

**การจำแนกสปีชีส์เชื้อราแคนดิดาจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)
IDENTIFICATION OF *CANDIDA* SPP. FROM CLINICAL SPECIMENS BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY (MALDI-TOF MS)**

ปัทมญา สุวรรณโชติ¹, วชิร จรูญวัชร¹, เกศราภรณ์ พิษผักหวาน², ปัทมพร จำรัสศรี², ดวงภัทร คุ่มสกุลไทย², ณัฐภาณี ทัศนอมศรีเดชชัย^{2*}

Paphatchaya Suwannachote¹, Wacharee Charoonwach¹, Khetsaraporn Phutphakwan², Pattaraporn Jamrassri², Doungpat Khumsakulthai², Natthapaninee Thanomsridetchai^{2*}

¹กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลชลบุรี

¹Department of Medical Technology, Chonburi Hospital.

²คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University.

*Corresponding author, e-mail: natthapaninee@go.buu.ac.th

Received: 4 February 2021; **Revised:** 1 April 2022; **Accepted:** 25 April 2022

บทคัดย่อ

Candida spp. เป็นเชื้อราที่เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญ ซึ่งเป็นผลทำให้ผู้ที่มีระบบทางภูมิคุ้มกันต่ำมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย โดยเฉพาะในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ดังนั้นการวินิจฉัยที่ถูกต้องและรวดเร็วจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วยให้มีประสิทธิภาพ และลดอัตราการตายในเชื้อรา ซึ่งวิธีดั้งเดิมที่ใช้สำหรับการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการมีความยุ่งยากและต้องใช้เวลาในการทดสอบนาน ปัจจุบันมีการจำแนกเชื้อก่อโรคด้วยระบบ Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งให้ผลการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ และมีความรวดเร็วในการจำแนกเชื้อ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจำแนก *Candida* spp. ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจำนวน 85 ตัวอย่าง ควบคู่ไปกับการทดสอบด้วยวิธีดั้งเดิม คือ การทดสอบการสร้างห้องอก การทดสอบการสร้าง Chlamydospore และการสังเกตลักษณะสีโคโลนีบน CHROMagar ผลการศึกษาพบว่า การจำแนกสปีชีส์ *Candida* spp. ด้วยวิธี MALDI-TOF MS มีประสิทธิภาพในการจำแนกสปีชีส์ได้ดีกว่าวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อบางชนิด เช่น *Candida glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. rugosa*, *Trichosporon asahii*, และ *T. inkin* ไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธีดั้งเดิม จากการศึกษาจึงสรุปได้ว่าวิธี MALDI-TOF MS เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้สำหรับการจำแนกสปีชีส์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลาในการจำแนก *Candida* spp. ให้เกิดการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: เชื้อราแคนดิดา มัลติทอปแมสสเปคโตรเมทรี สิ่งส่งตรวจทางคลินิก

Abstract

Candida spp. is an important opportunistic fungus that can infect mainly in immunocompromised hosts, especially in HIV infected patients. Therefore, the accurate and rapid identification of *Candida* spp. is influential in treatment decision and may reduce the rate of antifungal drug resistance. The conventional methods of fungal identification in the clinical diagnostic laboratory are complicated and time-consuming. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is one of rapid and reliable fungal diagnostic tools used nowadays. In this study, we evaluated eighty-five isolates of *Candida* spp. from clinical specimens by using MALDI-TOF MS technique compared to the conventional methods, including Germ tube test, Chlamydospore formation test and CHROMagar. The results demonstrated that MALDI-TOF MS technique can be used to differentiate *Candida* spp. from the clinical specimen especially for *Candida glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. rugosa*, *Trichosporon asahii* and *T. inkin* which could not be previously identified by using conventional methods. From our study it can be concluded that MALDI-TOF MS technique is one of the accurate tools and appropriate to increase the efficiency of *Candida* identification.

Keywords: *Candida* spp., Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), Clinical Specimens

บทนำ

Candida spp. เป็นราแท้จริง (true fungi) มีความหลากหลายทางสปีชีส์มากที่สุด มักเพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ (budding) พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในคนสุขภาพดี อาทิ ในช่องปาก ทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น และยังสามารถเป็นเชื้อราฉวยโอกาสได้เช่นกัน ซึ่งเป็นผลทำให้ผู้ที่มีระบบทางภูมิคุ้มกันบกพร่องมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย โดยสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์นั้นมีประมาณ 11 สปีชีส์ การก่อโรคของเชื้อดังกล่าวถูกเรียกว่า Candidiosis หรือ Candidiasis เมื่อเชื้อมีการก่อโรคในมนุษย์จะมีการเพิ่มจำนวนและลุกลามไปยังเยื่อต่างๆ ของอวัยวะภายในร่างกายและเข้าสู่ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิต โดยในปัจจุบันมีการตรวจพบการติดเชื้อราเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะในเด็กทารก ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด ตลอดจนผู้ป่วยเอดส์ โดยกลุ่มเชื้อราฉวยโอกาสที่พบบ่อย คือ *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* และ *Aspergillus* spp. [1] ซึ่ง *Candida* spp. มีอัตราการก่อโรคสูงสุดเปรียบเทียบกับเชื้อราชนิดอื่น ๆ จากสถิติการติดเชื้อ *Candida* spp. ในกระแสเลือด (Candidemia) ในปี 2016 ที่ทำการศึกษาในเอเชียแปซิฟิก (Asia-Pacific) พบว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *Candida* spp. ในกระแสเลือดในประเทศไทยมีการติดเชื้อ *C. tropicalis* มากเป็นอันดับหนึ่ง และ *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* complex และ *Candida* spp. ตามลำดับ [2]

ปัจจุบันยาที่เลือกใช้เป็นตัวแรกในการรักษา (Drug of choice) คือยาในกลุ่ม Azole และ Amphotericin B [3] มีการรายงานสถานการณ์การดื้อยาในการรักษาการติดเชื้อ Candidiasis พบว่าเชื้อมีอุบัติการณ์ดื้อยาเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะยา Fluconazole โดยพบว่า *Pichia kudriavzevii* มีอัตราการดื้อยาค่อนข้างสูงที่สุด และ *C. glabrata*, *C. albicans* และ *C. parapsilosis* ตามลำดับ [4] จากการศึกษาค้นพบว่า *Trichosporon* spp. มีอัตราการดื้อต่อยา Amphotericin B [5] ส่วนการติดเชื้อ *Candida* spp. ในกระแสเลือด หรือ Candidemia มีรายงานจากการศึกษาจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยพบว่า *C. glabrata* มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยา Fluconazole 97% [6] และ *C. tropicalis*

มีอุบัติการณ์การติดเชื้อยา Fluconazole, Voriconazole, Caspofungin, Micafungin และ Anidulafungin ส่วน *C. parapsilosis* พบว่ามีอุบัติการณ์การติดเชื้อยา Fluconazole เช่นกัน [7] รวมไปถึง *C. parapsilosis* complex ที่ประกอบไปด้วย *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* และ *C. metapsilosis* ซึ่งจากการศึกษาของ Bonfietti และคณะ พบว่าค่า MIC ของ *C. orthopsilosis* และ *C. metapsilosis* มีค่าต่ำกว่า *C. parapsilosis sensu stricto* ในยา Fluconazole, Voriconazole, Amphotericin B และ Caspofungin อีกทั้งยังพบว่า *C. parapsilosis sensu stricto* มีอัตราการติดเชื้อยา Voriconazole และมีความไวต่ายา Triazole [8] ซึ่งส่วนใหญ่วิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยสปีชีส์ของ *Candida* spp. ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การตรวจหาเชื้อโดยตรง (Direct examination) โดยการใช้ 10% KOH การศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue การสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) การสังเกตสีโคโลนีของ *Candida* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic candida agar (CHROMagar) ซึ่งจะสามารถวินิจฉัยสปีชีส์ของ *Candida* spp. ได้ในเบื้องต้นเท่านั้น ทั้งนี้ควรทำการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น การสร้างท่อนอก (Germ tube test) การทดสอบการสร้าง Chlamydo-spore (Chlamydo-spore formation test) การทดสอบโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Commercial assay kit) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ (Sequencing) เป็นต้น [9] ซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการทั้งในเรื่องค่าใช้จ่าย ระยะเวลา ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ จึงมีการนำเครื่องมือและเทคโนโลยีมาใช้ในการวินิจฉัยเพื่อให้ได้ผลการวินิจฉัยที่ถูกต้อง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยในงานวิจัยครั้งนี้ทีมผู้วิจัยใช้เครื่อง MALDI-TOF MS ในการวินิจฉัยแยกสปีชีส์จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่ง MALDI-TOF MS เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน โดยตัวอย่างเชื้อจะผสมด้วยสารประกอบออร์แกนิกเมทริกซ์ (Matrix) ที่ช่วยดูดซับพลังงาน เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเลเซอร์ จะทำให้ตัวอย่างเชื้อแตกตัวเป็นโปรตอน ซึ่งความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับขนาดมวลต่อประจุ (m/z) โดยการจำแนกชนิดของเชื้อจะใช้ลักษณะ m/z เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ทำให้สามารถวินิจฉัยแยกเชื้อในระดับสปีชีส์ได้ โดยพบว่าวิธีนี้สามารถจำแนกเชื้อได้อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง [10] ดังนั้นการวินิจฉัยเชื้อ *Candida* spp. จึงจำเป็นที่จะต้องระบุสปีชีส์ให้ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพสูงสุด รวมไปถึงเพื่อลดการใช้ยาที่เกินความจำเป็นในผู้ป่วย และลดอัตราการตายของเชื้อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบการจำแนกสปีชีส์ *Candida* spp. ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยระหว่างวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและ MALDI-TOF MS

วิธีดำเนินการวิจัย

โคโลนีของเชื้อที่คาดว่าเป็น *Candida* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี รวมทั้งหมด 85 ตัวอย่าง ประกอบด้วยโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างเลือด (Hemoculture) จำนวน 22 ตัวอย่าง ปัสสาวะ (Urine) จำนวน 60 ตัวอย่าง และหนอง (Pus) จำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิมซึ่งอธิบายไว้โดย Ali, Sabah and Luma [11] ได้แก่ การสังเกตสีโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar, การทดสอบการสร้างท่อนอก และการทดสอบการสร้าง Chlamydo-spore เปรียบเทียบกับวิธี MALDI-TOF MS

การสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar

เชื้อโคโลนีของเชื้อที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์บน Sabouraud dextrose agar (SDA) จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบน CHROMagar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-120 ชั่วโมง และสังเกตสีของโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสีของโคโลนีของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงบน CHROMagar

สีของโคโลนี	ชนิดของเชื้อ
สีเขียว	<i>Candida albicans</i>
สีเหลืองนวล	<i>Candida glabrata</i>
สีเหลืองอมชมพู	<i>Pichia kudriavzevii</i>
สีน้ำเงินเข้ม	<i>Candida tropicalis</i>
สีน้ำตาลอ่อน	<i>Candida parapsilosis</i> complex

การทดสอบคุณสมบัติการสร้างท่ออก (Germ tube test)

เชื้อโคโลนีจากเชื้อที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบน SDA ลงในซีรัม 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาสังเกตการสร้างท่ออก (Germ tube) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x

การทดสอบคุณสมบัติการสร้าง Chlamydospore บน Corn meal agar

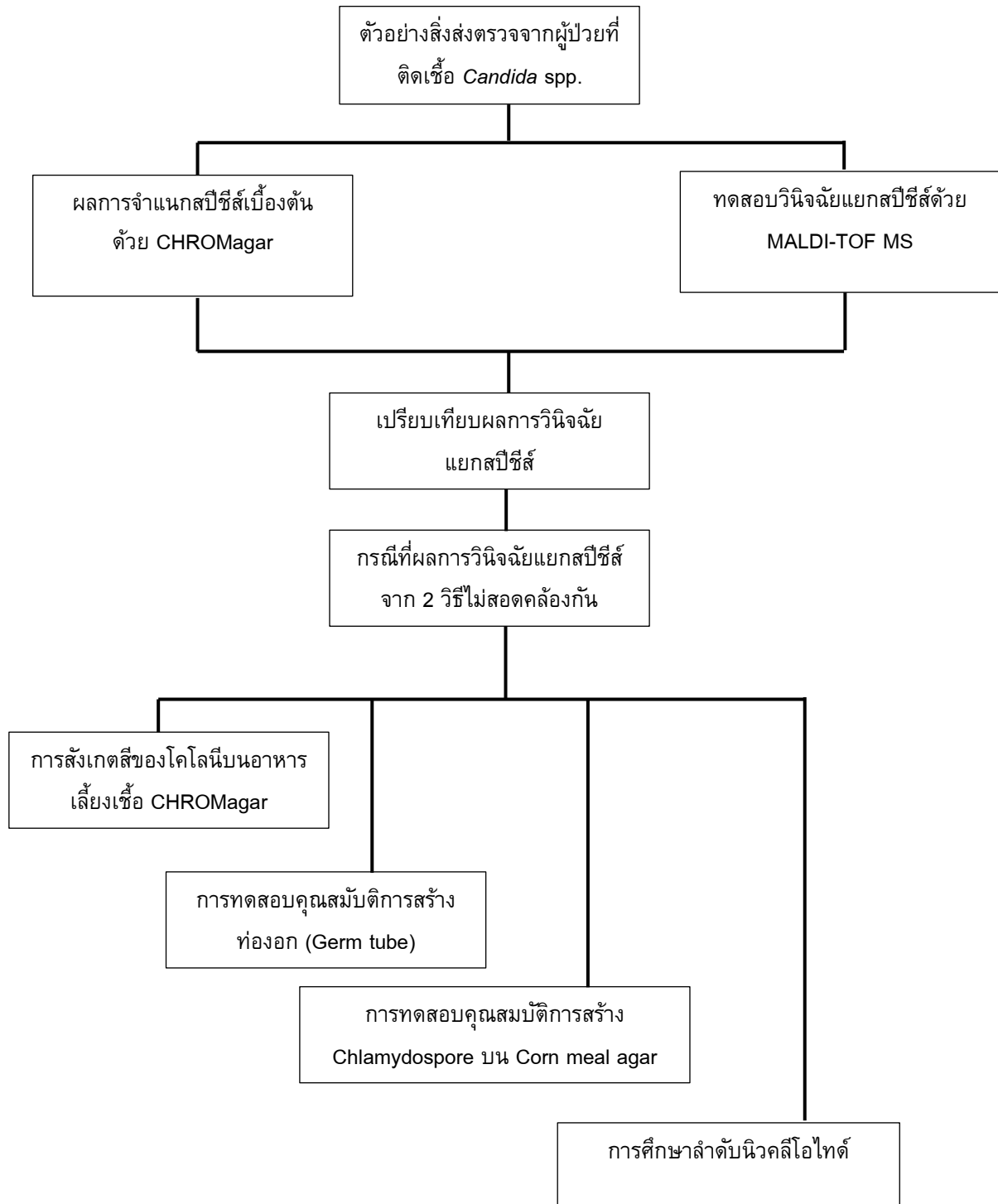
เชื้อโคโลนีที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์บน SDA แล้ว streak ลงบน Corn meal agar ปิดทับบริเวณที่ streak ด้วย Cover Glass จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และนำมาสังเกตการสร้าง Chlamydospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x

การศึกษาลักษณะกราฟมวลต่อประจุ (m/z) ของเชื้อด้วยวิธี MALDI-TOF MS

เชื้อโคโลนีจากเชื้อที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบน SDA ลงบน MALDI target plate บาง ๆ ปล่อยให้เชื้อแห้งที่อุณหภูมิห้อง หยด 70% Formic acid ลงบนเชื้อที่แห้งแล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อให้เกิดการย่อยผนังเซลล์ของ *Candida* spp. จากนั้นหยด α -cyano-4-hydroxycinnamic acid ใน 50% Acetonitrile/2.5% Trifluoro-acetic acid (HCCA) หรือ Matrix 1 ไมโครลิตร ปล่อยให้เชื้อแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ในการทดสอบทุกครั้งจะมีการวัดประสิทธิภาพและความแม่นยำของเครื่องด้วยการวิเคราะห์แบคทีเรียมาตรฐาน และรายงานเฉพาะผลที่มีค่าความเชื่อมั่นของการจำแนกที่ 2.00-3.00 (ค่าความเชื่อมั่นของการจำแนกเชื้อด้วย MALDI-TOF MS แบ่งเป็นค่า Score values ได้แก่ 2.00 – 3.00 คือ High-confidence identification, 1.70 – 1.99 คือ Low-confidence identification, 0.00 – 1.69 คือ No organism identification possible)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

โคโลนีของยีสต์ที่ให้ผลการจำแนกชนิดได้แตกต่างกันจะถูกนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของเชื้อผ่านการดำเนินการของบริษัทแมคโครเจน สาธารณรัฐเกาหลี



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการทำการทดลอง

ผลการวิจัย

จากผลการทดสอบจำแนกสปีชีส์จากโคโลนีของเชื้อที่ได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในแต่ละกลุ่มด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar เปรียบเทียบกับวิธี MALDI-TOF MS โดยจากการทดสอบจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจพบสภาวะ ด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar

พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans*, *Non-albicans Candida spp.*, *C. tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* จำนวน 49 ตัวอย่าง, 4 ตัวอย่าง, 4 ตัวอย่างและ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 81.67, ร้อยละ 6.67, ร้อยละ 6.67 และร้อยละ 5 ของจำนวนตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดตามลำดับ และผลการทดสอบจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจปัสสาวะ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *T. asahii*, *T. inkin* และ *C. rugosa* จำนวน 27 ตัวอย่าง, 25 ตัวอย่าง, 3 ตัวอย่าง, 2 ตัวอย่าง, 2 ตัวอย่างและ 1 ตัวอย่างตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 45, ร้อยละ 41.67, ร้อยละ 5, ร้อยละ 3.33, ร้อยละ 3.33 และร้อยละ 1.67 ของจำนวนตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดตามลำดับ

จากการทดสอบจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจหนอง ด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans* จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 ของจำนวนตัวอย่างหนอง และการทดสอบจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจหนอง ด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans* จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 ของจำนวนตัวอย่างหนอง

จากการทดสอบจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ Hemoculture ด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Non-albicans Candida spp.* และยีสต์ จำนวน 16 ตัวอย่าง, 1 ตัวอย่าง, 2 ตัวอย่าง, 2 ตัวอย่าง, และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 72.72, ร้อยละ 4.55, ร้อยละ 9.09, ร้อยละ 9.09, และร้อยละ 4.55 ของจำนวนตัวอย่าง Hemoculture ตามลำดับ และการทดสอบวินิจฉัยแยกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ Hemoculture ด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเป็นเชื้อ *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, และ *C. orthopsilosis* จำนวน 12 ตัวอย่าง, 8 ตัวอย่าง, 1 ตัวอย่างและ 1 ตัวอย่างตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 54.54, ร้อยละ 36.36, ร้อยละ 4.55 และร้อยละ 4.55 ของจำนวนตัวอย่าง Hemoculture ตามลำดับ

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่างในกรณีที่ผลการวินิจฉัยแยกสปีชีส์จาก 2 วิธีไม่สอดคล้องกัน จำนวน 46 ไอโซเลท ได้แก่ U05, U06, U08, U11, U14, U15, U16, U18, U19, U21-U24, U26, U28, U30, U32, U34, U37, U41, U43, U44, U45, U47, U48, U49, U51, U53, U54, U56, U57, U58, H02, H04, H06, H07, H09- H13, H15- H17 และ H19- H21 พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *T. asahii*, *T. inkin* และ *C. rugosa* จำนวน 2 ตัวอย่าง, 22 ตัวอย่าง, 3 ตัวอย่าง, 2 ตัวอย่าง, 2 ตัวอย่างและ 1 ตัวอย่างของจำนวนตัวอย่างปัสสาวะ และไอโซเลทที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ Hemoculture พบว่าเป็นเชื้อ *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. orthopsilosis* จำนวน 1 ตัวอย่าง, 12 ตัวอย่าง, 1 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งผลความคล้ายอยู่ที่ 95-99% สอดคล้องกับการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตารางที่ 2 แสดงผลการจำแนกสปีชีส์จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ จำนวน 85 ตัวอย่าง โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบน CHROMagar และวิธี MALDI-TOF MS

Specimen	CHROMagar	MALDI-TOF MS	Specimen	CHROMagar	MALDI-TOF MS
U01	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	U44	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U45	<i>C. albicans</i>	<i>C. rugosa</i>
U03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U46	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U04	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U47	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U05	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. tropicalis</i>	U48	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U06	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	U49	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U07	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U50	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
U08	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	U51	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>


U09	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U52	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U53	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U11	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	U54	<i>C. albicans</i>	<i>T. inkin</i>
U12	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U55	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U13	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U56	Non-albicans <i>Candida</i> spp.	<i>C. tropicalis</i>
U14	<i>C. albicans</i>	<i>T. asahii</i>	U57	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U15	Non-albicans <i>Candida</i> spp.	<i>C. glabrata</i>	U58	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U16	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	U59	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U17	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	U60	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
U18	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. tropicalis</i>	P01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U19	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	P02	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U20	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	P03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U21	Non-albicans <i>Candida</i> spp..	<i>C. albicans</i>	H01	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U22	Non-albicans <i>Candida</i> spp.	<i>C. glabrata</i>	H02	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U23	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	H03	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U24	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	H04	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U26	<i>C. albicans</i>	<i>T. asahii</i>	H06	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U27	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H07	Yeast	<i>C. tropicalis</i>
U28	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	H08	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U29	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H09	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. tropicalis</i>
U30	<i>C. albicans</i>	<i>T. inkin</i>	H10	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. tropicalis</i>
U31	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H11	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
U32	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	H12	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U33	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H13	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U34	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	H14	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U35	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H15	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U36	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H16	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U37	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. glabrata</i>	H17	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U38	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H18	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U39	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H19	Non-albicans <i>Candida</i> spp.	<i>C. glabrata</i>
U40	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H20	Non-albicans <i>Candida</i> spp.	<i>C. orthopsilosis</i>
U41	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	H21	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
U42	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	H22	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
U43	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>			

หมายเหตุ U = Urine, P = Pus, H = Hemoculture

ตารางที่ 3 แสดงการสรุปผลการจำแนกสปีชีส์จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบน CHROMagar และวิธี MALDI-TOF MS

Identification	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Non-albicans <i>Candida</i> spp.	Yeast
	จำนวน (n)	68	5	0	0	0	0	0	5	6
CHROMagar ร้อยละ	80	5.88	0	0	0	0	0	5.88	7.06	1.18
MALDI-TOF จำนวน (n)	38	37	1	4	1	2	2	0	0	0
MS ร้อยละ	44.71	43.53	1.18	4.71	1.18	2.35	2.35	0	0	0

ตารางที่ 4 แสดงตัวอย่างการจำแนกสปีชีส์ซ้ำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบน CHROMagar, Germ tube test และ Chlamydo-spore formation test

Specimen number	Re-identification			Identification	
	ลักษณะโคโลนีบน CHROMagar	Germ tube test	Chlamydo-spore formation test	CHROMagar	MALDI-TOF MS
U26	 <p>สีเขียว (เพาะเลี้ยง 37°C 24 ชั่วโมง)</p>	Negative	Negative	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichosporon asahii</i>

สรุปและอภิปรายผล

โคโลนีของเชื้อที่ได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรีที่สงสัยมีการติดเชื้อ *Candida* spp. นำมาแบ่งกลุ่มตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เก็บได้ตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ 1) ปัสสาวะ มีจำนวน 60 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70.59 2) นหนอง มีจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.53 และ 3) Hemoculture มีจำนวน 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.88 รวมทั้งสิ้น 85 ตัวอย่าง

จากผลการทดสอบวินิจฉัยแยกสปีชีส์ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้ง 85 ตัวอย่างด้วยวิธี MALDI-TOF MS สามารถจำแนกสปีชีส์จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้ถึงระดับสปีชีส์ จำนวน 85 ตัวอย่าง ส่วนผลการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar ได้ถึงระดับสปีชีส์ จำนวน 78 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ถึงระดับสกุล จำนวน 6 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกได้ถึงระดับวงศ์ จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งจากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าวิธี MALDI-TOF MS สามารถจำแนกได้ในระดับสปีชีส์มากกว่าวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ คือวิธี MALDI-TOF MS สามารถจำแนกสปีชีส์ *Candida* spp. ได้ร้อยละ 98.4 ส่วนวิธีดั้งเดิมสามารถจำแนกสปีชีส์ได้ร้อยละ 91.5 [12] ซึ่งวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar อาจมีข้อจำกัดของกระบวนการที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ เช่น ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. asahii* บน SDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อให้ลักษณะโคโลนีกลม หนูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่นคล้ายกับลักษณะโคโลนีของ *C. albicans* ในขณะที่เมื่อเพิ่มระยะเวลาเพาะเลี้ยงเป็น 120 ชั่วโมง (5 วัน) จะให้ลักษณะโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไป คือ ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าขรุขระ แห้ง สีครีม [13] อีกทั้งยังพบว่า *T. asahii* มีความสามารถในการเจริญและให้สีบน CHROMagar ได้ ดังนั้นจึงทำให้วิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar มีอัตราการจำแนกสปีชีส์ไม่สอดคล้องกับวิธี MALDI-TOF MS

จากผลวิเคราะห์การเปรียบเทียบผลการจำแนกสปีชีส์ในสิ่งส่งตรวจ ระหว่างวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar และวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเชื้อ *C. albicans* และ *C. tropicalis* มีค่า Concordance index เท่ากับ 178.95% และ 13.51% ตามลำดับ กล่าวได้ว่าวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและวิธี MALDI-TOF MS มีความสอดคล้องของผลการจำแนกสปีชีส์ต่ำ เนื่องจากการจำแนกด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar พบเชื้อ *C. albicans* จำนวน 68 ตัวอย่าง ส่วนการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบเชื้อ *C. albicans* จำนวน 38 ตัวอย่าง จึงทำให้มีค่า Concordance index สูง และการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar พบเชื้อ *C. tropicalis* จำนวน 5 ตัวอย่าง ส่วนการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบเชื้อ *C. a tropicalis* จำนวน 37 ตัวอย่าง จึงทำให้มีค่า Concordance index ต่ำ โดยค่า Concordance index ที่ให้ค่าสูงและต่ำนั้น เกิดจากการรายงานผลการจำแนกในเชิงสปีชีส์และเชิงปริมาณที่ไม่สอดคล้องกันระหว่าง 2 วิธี คือวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar และวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งผลการทดลองในงานวิจัยนี้ให้ผลที่แตกต่างกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ พบว่าจากการเปรียบเทียบอัตราความสอดคล้องของผลการจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิมและวิธี MALDI-TOF การศึกษาก่อนหน้านี้ได้ค่า Concordance index ใกล้เคียง 100% นั้นหมายความว่าผลการจำแนกสปีชีส์ในการศึกษาก่อนหน้านี้ให้ผลการจำแนกที่สอดคล้องกันเนื่องจากผลการวินิจฉัยทั้ง 2 วิธี (วิธีดั้งเดิมและวิธี MALDI-TOF) สามารถให้ผลการจำแนกสปีชีส์ได้จำนวนใกล้เคียงกัน [14] ผู้วิจัยคาดว่าความแตกต่างของอัตราความสอดคล้องระหว่างการศึกษาก่อนหน้าและการทดลองในวิจัยนี้ อาจเกิดมาจากวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน คือ การศึกษาก่อนหน้าใช้วิธีการทดสอบการสร้างห้องอก การทดสอบการสร้าง Chlamydospore และการทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี ในขณะที่การทดลองนี้ ใช้วิธีการสังเกตสีโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar

จากการศึกษาผลการทดสอบจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar และวิธี MALDI-TOF MS ที่ให้ผลการทดสอบไม่สอดคล้องกัน ผู้ทำการวิจัยจึงทำการจำแนกสปีชีส์ซ้ำ โดยการทดสอบสีของโคโลนีบน CHROMagar การสร้างห้องอก และการสร้าง Chlamydospore จากผลการศึกษาข้างต้น พบว่าการจำแนกด้วยวิธีการสังเกตสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar ที่ใช้ใน

ห้องปฏิบัติการมีข้อจำกัดบางประการ เช่น พบว่า *T. asahii* และ *T. inkin* มีความสามารถในการเจริญเติบโตและให้สีโคลนบน CHROMagar ที่คล้ายกับสีโคลนของ *Candida* spp. บางสปีชีส์ โดย *T. asahii* เมื่อเพาะเลี้ยงบน CHROMagar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะให้สีโคลนสีน้ำเงิน ส่วน *T. inkin* เมื่อเพาะเลี้ยงบน CHROMagar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะให้สีโคลนสีเขียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบก่อนหน้า [15] ดังนั้นการทดสอบการวินิจฉัยแยกสปีชีส์ด้วยวิธีการสังเกตสีโคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar เพียงวิธีเดียวอาจทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ การเพิ่มการทดสอบคุณสมบัติการสร้างท่ออก และการทดสอบคุณสมบัติการสร้าง Chlamydo-spore ก็จะช่วยในการวินิจฉัยแยกสปีชีส์ได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้ข้อจำกัดในการเตรียม ระยะเวลา รวมถึงการอ่านผล โดยวิธีการทดสอบการสร้างท่ออก เป็นวิธีที่สามารถจำแนก *C. albicans* ออกจาก *Candida* spp. สปีชีส์อื่น ๆ โดยพบว่า *C. albicans* สามารถสร้างท่ออก ได้ภายในเวลา 2-4 ชั่วโมง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ เป็นวิธีที่ไม่มี ความจำเพาะ เนื่องจาก *C. dubliniensis* สามารถสร้างท่ออก ภายในเวลา 2-4 ชั่วโมงได้เช่นเดียวกัน [16] การทดสอบการสร้าง Chlamydoconidia เป็นวิธีที่สามารถจำแนก *C. albicans* และ *C. dubliniensis* ออกจาก *Candida* spp. สปีชีส์อื่น ๆ โดยพบว่า *C. albicans* จะสามารถสร้าง Chlamydo-spore ได้โดยจะพบลักษณะเป็น Single chlamydo-spore ส่วน *C. dubliniensis* จะพบเป็น Multiple chlamydo-spore การสังเกตสีโคลนของ *Candida* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar โดยโคลนบน CHROMagar จะให้สีที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ [17] ซึ่งวิธีนี้สามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่า อีกทั้งการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่ยุ่งยาก ทำได้ง่าย และสามารถอ่านผลทดสอบเบื้องต้นได้ในระดับสปีชีส์ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ พบว่า *Candida* spp. บางสปีชีส์มีสี โคลนใกล้เคียงกัน เช่น *C. dubliniensis* ให้สีของโคลนบน CHROMagar เป็นสีเขียวซึ่งใกล้เคียงกับ *C. albicans* [18] จึงทำให้สามารถแยกสปีชีส์ได้ยาก และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อบางชนิดมีความสามารถในการเจริญ และให้สีของโคลนได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar เช่น *Trichosporon* spp. ให้สีฟ้าเข้มซึ่งใกล้เคียงกับโคลนของ *C. tropicalis* และ *Saccharomyces cerevisiae* ให้สีม่วงซึ่งใกล้เคียงกับ *C. glabrata* เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้วินิจฉัยในการสังเกตสีโคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ [17] การทดสอบโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Commercial assay kit) เป็นการทดสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจน (Carbon assimilation test) ของเชื้อโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วและจากการศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่าการวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของ *Candida* spp. มีความถูกต้องมากกว่า 85% และสามารถจำแนก *C. albicans*, *C. dubliniensis* และ *Pichia kudriavzevii* ได้ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ เนื่องจากการอ่านผลจากความขุ่นซึ่งพบว่าบางการทดสอบ เช่น Glucose ต้องใช้เวลาหลังจากที่ทำการบ่มนานถึง 78 ชั่วโมงจึงจะสามารถอ่านผลการทดสอบได้อย่างชัดเจน การจำแนกสปีชีส์ของ *Candida* spp. โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ พบว่าทั้งสองเทคนิคมีความถูกต้องสูงในการจำแนกสปีชีส์ของ *Candida* spp. แต่ขั้นตอนในการสกัด DNA ของเชื้อรา *Candida* spp. นั้นพบว่าเชื้อราที่มีผนังเซลล์ค่อนข้างหนาจึงทำให้ DNA ของเชื้อที่ได้ไม่บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้เกิดผลลบปลอม (False negative) ได้ และจากการศึกษายังพบว่าการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) และโพรบ (Probe) ให้มีความจำเพาะกับสปีชีส์ของเชื้อนั้นเป็นสิ่งที่สำคัญมาก โดยจากการศึกษาพบว่าการจำแนกสปีชีส์ของ *Candida* spp. โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วย เทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่ำในการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อรา *Candida* spp. โดยไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อชนิดอื่นได้ เช่น *Aspergillus*, *Saccharomyces* และ *Fusarium* เป็นต้น [19]

การใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยขึ้น เช่น วิธี MALDI-TOF MS น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดข้อจำกัด และความคลาดเคลื่อนที่อาจจะเกิดขึ้น อีกทั้งการใช้งานในห้องปฏิบัติการที่เป็น Routine work ถือว่ามีความคุ้มค่าอย่างมากหากใช้ MALDI-TOF MS เนื่องจากสามารถจำแนกสปีชีส์ได้ถึง 96 ตัวอย่างภายในระยะเวลาไม่เกิน 30 นาที ราคาต่อ 1 ตัวอย่างอยู่ที่ประมาณ 100 – 250 บาท (ขึ้นอยู่กับวิธีที่เลือกใช้) ปริมาณตัวอย่างและสารเคมี

ใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 ไมโครลิตร ทั้งนี้แม้ว่าวิธี MALDI-TOF MS จะช่วยลดระยะเวลาในการจำแนกสปีชีส์ แต่วิธี MALDI-TOF MS ก็มีข้อจำกัดบางประการ เช่น เครื่องมือราคาสูง เทคนิคการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ รวมถึงการวินิจฉัยแยกสปีชีส์ขึ้นอยู่กับข้อมูลพื้นฐานข้อมูลอีกด้วย จึงขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในแต่ละห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Schmiedel, Y., and Zimmerli, S. (2016). Common invasive fungal diseases: An overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. *Swiss Med Wkly*, 146, w14281.
- [2] Tan, T. Y., Hsu, L. Y., Alejandria, M. M., Chaiwarith, R., Chinniah, T., Chayakulkeeree, M., Choudhury, S., Chen, Y. H., Shin, J. H., Kiratisin, P., Mendoza, M., Prabhu, K., Supparatpinyo, K., Tan, A. L., Phan, X. T., Tran, T. T., Nguyen, G. B., Doan, M. P., Huynh, V. A., Nguyen, S. M., Tran, T. B., and Van Pham, H. (2016). Antifungal susceptibility of invasive *Candida* bloodstream isolates from the Asia-Pacific region. *Med Mycol*, 54(5), 471-477.
- [3] Moriyama, B., Gordon, L. A., McCarthy, M., Henning, S. A., Walsh, T. J., and Penzak, S. R. (2014). Emerging drugs and vaccines for candidemia. *Mycoses*, 57(12), 718-733.
- [4] Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., and Rogers, P. D. (2017). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. *Front Microbiol*, 7, 2173.
- [5] Terças, A. L., Marques, S. G., Moffa, E. B., Alves, M. B., de Azevedo, C. M., Siqueira, W. L., and Monteiro, C. A. (2017). Antifungal Drug Susceptibility of *Candida* Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. *Front Microbiol*, 8, 298.
- [6] Lindberg, E., Hammarström, H., Ataollahy, N., and Kondori, N. (2019). Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. *Sci Rep*, 9(1), 3838.
- [7] Wu, P. F., Liu, W. L., Hsieh, M. H., Hii, I. M., Lee, Y. L., Lin, Y. T., Ho, M. W., Liu, C. E., Chen, Y. H., and Wang, F. D. (2017). Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-albicans *Candida* species from cancer patients. *Emerg Microbes Infect*, 6(10), e87.
- [8] Bonfietti, L. X., Martins, M. A., Szeszs, M. W., Pukiskas, S. B. S., Purisco, S. U., Pimentel, F. C., Pereira, G. H., Silva, D. C., Oliveira, L., and Melhem, M. S. C. (2012). Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol*, 61(7), 1003-1008.
- [9] Posteraro, B., Efremov, L., Leoncini, E., Amore, R., Posteraro, P., Ricciardi, W., and Sanguinetti, M. (2015) Are the Conventional Commercial Yeast Identification Methods Still Helpful in the Era of New Clinical Microbiology Diagnostics? A Meta-Analysis of Their Accuracy. *J Clin Microbiol*, 53(8), 2439-2450.

- [10] Patel R. (2019). A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *J Fungi (Basel)*, 5(1), 4.
- [11] Ali R. Hameed, Sabah M. Ali, and Luma T. Ahmed. (2018). Biological study of *Candida* species virulence Factor. *International Journal of Advanced Research in Engineering & Technology*, 1(4), 8-16.
- [12] Aslani, N., Janbabaie, G., Abastabar, M., Meis, J. F., Babaeian, M., Khodavaisy, S., Boekhout, T., and Badali H. (2018). Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Infect Dis*, 18(1), 24.
- [13] Go, S. E., Lee, K. J., Kim, Y., Choi, J. K., Kim, Y. J., and Lee, D. G. (2018). Catheter-Related *Trichosporon asahii* Bloodstream Infection in a Neutropenic Patient with Myelodysplastic Syndrome. *Infect Chemother*, 50(2), 138-143.
- [14] Sow, D., Fall, B., Ndiaye, M., Ba, B. S., Sylla, K., Tine, R., Lô, A. C., Abiola, A., Wade, B., Dieng, T., Dieng, Y., Ndiaye, J. L., Hennequin, C., Gaye, O., and Faye, B. (2015). Usefulness of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Routine Identification of *Candida* Species in a Resource-Poor Setting. *Mycopathologia*, 180(3-4), 173-179.
- [15] Yu, S. Y., Guo, L. N., Xiao, M., Kudinha, T., Kong, F., Wang, H., Cheng, J. W., Zhou, M. L., Xu, H., and Xu, Y. C. (2018). *Trichosporon dohaense*, a rare pathogen of human invasive infections, and literature review. *Infect Drug Resist*, 11, 1537-1547.
- [16] Neppelenbroek, K. H., Seó, R. S., Urban, V. M., Silva, S., Dovigo, L. N., Jorge, J. H., and Campanha, N. H. (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*, 20(4), 329-344.
- [17] Ghelardi, E., Pichierri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A., and Campa, M. (2008). Efficacy of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect*, 14(2), 141-147.
- [18] Eraso, E., Sahand, I. H., Villar-Vidal, M., Marcos, C., Dolores Moragues, M., Madariaga, L., Pontón, J., and Quindós, G. (2006). Usefulness of *Candida* ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Med Mycol*, 44(7), 611-615.
- [19] Maaroufi, Y., Heymans, C., De Bruyne, J. M., Duchateau, V., Rodriguez-Villalobos, H., Aoun, M., and Crokaert, F. (2003). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol*, 41(7), 3293-3298.