การศึกษาการหลั่งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอนไซม์เอสเทอเรส และฮีโมไลซิน ในเชื้อ *Scedosporium apiospermum*

ภัณฑิรา สิงห์คำ[1] วัชรมาศ ม่วงแก้ว[2] มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[3] นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ[2]

[1]สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

[3]สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการติดเชื้อ *S. apiospermum* แบบฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นเชื้อที่ตรวจพบได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป ดังนั้นการศึกษาปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค จึงมีความสำคัญต่อการประเมินความรุนแรงในการก่อโรคและการก่อพยาธิกำเนิดของโรค สำหรับการศึกษาวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ phospholipase, esterase และ hemolysin ในเชื้อ *S. apiospermum* โดยทำการศึกษาผลการแสดงออกของเอนไซม์ phospholipase ใน simple egg yolk agar, esterase ใน tween80 opacity test agar และ hemolysin ใน BHI agar จากนั้นวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการศึกษาโดยใช้ค่า Pz score ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *S. apiospermum* มีการแสดงออกการทำงานของเอนไซม์ esterase และ hemolysin แต่ไม่พบการแสดงออกของเอนไซม์ phospholipase จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. apiospermum* สามารถหลั่งเอนไซม์ esterase และ hemolysin ซึ่งเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคที่พบในเชื้อ *C. albicans* และ *Aspergillus* spp. ดังนั้นการศึกษาการหลั่งของเอนไซม์ phospholipase, esterase และ hemolysin ในเชื้อ *S. apiospermum* จึงมีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ความรุนแรงในการก่อโรคเพื่อหาเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อความรุนแรงของเชื้อ *S. apiospermum* ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: *Scedosporium apiospermum*, Phospholipase, Esterase, Hemolysin

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

420/6 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

อีเมล์: natthanej.lup@mahidol.ac.th

Investigation of the activity of phospholipase, esterase, and hemolysin in *Scedosporium apiospermum*

Pantira Singkum[1] Watcharamat Muangkeaw[2] Marut Tangwattanachuleeporn[3] Natthanej Luplertlop[2]

[1]Biomedical Sciences Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University,

[2]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University.

[3]Medical Technology Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University.

Abstract

Currently, the opportunistic infection from *Scedosporium apiospermum* has been increasing in immunocompromised host, due to this pathogen could be detected in environment. Thus, the study of virulence factors are important for assessment the severity and disease pathogenesis. The aim of this study was to investigate the activity of phospholipase, esterase and hemolysin in *S. apiospermum*. The activity of phospholipase, esterase and hemolysin performed by simple egg yolk agar, tween 80 opacity test agar and Brain Heart Infusion agar, respectively. The Pz score calculation were performed to analyse the results. This showed the expression of esterase and hemolysin from *S. apiospermum.* Both of esterase and hemolysin are the virulence factors, which usually found in *Candida albicans* and *Aspergillus* spp. Thus, the study of esterase, hemolysin and phospholipase secretion in *S. apiospermum* are important for pathogenesis and severity analysis to find out the specific enzyme in the nearly future.

Keywords: *Scedosporium apiospermum*, Phospholipase, Esterase, Hemolysin

Corresponding author:

Natthanej Luplertlop

Department of Microbiology and Immunology

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400

E-mail: natthanej.lup@mahidol.ac.th

บทนำ

Scedosporium apiospermum เป็นเชื้อราในกลุ่ม Ascomycota มีลักษณะเป็นราสายที่มีผนังกั้น (septate hyphae) พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณที่มีการสะสมสารอาหาร หรือบริเวณที่มีการย่อยสลายของอินทรียวัตถุ เช่น ในดิน, แหล่งน้ำที่สกปรก, เศษซากพืชซากสัตว์, มูลสัตว์ และของเสีย เป็นต้น[1] ซึ่งเชื้อชนิดนี้จะได้รับเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อเข้าสู่ปอด, ไซนัส (paranasal sinuses) หรือได้รับเชื้อโดยตรงผ่านทางบาดแผล โดยเชื้อราชนิดนี้มักถูกพบเป็นเชื้อที่มีการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์, ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะ, การใช้ยาสเตรียรอยด์ และการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น[2-4] ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถก่อโรคได้หลากหลายรูปแบบ อาจพบการติดเชื้อเฉพาะที่ หรือการติดเชื้อแบบลุกลาม รวมไปถึงการติดเชื้อในระบบร่างกาย (systemic infections)[5]โดยพบรายงานการก่อโรคในผู้ที่เกิดภาวะ cystic fibrosis, ผู้ที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ และผู้ที่มีประวัติการจมน้ำ[6-8]

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase activity), เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase activity) และเอนไซม์ฮีโมไลซิน (hemolytic activity) มีความสำคัญต่อการประเมินความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อจุลชีพหลายชนิด เช่น *Candida* spp., *Aspergillus* spp., และ *Cryptococcus neoformans* เป็นต้น[9-11] เนื่องจากการทดสอบเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเป็นการทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับ virulence factor ของเชื้อจุลชีพที่จะนำไปสู่การก่อพยาธิสภาพของโรค โดยพบว่าเชื้อจุลชีพที่มี virulence factor นั้นจะมีความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยดังกล่าวมีส่วนช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อจุลชีพไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายเมื่อมีการรับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย[12]

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase activity), เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase activity) และฮีโมไลซิน (hemolytic activity) ในเชื้อ *S. apiospermum* เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวกับความรุนแรงและโอกาสในการก่อพยาธิสภาพ (pathogenesis) ของโรคจากเชื้อ เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการเลือกใช้และศึกษาในแนวลึกเกี่ยวกับเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงต่อความรุนแรงของเชื้อ *S. apiospermum* ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการหลั่งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase activity), เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase activity) และฮีโมไลซิน (hemolytic activity) ในเชื้อ *S. apiospermum*

วิธีการศึกษา

1. เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

- เชื้อที่นำมาทดสอบ คือ *S. apiospermum* ที่แยกได้จากดิน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่อง Environmental Screening for the *Scedosporium apiospermum* Species Complex in Public Parks in Bangkok, Thailand[13] และได้ทำการพิสูจน์ชนิดด้วยวิธี PCR และ sequencing โดยใช้ยีน β-tubulin exon 5 และ 6 ทำการเก็บรักษา sequence ไว้ที่ฐานข้อมูลเปิดสากล GenBank ตามเลข accession number ดังนี้ strain KU533691 (TMMI001), KU533702 (TMMI002), KU533711 (TMMI003), KU533712 (TMMI004), KU533656 (TMMI005), KU533658 (TMMI006), KU533670 (TMMI007), KU533655 (TMMI009), Ku533649 (TMMI010) และ KU533673 (TMMI011)
- เชื้อ positive control
  - ➢ phospholipase activity test : *C. albicans* TMMI001CA[14]
  - ➢ esterase activity test : *C. tropicalis* TMMI001CT[15]

- เชื้อ negative control

➢ phospholipase activity test : *C. tropicalis* TMMI001CT[16]

➢ esterase activity test : *C. lypolitica* TMMI001CL[17]

ซึ่งเชื้อทั้งหมดเป็นเชื้อที่อยู่ในธนาคารเชื้อของห้องปฏิบัติการราวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การเตรียมเชื้อในการทดสอบ

ดำเนินการโดย sub-culture เชื้อที่นำมาทดสอบ, เชื้อ positive control และเชื้อ negative control ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA slant และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมานับจำนวน conidia และคำนวณ conidia เริ่มต้นให้ได้เท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. ทดสอบการหลั่งเอนไซม์ esterase, phospholipase และ hemolysin

ทดสอบการหลั่งเอนไซม์ esterase, phospholipase และ hemolysin โดยทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งเพื่อนำค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์ทางสถิติ ดังนี้

3.1 Phospholipase activity test

นำเชื้อแต่ละสายพันธ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ simple egg yolk agar ซึ่งพัฒนาโดย Price และคณะ [16] (ส่วนประกอบ SDA (oxoid) 65 กรัม, $CaCl_2$ 5.5 กรัม, NaCl 58.4 กรัม, ไข่ขาว 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยทำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นทำการบันทึกผลการทดลองและนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณตามวิธีการคำนวณข้อที่ 4

3.2 Esterase activity test

นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 opacity test agar ซึ่งพัฒนาโดย Slifkin และคณะ[19] (ส่วนประกอบ agar (oxoid) 15 กรัม, peptone 10 กรัม, $CaCl_2$ 0.1 กรัม, NaCl 5 กรัม, Tween80 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการทดลองและนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณตามวิธีการคำนวณข้อที่ 4

3.3 Hemolytic activity test

นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% blood agar (BHI agar) จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการทดลองและนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณตามวิธีการคำนวณข้อที่ 4

4. วิธีการคำนวณและการแปรผล phospholipase activity test และ esterase activity test

$$\text{Precipitation zone (Pz score)} = \frac{\text{ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อ}}{\text{ขนาดของโซนการทำงานเอนไซม์}}$$

การแปลผล :

Pz 1^- = Negative

Pz 1^+ = ค่าอยู่ในช่วง 0.9-1

Pz 2^+ = ค่าอยู่ในช่วง 0.89-0.80

Pz 3^+ = ค่าอยู่ในช่วง 0.79-0.70

Pz 4^+ = มีค่า ≤ 0.69

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

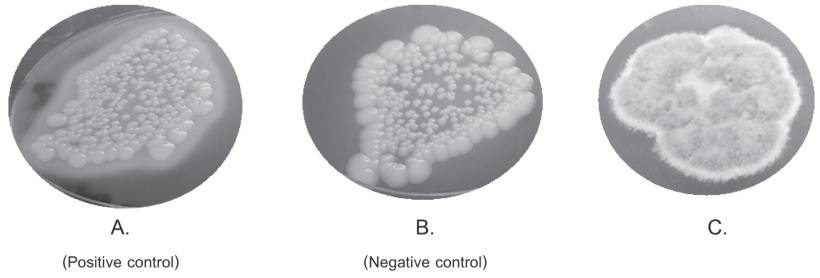
วิเคราะห์สถิติ จากการใช้ t-test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากผลการศึกษา โดยใช้โปรแกรม SPSS v.16.0

ผลการทดลอง

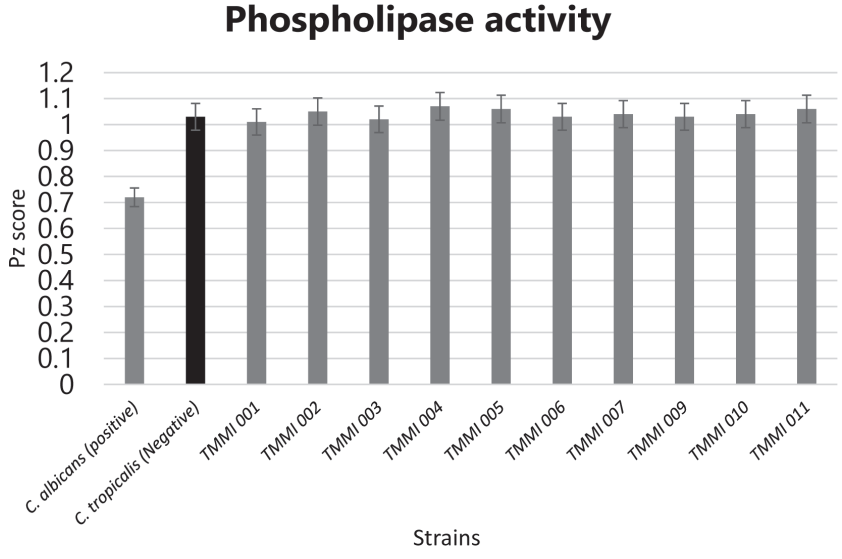
1. Phospholipase activity test

จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ phospholipase ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ นำมาเปรียบเทียบกับ positive control โดยใช้ *C. albicans* ซึ่งมีลักษณะการทำงานของเอนไซม์ phospholipase บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะสังเกตเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีขาวขุ่นแผ่ขยายออกรอบโคโลนี (รูปที่ 1A) และในส่วนของ negative control คือ *C. tropicalis* ซึ่งไม่มีลักษณะการทำงานของ phospholipase บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 1B) สำหรับเชื้อ *S. apiospermum* ไม่พบลักษณะการทำงานของเอนไซม์ phospholipase (รูปที่ 1C) ดังแสดงในรูปที่ 1

เมื่อทำการคำนวณค่า Pz score ตามวิธีการคำนวณข้างต้นในข้อที่ 4 ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ positive control คือ *C. albicans* และ negative control คือ *C. tropicalis* ได้ผลแสดงดังกราฟรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบ phospholipase activity ของ positive control คือ *C. albicans* (A), negative control คือ *C. tropicalis* (B) และผล negative ของเชื้อ *S. apiospermum* (C)



รูปที่ 2 กราฟแสดงค่า Pz score (แกน Y) ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ positive control คือ *C. albicans* และ negative control คือ *C. tropicalis* (แกน X)

จากกราฟจะเห็นได้ว่า ค่า Pz score ของ positive control และ negative control มีค่าเท่ากับ Pz 3^+ (0.72) และ Pz 1^- (10.3) ตามลำดับ และเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่า Pz score เท่ากับ Pz 1^- (1.01, 10.5, 1.02, 1.07, 1.06, 1.03, 1.04, 1.03, 1.04, 1.06 ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับค่า Pz. score ของ negative control จึงแสดงได้ว่า เชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ ไม่มีการแสดงออกการทำงานของเอนไซม์ phospholipase เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ simple egg yolk agar

2. Esterase activity test

จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ esterase ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ นำมาเปรียบเทียบกับ positive control โดยใช้ *C. tropicalis* ซึ่งจะปรากฏผลในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลักษณะปื้นขาวรอบๆ โคโลนี (รูปที่ 3A) และ negative control โดยใช้ *C. lypolitica* ซึ่งจะไม่ปรากฏลักษณะปื้นขาวรอบโคโลนี (รูปที่ 3B) ในส่วนของเชื้อ *S. apiospermum* ที่นำมาใช้ทดสอบพบว่าแสดงผลทั้ง positive (รูปที่ 3C) และ negative (รูปที่ 3D) ดังแสดงในรูปที่ 3

เมื่อทำการคำนวณค่า Pz score ตามวิธีการคำนวณข้อที่ 4 ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ positive control คือ *C. tropicalis* และ negative control คือ *C. lypolitica* ได้ผลแสดงดังกราฟรูปที่ 4

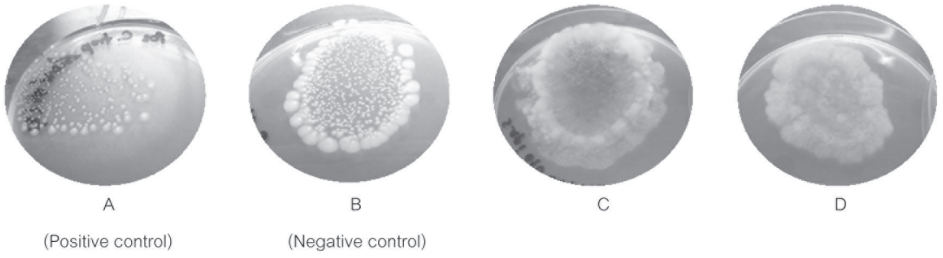
จากกราฟจะเห็นได้ว่า ค่า Pz score ของ positive control และ negative control มีค่าเท่ากับ Pz 4^+ (0.7) และ Pz 1^- (1.03) ตามลำดับ โดยเชื้อ *S. apiospermum* TMMI002 (0.89), TMMI003 (0.83), TMMI004 (0.85), TMMI006 (0.95) และ TMMI010 (0.9) มีการแสดงออกการทำงานของเอนไซม์ esterase เนื่องจากให้ค่า Pz score ที่มากกว่า negative control และเชื้อ *S. apiospermum* 003 มีค่า Pz score ที่มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ Pz 2^+ (0.83)

3. Hemolytic activity test

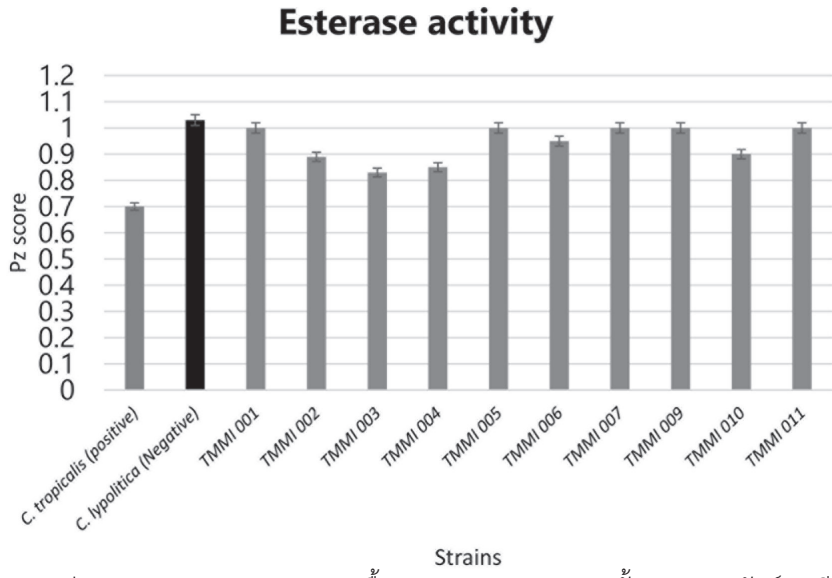
จากการทดสอบการเกิด hemolysis ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ นำมาเปรียบเทียบกับ positive control โดยจะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีใส เนื่องจากมีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 1A) และ negative control ซึ่งจะไม่พบลักษณะการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar (BHI agar) ในส่วนของเชื้อ *S. apiospemum* ที่นำมาใช้ทดสอบพบว่าแสดงผลทั้ง positive (รูปที่ 5C) และ negative (รูปที่ 5D) ดังแสดงในรูปที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 5

เมื่อนำมาคำนวณค่า Pz score ตามวิธีการคำนวณในข้อ 6 ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 6

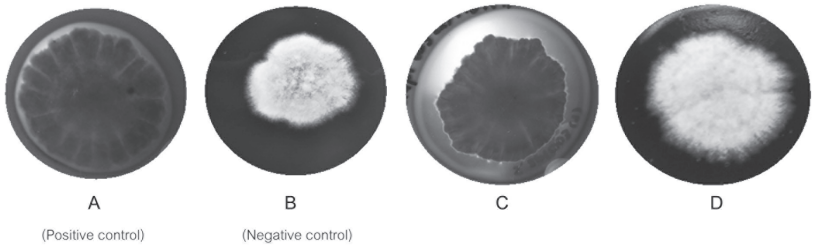
จากกราฟจะเห็นได้ว่า ค่า Pz Score ของเชื้อ *S. apiospermum* สายพันธุ์ TMMI003, TMMI004, TMMI010 และ TMMI011 พบว่าเกิดการ hemolysis และเชื้อ *S. apiospermum* TMMI003 มีค่า Pz score มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ Pz 4^+ (0.65)



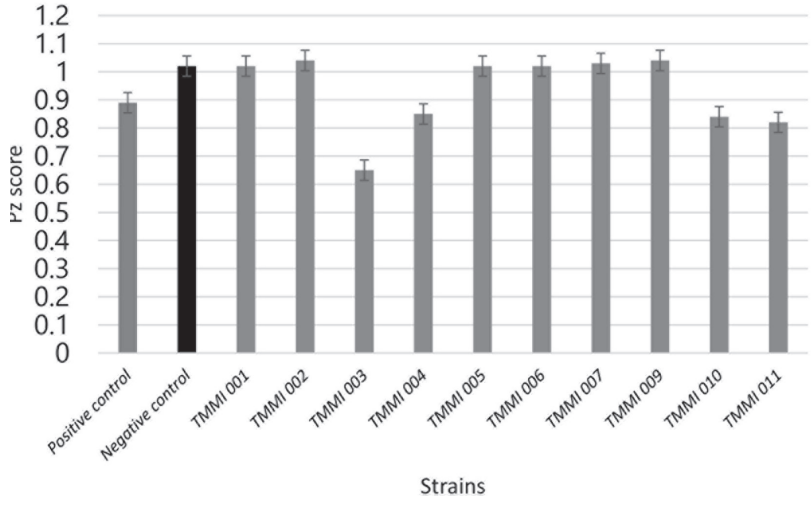
รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบ esterase activity ของ positive control คือ *C. tropicalis* (A) จะมีลักษณะ negative control คือ *C. lypolitica* (B), positive ของเชื้อ *S. apiospermum* (C) และ negative ของเชื้อ *S. apiospermum* (D)



รูปที่ 4 กราฟแสดงค่า Pz score (แกน Y) ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ positive control คือ *C. tropicalis* และ negative control คือ *C. lypolitica* (แกน X)



รูปที่ 5 แสดงผล positive ในการเกิด hemolysis ของเชื้อ *S. apiospermum* (A) และแสดงผล negative ในการเกิด hemolysis ของเชื้อ *S. apiospermum* (B), positive ของเชื้อ *S. apiospermum* (C) และ negative ของเชื้อ *S. apiospermum* (D)



รูปที่ 6 กราฟแสดงค่า Pz score (แกน Y) ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ (แกน X)

ตารางที่ 1 สรุปการทำงานของเอนไซม์ phospholipase, esterase และ hemolysin ของเชื้อ *S. apiospermum*

สายพันธุ์	Phospholipase	Esterase	Hemolysin
TMMI001	-	-	-
TMMI002	-	+	-
TMMI003	-	+	+
TMMI004	-	+	+
TMMI005	-	-	-
TMMI006	-	+	-
TMMI007	-	-	-
TMMI009	-	-	-
TMMI010	-	+	+
TMMI011	-	-	+

อภิปรายผล

เชื้อ *S. apiospermum* เป็นเชื้อก่อโรคชนิดฉวยโอกาส (opportunistic infection) ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยมีอัตราการก่อโรคเป็นอันดับสองรองจาก *A. fumigatus*[18] นอกจากนี้ยังพบว่าในประเทศไทยมีการรายงานพบการติดเชื้อ *S. apiospermum* ในสมองของผู้ป่วยที่สำลักน้ำจากการจมน้ำ [8] เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่กลไกการก่อโรคและการเกิดพยาธิกำเนิดของโรคนี้ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจด้านกลไกการก่อโรคของเชื้อนี้ โดยเริ่มต้นจากการตรวจหาปัจจัยที่ส่งเสริมการก่อพยาธิสภาพนี้ มุ่งเน้นที่การตรวจหาเอนไซม์ที่มีการศึกษาในเชื้อราชนิดอื่นๆ และพบว่ามีความสำคัญได้แก่ phospholipase, esterase, และ hemolysin โดยพบรายงานจากงานวิจัยก่อนหน้าว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพหลังจากการติดเชื้อ[20]

จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ phospholipase, esterase และ hemolysin ของเชื้อ *S. apiospermum* ทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่าการทดสอบการทำงานของ phospholipase activity ไม่พบการแสดงออกของเอนไซม์ phospholipase ในเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ บนอาหาร simple egg yolk agar ที่ทำการทดลองในครั้งนี้ แต่จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้าของ Pakshir และคณะ พบว่าเชื้อ *Candida* spp. สามารถหลั่งเอนไซม์ phospholipase ได้[21] รวมทั้งยังมีการตรวจหา phospholipase ใน *A. fermigatus* ซึ่งพบว่าสามารถหลั่งเอนไซม์ phospholipase ได้เช่นกัน[22]

เมื่อพิจารณาการหลั่งของเอนไซม์ esterase พบว่าเชื้อ *S. apiospermum* สายพันธุ์ TMMI002, TMMI003, TMMI004, TMMI006 และ TMMI010 มีการหลั่งของเอนไซม์ esterase แต่สำหรับสายพันธุ์ TMMI001, TMMI005, TMMI007, TMMI009, TMMI011 ไม่มีการหลั่งของเอนไซม์ esterase เกิดขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน จากการทดสอบนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ Slifkin และคณะ ที่พบว่าเชื้อ *Candida* spp. สามารถหลั่งเอนไซม์ esterase ได้[19] รวมทั้งยังเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อนี้ก่อโรคที่มีความรุนแรงและรักษาได้ยากขึ้น โดยพบว่าจาก

การศึกษาในเชื้อแคนดิดาที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง และทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ esterase เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า 92.3% ของ *C. albicans* และ 255 ตัวอย่างของเชื้อ *C. tropicalis* ให้ผลบวกกับการทดสอบนี้

การทดสอบการทำงานของ hemolytic activity พบว่า เชื้อ *S. apiospermum* สายพันธุ์ TMMI003 มีการแสดงออกการทำงานของเอนไซม์ hemolysin ได้มากที่สุด และทำให้มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ และพบว่าเป็นชนิด beta – hemolysis โดยพบว่าเป็นการสลายเม็ดเลือดแดงชนิดเดียวกันกับเชื้อ *C. albicans* ที่ทำการศึกษาโดย Pakshir และคณะ [21] ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนั้นพบว่า 100% ของ *C. albicans* มีการสลายเม็ดเลือดแดงชนิด beta-hemolysis ในขณะที่เชื้อแคนดิดาสายพันธุ์อื่นจะมีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงชนิด alpha-hemolysis หรือไม่เกิดการสลายเม็ดเลือดแดง [21]

สรุปผล

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. apiospermum* บางสายพันธุ์มีการหลั่งเอนไซม์ esterase และ hemolysin ซึ่งเกี่ยวข้องกับ virulence factor ของเชื้อ ในขณะที่เอนไซม์ phospholipase ไม่มีการแสดงออกในเชื้อ *S. apiospermum* ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้ สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าเชื้อ *S. apiospermum* มีการแสดงออกของเอนไซม์ esterase และ hemolysin ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์ของพยาธิกำเนิดและตัวชี้วัดความรุนแรงของเชื้อ *S. apiospermum* ในแนวลึกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Rougeron A, Schuliar G, Leto J, et al. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. Environ Microbiol 2015;17(4):1039-48.
2. Berenguer J, Rodriguez-Tudela JL, Richard C, et al. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans.* A report on *16* cases in Spain and a review of the literature. *Scedosporium prolificans* Spanish study group. Medicine (Baltimore) 1997;76(4):256-65.
3. Gilgado F, Cano J, Gene J, et al. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii.* J Clin Microbiol 2008;46(2):766-71.
4. Wood GM, McCormack JG, Muir DB, et al. Clinical features of human infection with *Scedosporium inflatum.* Clin Infect Dis 1992;14(5):1027-33.
5. German JW, German MD, Susan M, et al. Treatment of a chronic *Scedosporium apiospermum* vertebral osteomyelitis. Case report. Neurosurg Focus 2004;17(6):E9.
6. Rolfe NE, Haddad TJ, Wills TS. Management of *Scedosporium apiospermum* in a pre- and post-lung transplant patient with cystic fibrosis. Med Mycol Case Rep, 2013;2:37-9.
7. Sole A. *Scedosporium apiospermum* disseminated infection in a single lung transplant recipient. Rev Iberoam Micol 2011;28(3):139-42.
8. Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, et al. *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. Mycoses 2007;50(5):412-21.

9. Shen DK, Noodeh AD, Kazemi A, et al. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiol Lett 2004;239(1):87-93.
10. Vidotto V, Ito-Kuwa S, Nakamura K, et al. Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in different countries. Rev Iberoam Micol 2006;23(4):216-20.
11. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida species* exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. J Clin Microbiol 2001;39(8):2971-4.
12. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peracoli MT. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1998;40(3):125-35.
13. Luplertlop N, Pumeesat P, Muangkaew W, et al. Environmental screening for the *Scedosporium apiospermum* species complex in public park in Bangkok, Thailand. PLoS ONE 2016;11(7):e0159869. doi:10.1371/journal.pone.0159869.
14. Zarei MA, Miry S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. Jandishapur J Microbiol 2010;3(4):169-73.
15. Aktas E, Yigit N, Ayyildiz A. Esterase activity in various *Candida species*. J Int Med Res 2002; 30(3):322-4.
16. Galan-Ladero MA, Blanco MT, Sacristan B, et al. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. Med Mycol 2010;48(1):207-10.
17. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans.* Sabouraudia 1982;20(1):7-14.
18. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Rev 2008;21(1):157-97.
19. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida species.* J Clin Microbiol 2000;38(12):4626-8.
20. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000;13(1): 122-43.
21. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, et al. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida spp.* isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. J Mycol Med 2013;23(2):113-8.
22. Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. Med Mycol 2004;42(1):81-6.