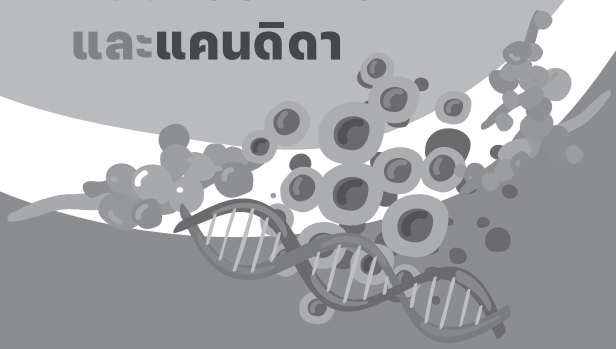
Applications of Molecular Epidemiology in Cryptococcal and Candidal Infections

การประยุกต์ระบาดวิทยาโมเลกุลกับโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสและแคนดิดา

POPCHAI NGAMSKULRUNGROJ
พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์

Applications of Molecular Epidemiology in Cryptococcal and Candidal Infections

การประยุกต์ระบาดวิทยาโมเลกุลกับโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสและแคนดิดา



เรียบเรียงโดย
POPCHAI NGAMSKULRUNGROJ
พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์

ข้อมูลทางบรรณานุกรม
พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์
Applications of Molecular Epidemiology in Cryptococcal
and Candidal Infections
(การประยุกต์ระบาดวิทยาโมเลกุลกับโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสและแคนดิดา)
กรุงเทพฯ: พริ้นท์เอเบิ้ล, พิมพ์ครั้งที่ 1 ก.พ. 2564. 176 หน้า.
ISBN 978-616-577-372-0

หนังสือ: Applications of Molecular Epidemiology in Cryptococcal and Candidal Infections
(การประยุกต์ระบาดวิทยาโมเลกุลกับโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสและแคนดิดา)
บรรณาธิการ: พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์
พิมพ์ครั้งที่ 1 กุมภาพันธ์ 2564 จำนวน 1,000 เล่ม

ราคาเล่มละ 200 บาท

สงวนลิขสิทธิ์ตามพระราชบัญญัติการพิมพ์
ห้ามมิให้ทำซ้ำ ทำสำเนา หรือลอกเลียนแบบโดยมิได้รับอนุญาต

จัดทำโดย: พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์
ที่อยู่: ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2 ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทร 02-419-7053

ออกแบบปก เนื้อใน และพิมพ์ที่: บริษัท พริ้นท์เอเบิ้ล จำกัด
DESIGNED&PRINTED BY PRINTABLE
เลขที่ 285 ซอยพัฒนาการ 53 แขวงพัฒนาการ เขตสวนหลวง กทม. 10250
แฟกซ์ 02-322-5625 กด 11 สอบถามสินค้าและบริการ 094-559-2965
สงวนลิขสิทธิ์ในประเทศไทยตาม พ.ร.บ. ลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2558 **ห้าม คัดลอก ลอกเลียน ดัดแปลง ทำซ้ำ จัดพิมพ์ หรือกระทำอื่นใด โดยวิธีการใด ๆ ในรูปแบบใด ๆ ไม่ว่าส่วนหนึ่งส่วนใดของหนังสือเล่มนี้** เพื่อเผยแพร่ในสื่อทุกประเภท หรือ เพื่อวัตถุประสงค์ใดๆ นอกจากจะได้รับอนุญาต มิเช่นนั้นจะถือว่าละเมิดลิขสิทธิ์ และถูกดำเนินคดีการตามกฎหมายต่อไป

คำนำ

การจัดหมวดหมู่ (classification) นับเป็นหนึ่งในกระบวนการเริ่มต้นที่สำคัญของงานพัฒนาคุณภาพทุกประเภท ไม่ว่าจะเป็นงานพัฒนาคุณภาพด้านการศึกษา การวิจัย หรือการบริการ การจัดหมวดหมู่ที่มีประสิทธิภาพจะนำไปสู่การพัฒนาอย่างตรงจุดและเป็นรูปธรรม โดยหนึ่งในตัวอย่างที่ดีที่สุดคือ การจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตออกเป็นประเภทต่างๆ ตั้งแต่ระดับอาณาจักร (kingdom) เรื่อยลงไปจนถึงระดับสปีชีส์ (species) โดยการจัดหมวดหมู่นี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตแต่ละประเภทได้อย่างมีระเบียบและเป็นรูปธรรม ซึ่งหากไม่มีการจัดหมวดหมู่ที่ดีให้เป็นไปในทางเดียวกันแล้ว การศึกษาสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะมีความยุ่งยากสับสน เนื่องจากนักวิทยาศาสตร์จากแต่ละองค์กรจะไม่สามารถเปรียบเทียบเพื่อแลกเปลี่ยนองค์ความรู้ให้แก่กันและกันได้

อย่างไรก็ตาม ในยุคสมัยที่วิทยาศาสตร์พัฒนาไปอย่างก้าวกระโดด การจัดหมวดหมู่ลงไปจนถึงระดับสปีชีส์นั้นไม่เพียงพอต่อการศึกษาเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตอีกต่อไป ทำให้เกิดการจัดหมวดหมู่ให้ลึกลงไปถึงระดับสายพันธุ์ (strain) ด้วยวิธีการจำแนกโมเลกุล (molecular typing) วิธีนี้สามารถทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถจัดหมวดหมู่และแบ่งประเภทเชื้อก่อโรคได้ละเอียดมากขึ้น ทำให้การติดตามด้านระบาดวิทยามีความจำเพาะและตรงจุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดในปัจจุบัน คือ การระบาดของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ก่อโรคโควิด-19 ที่ก่อการระบาดทั่วโลกตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2563 หากนักวิทยาศาสตร์ใช้การจัดหมวดหมู่ลงไปถึงเพียงระดับสปีชีส์ ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2563 นักวิทยาศาสตร์ก็คงไม่สามารถตรวจพบการกำเนิดของเชื้อ SARS-CoV-2 สายพันธุ์ใหม่ของประเทศอังกฤษ ที่มีความสามารถในการแพร่เชื้อมากกว่าปกติ การที่สามารถตรวจพบสายพันธุ์ใหม่ดังกล่าวได้ทำให้ทั่วโลกสามารถออกมาตรการเฝ้าระวังผู้เดินทางจากประเทศอังกฤษทุกรายและสามารถควบคุมไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดที่มากขึ้นของโรคโควิด-19 ได้ รวมถึงการที่ประเทศไทยสามารถตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้จากกลุ่มคนอังกฤษในสถานกักกันที่รัฐจัดให้ (state quarantine) และทำการแยกโรค (isolation) ผู้ป่วยได้ทันท่วงที

สำหรับราก่อโรคในคนที่มีการศึกษาโดยวิธีการจำแนกโมเลกุลมากที่สุด ได้แก่ ราในยีนัส *Cryptococcus* และ *Candida* ซึ่งราทั้งสองยีนัส (genus) นี้พบเป็นสาเหตุบ่อยที่สุดของโรคติดเชื้อราชั้นลึกในคน (deep fungal infection) จึงเป็นรากลุ่มที่มีข้อมูลพื้นฐานของการจำแนกโมเลกุลมากที่สุด

ในหนังสือเล่มนี้ ผู้เขียนได้รวบรวมข้อมูลที่เป็นปัจจุบันเพื่อให้บุคลากรทางการแพทย์ นักระบาดวิทยา และผู้สนใจราก่อโรคในคน ได้ติดตามความก้าวหน้าของการจำแนกโมเลกุลของรา ราในยีนัส *Cryptococcus* และ *Candida* เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการจัดหมวดหมู่ด้วยวิธีการจำแนกโมเลกุลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการบริหารจัดการโรคติดเชื้อราในหลากหลายมิติ ได้แก่ การจัดหมวดหมู่ตามอนุกรมวิธาน (taxonomy) การศึกษาทางระบาดวิทยาโมเลกุล (molecular epidemiology) การหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคและการดื้อยาต้านเชื้อรากับ genotype ของเชื้อรา สำหรับเนื้อหาของหนังสือสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง โดยช่วงแรก (บทที่ 1-2) เป็นข้อมูลพื้นฐานของยีนัส *Cryptococcus* และ *Candida* ช่วงที่สอง (บทที่ 3-4) เป็นข้อมูลความชุกของแต่ละ genotype ในส่วนต่าง ๆ ของโลก ช่วงที่สาม (บทที่ 5-6) เป็นการประยุกต์ใช้การจำแนกโมเลกุลในการศึกษาระบาดวิทยา การก่อโรค และการดื้อยาของราทั้งสองยีนัส โดยบทที่ 5 จะนำเสนอในรูปแบบของคำถามวิจัยเพื่อทำให้เข้าใจและนำไปใช้ได้ง่าย

นอกจากนี้ผู้เขียนยังได้มีการนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของตารางและรูปภาพเพื่อเสริมความเข้าใจกว่า 40 รายการ โดยในส่วนของความชุกของแต่ละ genotype ของราทั้งสองยีนัสผู้เขียนได้นำเสนอข้อมูลในระดับโลกที่เป็นปัจจุบันที่สุด และมีการนำเสนอในรูปแบบของเกร็ดความรู้เพื่อเสริมความเข้าใจในเนื้อหาเฉพาะบางประการอีกด้วย เช่น ในบทที่ 5 และ 6 ซึ่งเป็นบทที่แสดงถึงการประยุกต์ใช้การจำแนกโมเลกุลในการบริหารจัดการโรคติดเชื้อแคนดิดาและคริปโตคอคคัส โดยข้อมูลทั้งหมดในหนังสือเล่มนี้มีเอกสารอ้างอิงที่รวบรวมไว้ถึงกว่า 300 รายการ ซึ่งรวมถึงผลงานวิจัยของผู้เขียนที่ได้เผยแพร่ในฐานข้อมูลวิชาการระดับนานาชาติรวมกว่า 30 เรื่อง ในระยะเวลากว่า 10 ปีที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน เพื่อให้ผู้อ่านสามารถค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไปได้

อย่างไรก็ดี เนื่องด้วยหนังสือเล่มนี้เป็นหนังสือวิชาการทางการแพทย์ที่เน้นไปทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน จึงทำให้มีศัพท์เฉพาะหรือศัพท์เทคนิคเป็นจำนวนมาก แม้ว่าผู้เขียนจะพยายามเลือกใช้คำภาษาไทยให้มากที่สุดและใส่คำภาษาอังกฤษกำกับไว้ตามความเหมาะสมแล้ว แต่ในกรณีของคำเฉพาะกลุ่มที่ไม่มีคำภาษาไทยที่บัญญัติไว้ในพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2554 หรือเป็นคำที่ไม่คุ้นชินหากจะเขียนด้วยภาษาไทย ผู้เขียนขออนุญาตเขียนด้วยคำภาษาอังกฤษ โดยเฉพาะที่เป็นชื่อทางวิทยาศาสตร์ เช่น ชื่อเชื้อ ยาต้านเชื้อรา โครงสร้างและยีนของเชื้อรา เทคนิคการทดสอบต่างๆ เช่น เขียนว่า ergosterol แทนการเขียนว่าเออโกสเตอรอล เป็นต้น นอกจากนี้ ผู้เขียนขอเลือกใช้การเขียนสัญลักษณ์ % แทนคำว่าร้อยละในหนังสือเล่มนี้ เนื่องจากเนื้อหาในหนังสือเล่มนี้มีข้อมูลของความชุกเป็นปริมาณมาก หากเขียนด้วยคำว่าร้อยละจะทำให้ผู้อ่านเกิดความสับสนระหว่างตัวเลขร้อยละกับจำนวนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตารางความชุกที่มีการเขียนจำนวนและร้อยละไว้ด้วยกันเสมอ

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ข้อมูลและบทวิเคราะห์ในหนังสือเล่มนี้ จะช่วยเป็นแนวทางให้นักวิทยาศาสตร์ที่สนใจการศึกษาระบาดวิทยาโมเลกุลของราก่อโรคด้วยวิธีการจำแนกโมเลกุล มีความเข้าใจอย่างลึกซึ้งและสามารถนำความรู้ที่ได้ไปออกแบบงานวิจัยด้านระบาดวิทยาโมเลกุลที่สามารถตอบคำถามวิจัยเพื่อประโยชน์ของผู้ป่วยและประชาชนในประเทศไทยได้อย่างตรงจุดและมีประสิทธิภาพต่อไป

พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์

กิตติกรรมประกาศ

หนังสือเล่มนี้ ผู้เขียนได้นิพนธ์ขึ้นจากการประสบการณ์และมุมมองด้านวิชาการในฐานะนักวิจัยด้านระบาดวิทยาโมเลกุลที่ทำวิจัยเกี่ยวกับยีสต์ก่อโรคในคนโดยเฉพาะ *Cryptococcus* spp. และ *Candida* spp. มานานกว่า 10 ปี และในฐานะนักจุลชีววิทยาคลินิกตำแหน่งผู้จัดการคุณภาพของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้เขียนจึงขอขอบพระคุณทั้งอาจารย์ หัวหน้า และบุคลากรต่างๆ ที่มีส่วนร่วมในการสอน การอภิปราย และแลกเปลี่ยนเรียนรู้ประสบการณ์ร่วมกันมาโดยตลอด

ผู้เขียนขอขอบคุณครูผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ด้านการทำวิจัยทุกท่าน Professor Dr. Wieland Meyer และ Professor Tania Sorrel แห่ง University of Sydney at Westmead Hospital ประเทศออสเตรเลีย อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้โอกาสผู้เขียนได้เรียนรู้ว่านักระบาดวิทยาโมเลกุลระดับโลกนั้นมีวิธีการคิด วิธีการทำงานและการวิจัยอย่างไร

ผู้เขียนขอขอบคุณ Professor Dr. John Perfect แห่ง Duke University ประเทศสหรัฐอเมริกา ผู้ที่สอนให้ผู้เขียนได้รู้ว่างานวิจัยด้านราวิทยาของแพทย์ระดับโลกนั้นได้มาด้วยการ “แบ่งปัน” ไม่ใช่ “การครอบครอง” Dr. June Kwon-Chung แห่ง National Institute of Health ประเทศอเมริกา ผู้ที่สอนให้ผู้เขียนได้รู้ว่านักวิจัยราวิทยามือหนึ่งของโลกนั้น “ไม่เคยหยุดเดิน” Dr. Yun Chang แห่ง National Institute of Health ประเทศอเมริกา ผู้ที่ประสิทธิ์ประสาทสิ่งที่สำคัญที่สุดในชีวิตนักวิจัยและครูของผู้เขียนด้วยคำสอน “be critical” ได้แก่ การมี scientific และ critical thinking และให้เข้มงวดกับตัวเองมากกว่าเข้มงวดกับผู้อื่นเสมอ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ภัทรชัย กีรติสิน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่เป็นทั้งรุ่นพี่และ mentor ในด้านจุลชีววิทยาคลินิกและด้านแพทยศาสตร์ศึกษา ผู้มีส่วนให้ความเป็นครูของผู้เขียนมีความสมบูรณ์ขึ้น

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชรี กัมมารเจษฎากุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียว, ผู้ช่วยศาสตราจารย ดร. กานต์รวี ขยัน คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา, อาจารย์ แพทย์หญิงสุวัชรีพร โรจน์ชีวพันธ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ดร. อรพรรณ ศรีพิชัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, คุณอรวรรณ ตุลยประวัติ และ ดร. สุจิรพงษ์ ภาคจักษุ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยตรวจทานต้นฉบับของหนังสือเล่มนี้

พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์

คำนิยม

“เชื้อราเหมือนยาขม” เป็นคำที่ได้ยินบ่อย ๆ ตั้งแต่ระดับนักศึกษา ไปจนถึงแพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อ การวินิจฉัยและรักษาโรคติดเชื้อนั้นต่างจากโรคอื่น ๆ ทั้งหมด เนื่องด้วยกำลังต่อสู้กับสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่ง ที่พร้อมจะเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อตอบโต้ต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายคนและยาต้านจุลชีพได้ตลอดเวลา กระบวนการคิดและปฏิบัติต่อสิ่งที่มีพลวัตสูงเช่นนี้ย่อมไม่ง่าย

ในขณะที่บุคลากรทางการแพทย์คุ้นเคยกับเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งพบผู้ป่วยได้บ่อย และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เชื้อราซึ่งพบการติดเชื้อน้อยกว่า มีการศึกษาน้อยกว่า จึงมักเป็นเรื่องยาก หรือ ยาขม แต่ “มิได้แปลว่าสำคัญน้อยกว่า” ในทางตรงกันข้าม เรื่องที่ยังไม่รู้กลับสร้างความท้าทายมากขึ้น เนื่องด้วยโรคติดเชื้อรามีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังเริ่มพบปรากฏการณ์ที่มีการติดเชื้อในคนที่มีสุขภาพปกติได้มากขึ้น เชื้อมีการดื้อยาที่เพิ่มขึ้น ความรู้เกี่ยวกับระบาดวิทยา การวินิจฉัยและรักษาโรคติดเชื้อรา จึงนับเป็นสิ่งหนึ่งที่ “ต้องรู้” ในเวชปฏิบัติ

การนำความรู้พื้นฐานมาประยุกต์เพื่อใช้ได้จริง และสำคัญที่สุดคือ ทำให้เข้าใจได้ง่าย ต้องอาศัยผู้ที่มีองค์ความรู้ทั้งในเชิงลึกและมองได้มุมกว้าง ประกอบกับต้องมีทักษะหลายอย่างที่สะสมมาด้วยประสบการณ์ หนังสือเรื่อง “การประยุกต์ระบาดวิทยาโมเลกุลกับโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสและแคนดิดา” เล่มนี้ เป็นอีกหนึ่งผลงานที่ทรงคุณค่า เน้นความเข้าใจตั้งแต่ระดับพื้นฐาน การจำแนกกลุ่มเชื้อรา ระบาดวิทยาของเชื้อ และการประยุกต์ใช้ในเวชปฏิบัติสำหรับเชื้อราที่นับได้ว่ามีความสำคัญในการก่อโรคในคนมากที่สุดสองชนิด คือ คริปโตคอคคัสและ แคนดิดา โดยผู้นิพนธ์ได้รวบรวมองค์ความรู้ที่ได้ศึกษามาด้วยตนเอง และประสบการณ์ที่ได้ทำงานวิจัยร่วมกับนักวิจัยระดับโลกที่เชี่ยวชาญในด้านนี้โดยตรง นำมาถ่ายทอดเป็นบทความและบทวิเคราะห์ที่เข้าใจง่าย ทันสมัย เหมาะสำหรับนักศึกษาและบุคลากรทางการแพทย์ที่สนใจเกี่ยวกับเชื้อราทั้งสองชนิดนี้

ข้าพเจ้าขอแสดงความชื่นชมอย่างยิ่ง ที่ รศ. ดร. นพ. พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์ ได้ใช้ความอุตสาหะและมุ่งมั่นที่จะนิพนธ์หนังสือที่เป็นประโยชน์ เป็นที่ต้องการอย่างมากสำหรับวงการแพทย์และผู้สนใจในด้านนี้ ข้าพเจ้าเชื่อมั่นว่า ผู้อ่านจะได้เรียนรู้และนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาวิจัย และดูแลผู้ป่วยได้ต่อไปเป็นอย่างดี เมื่อท่านผู้อ่านมองสิ่งที่ยังไม่รู้เป็นความท้าทาย หนังสือเล่มนี้จึงเป็นหนึ่งในกุญแจที่จะช่วยตอบโจทย์ความท้าทายนั้น สาระที่ดีและน่าสนใจจากหนังสือเล่มนี้ จะทำให้ท่านไม่คิดว่า เชื้อรา เป็น ยาขม อีกต่อไป

ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ภัทรชัย กีรติสิน
ผู้อำนวยการสถาบันบริหารจัดการเทคโนโลยีและนวัตกรรม
อดีตหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้นิพนธ์

ดร. นายแพทย์พบชัย งามสกุลรุ่งโรจน์
รองศาสตราจารย์
รองหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา และผู้จัดการคุณภาพห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตร์บัณฑิต	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
อนุมัติบัตร สาขาพยาธิวิทยาคลินิก	แพทยสภา
Doctor of Philosophy (Medicine)	University of Sydney at Westmead Hospital (NSW, Australia)
Postdoctoral Fellowship	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health (MD, USA)
AMEE-ESME Certificate in Medical Education	Association for Medical Education in Europe (Dundee, Scotland, UK)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญรูป	IX
สารบัญตาราง	X
สารบัญเกร็ดความรู้	XI
บทที่ 1 *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex	1
บทที่ 2 *Candida* spp.	41
บทที่ 3 ระบาดวิทยาโมเลกุลของ *Cryptococcus neoformans/ C. gattii* species complex	67
บทที่ 4 ระบาดวิทยาโมเลกุลของ *Candida* spp.	93
บทที่ 5 การใช้การจำแนกโมเลกุลในการศึกษาระบาดวิทยาโมเลกุลของยีสต์ก่อโรค	105
บทที่ 6 การทำนายความไวต่อยาต้านเชื้อราด้วยวิธีจำแนกโมเลกุล	143
ดัชนี	163
ภาคผนวก ภาพประกอบ 4 สี	166

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.1	*Cryptococcus neoformans* แสดงยีสต์แตกหน่อรูปกลม	1
รูปที่ 1.2	การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	4
รูปที่ 1.3	Basidiospores ของ *C. gattii*	5
รูปที่ 1.4	พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อคริปโตคอคคัส	8
รูปที่ 1.5	โครงสร้างแคปซูลของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	12
รูปที่ 1.6	ตำแหน่งของเมลานินในผนังเซลล์ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	14
รูปที่ 1.7	รูปแสดง ก) การย้อมสีแกรม และ ข) India ink preparation ของ *C. neoformans/ C. gattii* species complex	23
รูปที่ 1.8	รูปแสดง ก) Latex agglutination assay และ ข) Lateral flow assay สำหรับ การตรวจหาแอนติเจนจำเพาะของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	24
รูปที่ 1.9	การเจริญของ *C. neoformans/C. gattii* species complex บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	26
รูปที่ 2.1	*Candida albicans* ในขณะที่มีการแตกหน่อและสร้างสายรา	41
รูปที่ 2.2	การสร้างไบโอฟิล์มใน *Candida* spp.	49
รูปที่ 2.3	การเจริญของ *C. albicans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	55
รูปที่ 3.1	การแยก molecular type ของ *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex	70

		หน้า
รูปที่ 5.1	การเกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเดียวกัน (same-sex mating) เปรียบเทียบกับ haploid fruiting	126
รูปที่ 5.2	การเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคในหนูทดลองของสายพันธุ์ของชนิด VGIIa เทียบกับสายพันธุ์ของชนิด VGIIb	132
รูปที่ 5.3	การเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคในหนูทดลองของสายพันธุ์ของชนิด VGIIa เทียบกับสายพันธุ์ของชนิด VGIIb เฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้จากคน	133
รูปที่ 5.4	การเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคในหนูทดลองของสายพันธุ์ของชนิด VGIIa เทียบกับสายพันธุ์ของชนิด VGIIb เฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม	133

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	ความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์, variety, serotype และ molecular type ใน *C. neoformans/C. gattii* species complex	7
ตารางที่ 1.2	ความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ของคริปโตคอคคัสกับภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในคน	9
ตารางที่ 1.3	กลไกการควบคุมการเจริญที่อุณหภูมิ 37 °C ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	15
ตารางที่ 1.4	ผลการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของสายพันธุ์เพศแอลฟาและสายพันธุ์เพศเอใน molecular type ต่างๆ ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	17
ตารางที่ 1.5	การให้ยารักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสชนิดต่างๆ	28
ตารางที่ 2.1	ความชุกของ *Candida* spp. สปีชีส์ต่างๆ ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ ในทวีปเอเชียระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554	43
ตารางที่ 2.2	ความชุกของ *Candida* spp. ที่ก่อโรคติดเชื้อในเลือดในภูมิภาคต่างๆ ของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543	44
ตารางที่ 2.3	ความชุกของ *Candida* spp. ที่ก่อโรคติดเชื้อในเลือดในประเทศไทย	45
ตารางที่ 2.4	*Candida* spp. ที่สามารถแปลผลความไวต่อยาต้านเชื้อราด้วย clinical breakpoint (CBP) ได้	56
ตารางที่ 2.5	ความชุกของการดื้อยาของเชื้อแคนดิดาสปีชีส์ต่างๆ ที่แยกได้ในทวีปแอฟริกา	57
ตารางที่ 2.6	ความชุกของการดื้อยาของเชื้อแคนดิดาสปีชีส์ต่างๆ ในประเทศไทย	58
ตารางที่ 2.7	การรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาตามแนวทางของ IDSA ปี พ.ศ. 2559	59
ตารางที่ 3.1	ความสัมพันธ์ระหว่าง AFLP type และ molecular type ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	71
ตารางที่ 3.2	ความชุกของ molecular type ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex ในแต่ละทวีป	74
ตารางที่ 3.3	การศึกษาโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสที่เกิดจาก *C. gattii* ในประเทศต่างๆ	77
ตารางที่ 3.4	ระบาดวิทยาโมเลกุลของ *C. neoformans/C. gattii* species complex ในทวีปเอเชีย	79
ตารางที่ 3.5	การแจกแจงความชุกของ molecular type ในแต่ละประเทศของแถบละตินอเมริกา	83
ตารางที่ 3.6	ความชุกของแต่ละ molecular type ในยุคก่อนการระบาดของเชื้อเอชไอวีแยกตามแหล่งที่แยกเชื้อ *C. neoformans/C. gattii* species complex ได้	86
ตารางที่ 3.7	ความชุกของแต่ละ molecular type ในประเทศไทยแยกตามแหล่งที่แยกเชื้อ *C. neoformans/C. gattii* species complex ได้	83
ตารางที่ 3.8	ความชุกของแต่ละ molecular type ที่ติดเชื้อในคน *C. neoformans/C. gattii* species complex ในประเทศไทยแยกตามภาวะการติดเชื้อเอชไอวี	87
ตารางที่ 4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างภูมิภาคกับ clade ต่างๆ ของ *Candida albicans*	95
ตารางที่ 4.2	รายชื่อยีนที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแคนดิดาสปีชีส์ต่างๆ	96

		หน้า
ตารางที่ 4.3	ความชุกของแต่ละ MLST clade ของ *C. albicans* แยกตามภูมิภาคหรือประเทศ	98
ตารางที่ 4.4	ตารางแจกแจงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Candida tropicalis* ในประเทศต่างๆ ด้วย MLST	100
ตารางที่ 5.1	รายงานการติดเชื้อแคนดิดาดื้อยาในปี พ.ศ. 2562 ของประเทศสหรัฐอเมริกา	108
ตารางที่ 5.2	การเปรียบเทียบ *C. neoformans/C. gattii* species complex ที่ก่อการระบาดกับเชื้อประจำถิ่น	110
ตารางที่ 5.3	ความแตกต่างของคุณสมบัติต่าง ๆ ระหว่าง molecular type ต่าง ๆ ของ *C. gattii*	111
ตารางที่ 5.4	ความสัมพันธ์ระหว่าง molecular type และ 7 สปีชีส์ใหม่ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex	113
ตารางที่ 5.5	เหตุผลในการเสนอ *C. neoformans* species complex และ *C. gattii* species complex แทนการใช้ชื่อ 7 สปีชีส์	114
ตารางที่ 5.6	ความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *C. gattii* ที่แยกได้จากเกาะแวนคูเวอร์	122
ตารางที่ 5.7	ความสามารถในการแสดงออกของปัจจัยก่อโรคของสายพันธุ์ VGIIa และ VGIIb	129
ตารางที่ 6.1	ความแตกต่างของค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยาต้านเชื้อราชนิดต่างๆ ของแต่ละ molecular type	144
ตารางที่ 6.2	ความไวต่อยาต้านเชื้อราของ molecular type ต่างๆ โดยแสดงเป็นค่าฐานนิยม (mode) ของ MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	145
ตารางที่ 6.3	Molecular type ของ *C. neoformans/C. gattii* species complex ที่มีการกำหนดค่า ECV ตามเกณฑ์ของ CLSI เอกสาร M57Ed2	147
ตารางที่ 6.4	สาเหตุของการกำเริบของโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัสในเยื่อหุ้มสมองระหว่างการได้รับ fluconazole เพื่อป้องกันการติดเชื้อ	148
ตารางที่ 6.5	ยีนที่มีผลต่อการดื้อ fluconazole บนโครโมโซมที่มีการทำซ้ำ	149
ตารางที่ 6.6	กลไกการดื้อยาในกลุ่ม azole ของ *Candida* spp.	151
ตารางที่ 6.7	ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดโมเลกุลกับความไวต่อยาต้านเชื้อราใน *Candida tropicalis* และ *Candida albicans*	152
ตารางที่ 6.8	การเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ทำให้เกิดการดื้อ azole ใน *Candida* spp.	155
ตารางที่ 6.9	ความชุกของการเปลี่ยนกรดอะมิโนของยีนส์ ERG11 ในสายพันธุ์ดื้อยาของ *C. albicans*	156
ตารางที่ 6.10	ตำแหน่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ได้รับการพิสูจน์แน่ชัดแล้วว่ามีผลทำให้เกิดการดื้อ azole ใน *C. albicans*	158

สารบัญเกร็ดความรู้

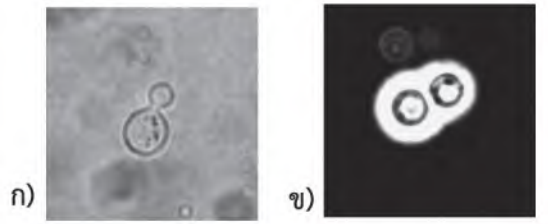
	หน้า
เกร็ดความรู้ที่ 1.1: ความหมายของสายพันธุ์	3
เกร็ดความรู้ที่ 5.1: Molecular typing	110
เกร็ดความรู้ที่ 5.2: Environmental surveillance	117
เกร็ดความรู้ที่ 5.3: การทดสอบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ	123
เกร็ดความรู้ที่ 5.4: การทดสอบการสร้างเมลานิน	129
เกร็ดความรู้ที่ 5.5: การทดสอบการสร้างแคปซูล	131
เกร็ดความรู้ที่ 5.6: การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในหนูทดลองด้วยการใส่เชื้อเข้าปอด	134
เกร็ดความรู้ที่ 6.1: Epidemiological Cutoff Value (ECV)	146
เกร็ดความรู้ที่ 6.2: ความสัมพันธ์ระหว่างการจำแนกโมเลกุลกับความไวต่อยาต้านเชื้อรา	154

1

CHAPTER

Cryptococcus neoformans/ C. gattii species complex

Cryptococcus neoformans/C. gattii species complex เป็นราก่อโรคคริปโตคอคคัส (cryptococcosis) ในคนและสัตว์ เช่น สุนัข และแมว เป็นต้น[1] ผู้ป่วยทั่วโลกจำนวนมากกว่า 90% เกิดจากการติดเชื้อ *C. neoformans* นอกจาก *C. neoformans* จะเป็นสปีชีส์ที่พบก่อโรคมากที่สุดแล้ว ยังพบว่ามักก่อโรคในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีด้วย[2] จะเห็นได้ว่าความชุกของ cryptococcosis ทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นหลังจากการระบาดของโรคติดเชื้อเอชไอวีหลังจากปี พ.ศ. 2523 ราชนิดนี้จัดอยู่ใน phylum Basidiomycota ประกอบด้วยราสองสปีชีส์ ได้แก่ *C. neoformans* และ *C. gattii* ในธรรมชาติราทั้งสองสปีชีส์นี้อาศัยอยู่ในรูปของยีสต์ รูปร่างกลมมีแคปซูลหุ้มล้อมรอบ ดังรูปที่ 1.1 ขนาดประมาณ 5 ไมครอน และอาจใหญ่ได้ถึง 15 ไมครอนเมื่อสร้างแคปซูลหนา และบางเซลล์อาจมีขนาดถึง 100 ไมครอนได้ขณะก่อโรคในปอด[3, 4]



รูปที่ 1.1 *Cryptococcus neoformans* แสดงยีสต์แตกหน่อรูปกลม ก) wet preparation ในน้ำเกลือ normal saline แสดงยีสต์แตกหน่อรูปกลม (ไม่เห็นแคปซูล) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า; ข) India ink preparation แสดงยีสต์แตกหน่อรูปกลมมีแคปซูลล้อมรอบ ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า

การสืบพันธุ์

ในธรรมชาติ *C. neoformans/C. gattii* species complex จะเจริญในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) เป็นเซลล์ยีสต์มีแคปซูลล้อมรอบ พบการแตกหน่อ แต่ไม่พบการสร้างสายรา อย่างไรก็ตามเมื่อ *C. neoformans/C. gattii* species complex มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เชื้อจะมีการสร้างสายราและ basidiospore จึงมีชื่อเรียกในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) นี้ว่า *Filobasidiella neoformans*[5] สำหรับ *C. neoformans* และ *F. bacillispora* สำหรับ *C. gattii*[6, 7]

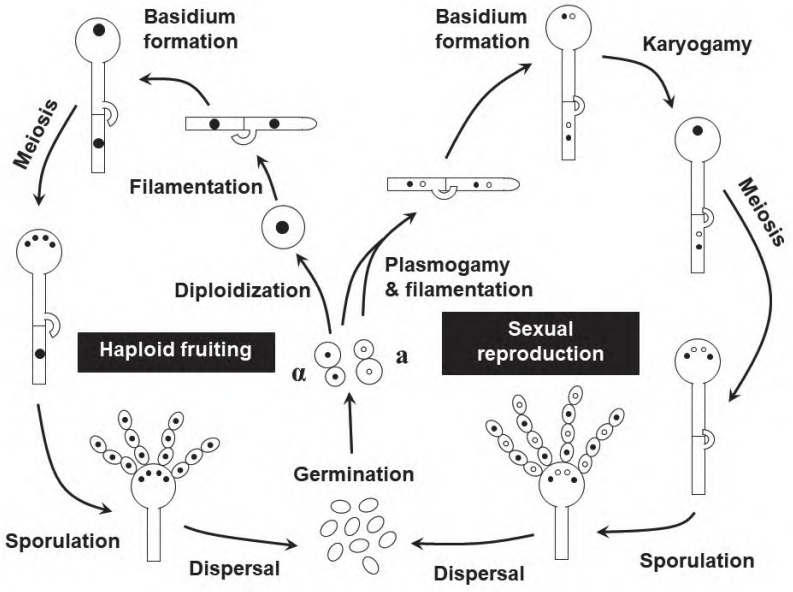
C. neoformans/C. gattii species complex มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยแบบอาศัยเพศ เชื้ออาศัยระบบเพศ 2 ชนิด ได้แก่ เพศแอลฟา (α mating type) และเพศเอ (a mating type) จากการกระตุ้นให้เชื้อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อสามารถสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spores) ที่เรียกว่า basidiospores ได้[5, 6] อย่างไรก็ตามยังไม่มีการพบหลักฐานของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในธรรมชาติแต่เชื่อกันว่าส่วนใหญ่ในธรรมชาติ *C. neoformans/C. gattii* species complex มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (budding)[2]

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดจากการผสมพันธุ์กันของสายพันธุ์เพศแอลฟาและสายพันธุ์เพศเอ ผ่านกระบวนการ plasmogamy, karyogamy และ meiosis เช่นเดียวกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราในไฟลัม Basidiomycota (รูปที่ 1.2) โดยลักษณะ basidiospore ของ *F. neoformans* จะมีรูปร่างกลมต่อกันเป็นสี่สายออกมาจาก basidium[5] ในขณะที่ *F. bacillispora* จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ต่อกันเป็นสี่สายออกมาจาก basidium[5] ตัวอย่างเช่น การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของสายพันธุ์ *C. gattii* molecular type VGI หรืออาจพบเป็นสปอร์เดี่ยวๆ สี่สปอร์ก็ได้ ตัวอย่างเช่น การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของสายพันธุ์ *C. gattii* molecular type VGII[8] (รูปที่ 1.3)

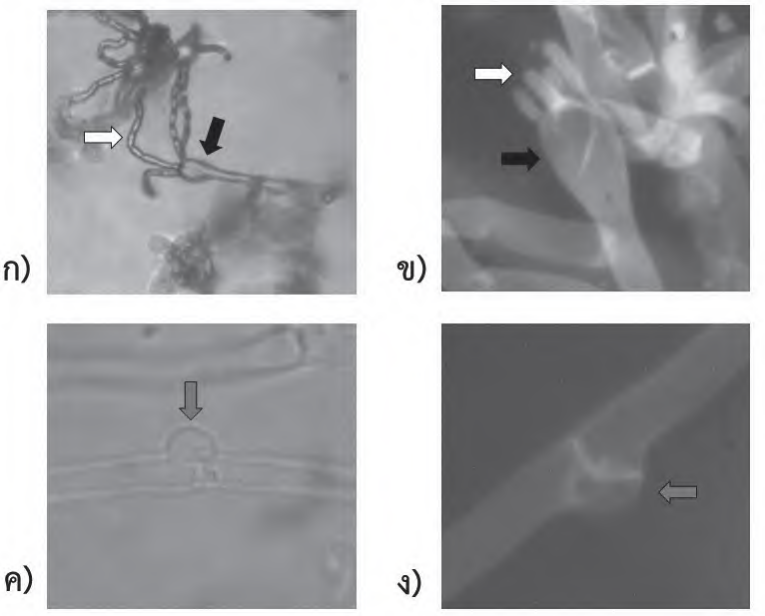
เกร็ดความรู้ที่ 1.1: ความหมายของสายพันธุ์

สายพันธุ์ (strain) โดยทั่วไปมีความหมายถึงชนิดของจุลชีพที่มีความละเอียดลงไปมากกว่าระดับสปีชีส์[9] อาจจะหมายถึงเชื้อเพียงตัวเดียวหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งก็ได้ มักใช้ในกรณีที่ต้องการกล่าวถึงเชื้อตัวใดตัวหนึ่งหรือกลุ่มจำเพาะใดกลุ่มจำเพาะหนึ่งที่ยังไม่มีการกำหนดชื่อมาตรฐานในสปีชีส์นั้นๆ เช่น *C. neoformans* var. *grubii* สายพันธุ์ A โดยหากในอนาคตมีการจำแนกสายพันธุ์ A นี้ด้วยวิธีมาตรฐานเพิ่มเติมก็จะมีการเพิ่มข้อมูลชนิดนั้นๆ ลงไป แต่จะยังคงชื่อสายพันธุ์ A ไว้นอกจากต้องการพูดถึงเชื้อตัวนั้นๆ เท่านั้น เช่น *C. neoformans* var. *grubii* molecular ชนิด VNI sequence type 1 สายพันธุ์ A เป็นต้น

อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติจะกล่าวเพียงชื่อสปีชีส์และสายพันธุ์เท่านั้น เช่น *C. neoformans* สายพันธุ์ A โดยมักใช้ชื่อสายพันธุ์เป็นชื่อเดียวกับชื่อที่ผู้ค้นพบสายพันธุ์นี้เป็นคนตั้งไว้ เช่น *C. neoformans* สายพันธุ์ H99, *C. neoformans* สายพันธุ์ WM148, *C. gattii* สายพันธุ์ R265 และ *C. gattii* สายพันธุ์ NIH444 เป็นต้น



รูปที่ 1.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *C. neoformans/C. gattii* species complex; haploid fruiting เริ่มจากสายพันธุ์แอลฟา (α mating type) เกิดกระบวนการทำซ้ำของโครโมโซมเป็นสองชุด (diploidization) สร้างสายรายืดยาวออกไป (filamentation) จากนั้นมีการสร้าง basidium ตรงปลายสายรา (basidium formation) และเกิดกระบวนการ meiosis ในเซลล์ basidium และสร้างสาย basidiospore (sporulation) สี่สายที่ประกอบไปด้วยเพศแอลฟาเท่านั้น สุดท้าย basidiospore จะกระจายออกสู่ธรรมชาติ (dispersal) และงอก (germination) เป็นเซลล์ยีสต์อีกครั้ง; การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เริ่มจากการเชื่อมรวมกันของไซโทพลาซึม (plasmogamy) ของสายพันธุ์เพศแอลฟา (α mating type) และสายพันธุ์เพศเอ (a mating type) สร้างสายรายืดยาวออกไป จากนั้นมีการสร้าง basidium ตรงปลายสายรา เกิดกระบวนการรวมนิวเคลียส (karyogamy) ของเพศแอลฟาและเพศเอ และเกิดกระบวนการ meiosis ในเซลล์ basidium และสร้างสาย basidiospore สี่สายที่ประกอบไปด้วยทั้งเพศแอลฟาและเพศเอ สุดท้าย basidiospore จะกระจายออกสู่ธรรมชาติและงอกเป็นเซลล์ยีสต์อีกครั้ง[10]



รูปที่ 1.3 Basidiospores ของ *C. gattii;* ก) แสดง basidiospores (ลูกศรสีขาว) รูปแท่งสี่สายบน basidium (ลูกศรสีดำ) ของ *F. bacillispora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 200 เท่า; ข) แสดง basidiospores (ลูกศรสีขาว) รูปแท่งสี่สายบน basidium (ลูกศรสีดำ) เมื่อย้อมด้วย calcofluor white ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า; ค) แสดง clamp connection (ลูกศรสีเทา) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 200 เท่า; ง) แสดง clamp connection (ลูกศรสีเทา) เมื่อย้อมด้วย calcofluor white ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การจำแนกสปีชีส์และชนิด

C. neoformans มักก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี และพบก่อโรคปอดอักเสบได้แต่พบได้น้อยกว่า จากการศึกษาด้วยวิธีทางซีโรโลยีที่อาศัยความแตกต่างของแอนติเจนที่แคปซูล สามารถแบ่ง *C. neoformans* ออกได้เป็น 2 serotypes และ 2 varieties ได้แก่ serotype A/variety *grubii* และ serotype D/variety *neoformans* ต่อมาการศึกษาด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ได้แบ่ง *C. neoformans* ออกเป็น 4 molecular types หลัก ได้แก่ VNI และ VNII (สัมพันธ์กับ serotype A/variety *grubii*), VNIII (สัมพันธ์กับ hybrid serotype AD) และ VNIV (สัมพันธ์กับ serotype D/variety *neoformans*)[11-15] โดย VNI เป็น molecular type ที่พบได้บ่อยที่สุดทั่วโลก[16]

C. gattii ถูกยกระดับจาก *C. neoformans* variety *gattii* เป็นระดับสปีชีส์ เมื่อปี พ.ศ. 2545 โดย Dr. June Kwon-Chung แห่ง National Institute of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา[7] แม้ว่า *C. gattii* จะพบก่อโรคได้ไม่บ่อยเท่า *C. neoformans* แต่พบว่าส่วนใหญ่ก่อโรคในคนที่ไม่ใช่ผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี สามารถแบ่ง *C. gattii* ออกได้เป็น 2 serotypes และ 4 molecular types (โดยวิธีเดียวกับที่ใช้ใน *C. neoformans*) ได้แก่ serotype B และ serotype C และ molecular type VGI, VGII, VGIII และ VGIV โดย molecular types VGI และ VGII มักจะมีความสัมพันธ์กับ serotype B ในขณะที่ molecular types VGIII และ VGIV ส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับ serotype C[11, 12, 17]

ในปี พ.ศ. 2558 มีการเสนอแยกสปีชีส์ใน *C. neoformans/C. gattii* species complex เพิ่มเป็น 7 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 1.1[18] แต่ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันในกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ[19] ทำให้ทั้ง 7 สปีชีส์ใหม่นี้ยังไม่ได้รับการยอมรับให้ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน โดยในตารางที่ 1.1 ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์, variety, serotype และ molecular type ใน *C. neoformans/C. gattii* species complex และสปีชีส์ที่เสนอใหม่