชื้อในจีส *Candida* ชนิดต่างๆมีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกัน ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะ โดยการเตรียมเชื้อในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (ปริมาณเชื้อ  $10^7$  cfu/mL) นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 25 µL มาเลี้ยงในอาหารเหลว fermentation medium ซึ่งมีการเติมน้ำตาลแต่ละชนิดเพื่อเป็นแหล่ง คาร์บอน จำนวน 6 ชนิด (dextrose, maltose, sucrose, lactose, galactose and trehalose) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน สังเกต สีของอาหารเหลวที่เปลี่ยนไปและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ [3]

## 2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดย เทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ตามระบบ API 20 C AUX (bioMerieux, ประเทศฝรั่งเศส)

## ผลการทดลอง

### 1. การแยกเชื้อ *Candida* sp. จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่และผู้ที่ไม่สูบบุหรี่

จากการแยกเชื้อ *Candida* sp. จากช่องปากของอาสาสมัครเพศชายจำนวน 60 คน ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มที่สูบบุหรี่จำนวน 30 คน และกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่ จำนวน 30 คน โดยทำการเพาะเชื้อลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโคโลนีที่มีสีขาว-ครีม (White-Creamy Colony) พบโคโลนีที่คาดว่าจะ เป็น *Candida* sp. ที่ แยกได้จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 56 โคโลนีและจากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 48 โคโลนี นำเชื้อทั้งหมดมาทำการตรวจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบเพื่อระบุชนิดของเชื้อ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแยกเชื้อจากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และผู้สูบบุหรี่

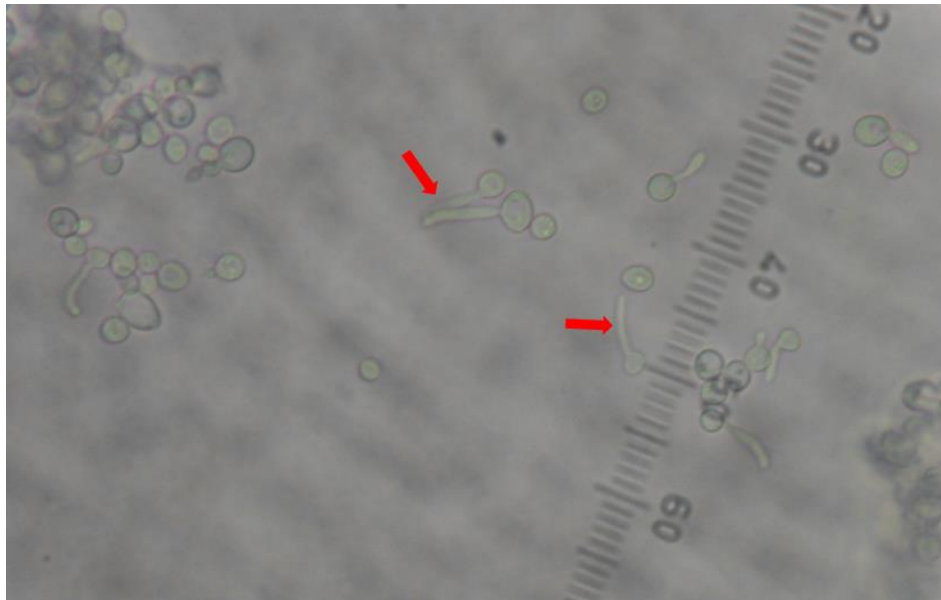
ตัวอย่าง	Total Colony (colony)	White-Creamy Colony (colony)	<i>Candida</i> sp. (isolates)
ผู้สูบบุหรี่ (30 ราย)	6825	56	56
ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ (30 ราย)	8353	48	48

### 2. การทดสอบการสร้าง germ tube

เป็นการทดสอบเพื่อแยกเชื้อ *C. albicans* และ *C. dubliniensis* ออกจากเชื้อ *Candida* ชนิดอื่นเนื่องจาก *C. albicans* และ *C. dubliniensis* มักจะสร้าง Germ tube ได้ในอาหาร BHI ที่ผสม Human serum ได้ภายใน 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) จึงเป็นการช่วยแยกเชื้อ *Candida* บางชนิดได้ในเบื้องต้น พบเชื้อ *Candida* sp. ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่มีความสามารถในการสร้าง Germ tube ภายใน 3 ชั่วโมง จำนวน 47 isolates และพบเชื้อ *Candida* sp. ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่มีความสามารถในการสร้าง Germ tube ภายใน 3 ชั่วโมง จำนวน 29 isolates ดังตารางที่ 2 อย่างไรก็ตามเพื่อความถูกต้องยิ่งขึ้น จำเป็นต้องทำการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลและความสามารถในการหมักน้ำตาลประกอบด้วย

ตารางที่ 2 การทดสอบความสามารถในการสร้าง Germ tube ของ *Candida* sp. จากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และผู้สูบบุหรี่

<i>Candida</i> sp.	Produce Germ tube within 3 Hours			
	Positive		Negative	
	Number of isolates	Percent of Isolates	Number of isolates	Percent of Isolates
ผู้สูบบุหรี่ (56 isolates )	47	83.93	9	16.07
ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ (48 isolates)	29	60.42	19	39.58



ภาพที่ 1 การสร้าง Germ tube ของเชื้อ *C. albicans* และ *C. dubliniensis*

### 3. การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล และความสามารถในการหมัก

เนื่องจากเชื้อในสกุล *Candida* ชนิดต่างๆจะมีความสามารถในการใช้น้ำตาลและความสามารถในการหมัก ที่แตกต่างกัน ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในแต่ละ species เมื่อทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลทั้ง 12 ชนิด (dextrose, maltose, lactose, galactose, melibiose, sucrose, inositol, xylose, raffinose, cellobiose และ trehalose) และทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด (dextrose, maltose, sucrose, lactose, galactose และ trehalose) ทำให้สามารถระบุชนิดของเชื้อ *Candida* ได้ (ดังตารางที่ 3) ซึ่งในการวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ตามระบบ API 20 C AUX (bioMerieux, ประเทศฝรั่งเศส)

ตารางที่ 3 ชนิดของ *Candida* ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่และผู้ที่ไม่สูบบุหรี่

<i>Candida</i> species	ผู้สูบบุหรี่ (n=56)		ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ (n=48)	
	Number of isolates	Percent of Isolates	Number of isolates	Percent of Isolates
<i>Candida albicans</i>	46	82.14	31	64.59
<i>Candida tropicalis</i>	5	8.93	6	12.5
<i>Candida glabrata</i>	3	5.36	4	8.33
<i>Candida famata</i>	2	3.57	4	8.33
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	3	5.25



## อภิปรายผล

เชื้อราในจีส *Candida* จัดเป็น Yeast like fungi ที่มีความสำคัญทางการแพทย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อรา และเป็นสาเหตุของโรค Candidiasis ในระบบต่างๆของร่างกาย อย่างไรก็ตาม *Candida* ทุกชนิดจัดเป็น Normal flora ที่พบได้มากตามช่องปาก ช่องคลอด เยื่อเมือก รวมถึงผิวหนัง *Candida* จึงจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic Pathogen) โดยมักพบการเกิดโรคในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่นในกลุ่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับการรักษาโดยเคมีบำบัด หรือโดยการฉายรังสี ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือแม้แต่ในหญิงตั้งครรภ์ ชนิดของเชื้อจีส *Candida* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมะเร็งที่สุดคือ *Candida albicans* นอกจากนี้ยังมี *Candida* ชนิดอื่นๆที่สามารถก่อโรค Candidiasis ได้เช่น *Candida tropicalis* *Candida krusei* *Candida dubliniensis* *Candida glabrata* และ *Candida parapsilosis* เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อ *Candida* sp. จากช่องปากของอาสาสมัครเพศชาย จำนวน 60 คน ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มที่สูบบุหรี่จำนวน 30 คน และกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 30 คน เมื่อนำเชื้อที่เก็บจากช่องปาก มาเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบโคโลนี สีขาว-ครีม ซึ่งสันนิษฐานในเบื้องต้นว่าเป็นโคโลนีของ *Candida* sp. ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 56 โคโลนี และจากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 48 โคโลนี นำเชื้อทั้งหมดมาทำการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบเพื่อระบุชนิดของเชื้อ

โดยในขั้นแรกได้ทำการทดสอบการสร้าง germ tube เพื่อแยกเชื้อ *C. albicans* และ *C. dubliniensis* ออกจากเชื้อ *Candida* ชนิดอื่นเนื่องจาก *C. albicans* และ *C. dubliniensis* มักจะสร้าง Germ tube ได้ในอาหาร BHI ที่ผสม Human serum ได้ภายในสามชั่วโมง ซึ่งเป็นการช่วยแยกเชื้อ *Candida* ทั้งสองชนิดออกจาก *Candida* ชนิดอื่น พบเชื้อ *Candida* sp. ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่มีความสามารถในการสร้าง Germ tube ภายใน 3 ชั่วโมง จำนวน 47 isolates และพบเชื้อ *Candida* sp. ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่มีความสามารถในการสร้าง Germ tube ภายใน 3 ชั่วโมง จำนวน 29 isolates อย่างไรก็ตาม การทดสอบความสามารถในการสร้าง Germ tube นั้นเป็นการทดสอบในขั้นต้นที่เรียกว่า Presumptive test ดังนั้นผลการทดสอบที่ได้อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง แต่การทดสอบความสามารถในการสร้าง Germ tube ก็เป็นการช่วยให้การศึกษามีความสะดวกรวดเร็ว ลดขั้นตอนในการวิเคราะห์ และยังช่วยให้มีข้อมูลเพื่อประกอบการพิจารณาในการจำแนกชนิดของ *Candida* อีกด้วย

การทดสอบทางชีวเคมีโดยการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล เนื่องจากเชื้อในจีส *Candida* ชนิดต่างๆมีความสามารถในการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกัน อันเนื่องมาจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ต่างกัันนั่นเอง ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในแต่ละ species เมื่อทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลทั้ง 12 ชนิด (dextrose, maltose, lactose, galactose, melibiose, sucrose, inositol, xylose, raffinose, cellobiose และ trehalose) ทำให้สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ในขั้นต้นซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพิจารณาผลการทดลองที่ได้ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล เชื้อในจีส *Candida* ชนิดต่างๆมีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆที่แตกต่างกันซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะ โดยสังเกตได้จากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากค่า pH ที่เปลี่ยน และการเกิดฟองในหลอดดักก๊าซ เมื่อนำเชื้อทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเหลว fermentation medium ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลแต่ละชนิดจำนวน 6 ชนิด (dextrose, maltose, sucrose, lactose, galactose และ trehalose) เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลมาวิเคราะห์ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล พบเชื้อ *Candida* ต่างๆดังนี้ จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำพบเชื้อ *C. albicans* 46 isolates (82.14%), *C. tropicalis* 5 isolates (8.93%), *C. glabrata* 3 isolates (5.36%) และ *C. famata* 2 isolates (3.57%) ในขณะที่จากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่พบ *C. albicans* 31 isolates (64.59%), *C. tropicalis* 6 isolates (12.5%), *C. glabrata* 4 isolates (8.33%), *C. famata* 4 isolates (8.33%) และ *C. parapsilosis* 3 isolates (5.25%) อย่างไรก็ตามการทดสอบทางชีวเคมีนั้นไม่สามารถให้ความแม่นยำได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หากต้องการยืนยันผลการศึกษาคควรทำการทดสอบทางชีวโมเลกุล (Molecular) เช่นการทำ Polymerase chain reaction (PCR) เนื่องจากสามารถให้ผลการทดสอบที่แม่นยำถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เป็นวิธีที่จำเป็นต้องใช้เงินทุนสูง

จากผลการศึกษาการแยกเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบปริมาณและชนิดของเชื้อจีส *Candida* ในช่องปาก พบว่าในช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่อย่างต่อเนื่องเป็นประจำสามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อในจีส *Candida* ในปริมาณที่สูงกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ นอกจากนี้เมื่อนำมาตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆเพื่อระบุชนิด พบว่าเชื้อที่แยกได้จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่ จะพบเชื้อ *C. albicans* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมะเร็งสูงกว่าในช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ สุรัชเดชคุณากร (2538) ได้ทำการศึกษาผลของการสูบบุหรี่ต่อความชุก และการกระจายของเชื้อ *C. albicans* ในช่องปาก โดยทำการแยกเชื้อจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพช่องปากปกติ ซึ่งประกอบด้วยผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำจำนวน 64 ราย และผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 47 ราย

โดยทำการเก็บจากหลายบริเวณในช่องปาก ทำการแยกเชื้อโดยวิธี imprint culture technique พบเชื้อ *C. albicans* 85% จากผู้ที่สูบบุหรี่ และ 48.44% จากผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าในคนปกติที่มีสุขภาพแข็งแรง (healthy people) การสูบบุหรี่เป็นประจำอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่เอื้อต่อการเพิ่มความชุกของเชื้อในจีสแคนดิดาในช่องปาก

พรชัย มาตังคสมบัติ (2549) ซึ่งได้ทำการศึกษา ความชุกของเชื้อราจีส *Candida* ในช่องปากของผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี ในประเทศไทย โดยทำการแยกเชื้อจากช่องปากของอาสาสมัครจำนวน 114 ราย ในจำนวนนี้เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 60 ราย และผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 50 ราย (อายุระหว่าง 20-60 ปี) ซึ่งอาศัยอยู่ในเขตกรุงเทพมหานคร โดยใช้วิธี chlamyospore formation test , carbohydrate fermentation test และ assimilation assays พบความชุกของเชื้อ *C. albicans* 56.7% จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี และ 55.1% จากผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี และพบเชื้อราในจีสแคนดิดาชนิดอื่น (Non-*Candida albicans* (NCAC)) 18.3% จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี และ 30.6% จากผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี แม้ผลการศึกษาจะชี้ให้เห็นว่ามีความแตกต่างไม่มากนักระหว่างความชุกของเชื้อราจีสแคนดิดาใน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวียังคงมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคติดเชื้อ *Candida* อันเนื่องมาจากภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ต่ำกว่าระดับปกติ นอกจากนี้พบว่าผู้ที่ผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อ (prophylaxis) อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ช่วยให้โอกาสของการติดเชื้อแคนดิดาสูงขึ้นโดยมีสาเหตุมาจากการดื้อยา

Tanju Kadir และคณะ (2547) [5] ทำการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างสารอาหารและ ความชุกของเชื้อราจีส *Candida* ชนิดต่างๆโดยทำการแยกเชื้อจากเด็กชาวตุรกีจำนวน 300 คนที่มีอายุระหว่าง 0-12ปี โดยใช้วิธี germ tube test, chlamyospore formation test และ API 20C AUX system พบเชื้อราจีสแคนดิดาจากเด็ก 26 คนที่ดื่มเฉพาะน้ำนมจากอกมารดา และเด็ก 38 คนที่ดื่มน้ำนมจากอกมารดา น้ำนมวัว และรับประทานอาหารเสริม ซึ่งในจำนวนนี้ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *C. albicans* (84.8%) และยังสามารถพบ *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, และ *Candida tropicalis* ซึ่งความชุกที่เกิดขึ้นนอกจากสัมพันธ์กับชนิดของสารอาหารแล้วยังสัมพันธ์กับช่วงอายุของเด็กอีกด้วย

Rozkiewicz และคณะ (2549) [2] ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *C. albicans* โดยทำการแยกเชื้อจากเด็กก่อนวัยเรียน (อายุ 4-7 ปี) ที่ปรากฏหินปูนและแผลในช่องปากจำนวน 102 ราย และจากเด็กในวัยเรียนที่ปรากฏหินปูนและแผลในช่องปากจำนวน 104 ราย (อายุ 12-18 ปี) โดยตัวอย่างจะถูกเพาะลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar และทำการระบุชนิดของเชื้อ โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ด้วยวิธี API 20C AUX (bioMérieux) ผลการศึกษาสามารถแยกเชื้อ *C. albicans* 123 isolates ซึ่งในจำนวนนี้สามารถแยกได้จากบริเวณที่มีหินปูน 61 (49.6%) isolates โดยพบในเด็กก่อนวัยเรียน 26 isolates ( ช่วงอายุ 4-5 ปี 18 isolates และช่วงอายุ 6-7 ปี 8 isolates) และจากเด็กในวัยเรียน 35 isolates ( อายุ 12 ปี 16 isolates และอายุ 18 ปี 19 isolates) ซึ่งการพบความชุกของ *C. albicans* ในเด็กวัยเรียนสูงกว่าวัยก่อนเรียนอาจมีสาเหตุมาจากการประเภทและความหลากหลายของอาหารที่รับประทาน ส่งผลให้การสะสมเศษอาหารมีมากกว่าซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่อยู่ในช่องปาก นอกจากนี้เด็กที่อยู่ในวัยก่อนเรียนมักจะได้รับการดูแลช่องปากและสุขภาพฟันที่ดีกว่าเด็กในวัยเรียนจากผู้ปกครอง พี่เลี้ยง หรือครูผู้สอน ในขณะที่เด็กในวัยเรียนจะได้รับการดูแลจากผู้ปกครองที่น้อยลง และตัวของเด็กในวัยนี้มักละเลยการดูแลสุขภาพในช่องปาก จึงเป็นสาเหตุที่สำคัญของความชุกของ *C. albicans* ที่เพิ่มขึ้น เชื้อที่แยกได้จากบริเวณแผลในช่องปากจำนวน 48 (39.0%) isolates โดยพบในเด็กก่อนวัยเรียน 38 isolates ( ช่วงอายุ 4-5 ปี 19 isolates และช่วงอายุ 6-7 ปี 19 isolates) และจากเด็กในวัยเรียน 35 isolates (อายุ 12 ปี 7 isolates และอายุ 18 ปี 3 isolates) โดยปกติบริเวณแผลนั้นมักมีการสะสมของเชื้อโรคต่างๆโดยเฉพาะแบคทีเรียและเชื้อรา การที่พบความชุกของ *C. albicans* ในเด็กวัยก่อนเรียนสูงกว่าวัยเรียนนั้น สาเหตุหนึ่งที่สำคัญคือระบบภูมิคุ้มกันของเด็กในวัยก่อนเรียน หรือช่วงอายุ 4-7 ปีนั้น จะมีภูมิคุ้มกันที่ต่ำกว่าหรือมีประสิทธิภาพที่น้อยกว่าเด็กในวัยเรียน นอกจากนี้พฤติกรรมต่างๆเช่น การออกกำลังกาย ปริมาณน้ำที่ดื่ม จำนวนครั้งของการกลืนน้ำลาย หรือแม้แต่ชนิดและปริมาณของยาที่ใช้ในการรักษาแผลในช่องปากนั้นสามารถส่งผลต่อปริมาณเชื้อในช่องปาก ได้อีกด้วย และเชื้อที่แยกได้จากบริเวณคอหอยจำนวน 14 (11.4%) isolates โดยพบในเด็กก่อนวัยเรียน 8 isolates (ช่วงอายุ 4-5 ปี 6 isolates และช่วงอายุ 6-7 ปี 2 isolates) และจากเด็กในวัยเรียน 6 isolates (อายุ 12 ปี 3 isolates และอายุ 18 ปี 3 isolates) ความชุกของ *C. albicans* ในบริเวณคอหอยของเด็กในวัยก่อนเรียนและวัยเรียนนั้นใกล้เคียงกัน

## สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อ *Candida* จากช่องปากของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดย เทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ตามระบบ API 20 C AUX (bioMérieux, ประเทศฝรั่งเศส) และแบ่งเป็นสปีชีส์ต่างๆดังนี้ *Candida albicans* 46 ไอโซเลต (82.14%), *Candida tropicalis* 5 ไอโซเลต (8.93%), *Candida glabrata* 3 ไอโซเลต (5.36%) และ

*Candida famata* 2 ไอโซเลต (3.57%) ในขณะเดียวกันผลการทดสอบเพื่อยืนยันชนิดเชื้อ *Candida* จากช่องปากของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ พบ *Candida albicans* 31 ไอโซเลต (64.59%), *Candida tropicalis* 6 ไอโซเลต (12.5%), *Candida glabrata* 4 ไอโซเลต (8.33%), *Candida famata* 4 ไอโซเลต (8.33%) และ *Candida parapsilosis* 3 ไอโซเลต (5.25%) จากผลการศึกษาพบว่าผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำจะมีความชุกของเชื้อราในช่องปาก โดยเฉพาะ *C. albicans* ในอัตราที่สูงกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งเชื้อ *C. albicans* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูงที่สุดและเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค Candidiasis

#### ข้อเสนอแนะ

ควรทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี Polymerase chain reaction เพิ่มเติมหากมีทุนมากพอ เพื่อช่วยยืนยันผลการแยกเชื้อในระดับสปีชีส์ ด้วยวิธีทางโมเลกุลซึ่งมีระดับความน่าเชื่อถือสูงสุด

#### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนวิจัยจาก สำนักงานโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนา มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ปีพ.ศ. 2556

#### เอกสารอ้างอิง

- [1] นงนุช วนิตย์ธนาคม. 2540. **วิทยาเชื้อราการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. พี บี ฟอเรน บুকส์ เซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ.
- [2] D Rozkiewicz , T Daniluk, M L Zaremba, D Cylwik-Rokicka, W Stokowska, M Pawinska, E Dabrowska, G Marczuk-Kolada, D Waszkiel. (2006). Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. **Adv Med Sci**; 51 Suppl 1:187-90.
- [3] Neppelenbroek, K.H., Seo, R.S., Urban, V.M., Silva, S., Dovigo, L.N., Jorge, J.H., Campanha, N.H. (2014). Identification of candida species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral. Dis.** 20(4): 329-44.
- [4] Pumirat. P., Tunyong. W. and Luplertlop. N. (2013). Medical mycology. **Int. J. Med. Health. Sci.** 20(2): 32-44.
- [5] T Kadir, B Uygün and S Akyüz. (2005), Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. **Archives of oral Biology**, 50 (1), 33-7.