

Module: Skin and related connective tissues

Lab 5: Fungal and viral infection

ผศ.กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์
รศ.พญ.ทิพยา เอกลักษณานันท์

Fungal infection

บทนำ

การวินิจฉัยหาเชื้อราในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ผิวหนังหรือเยื่อเมือกมีอาการติดเชื้อรา จะเริ่มจากการเก็บสิ่งส่งตรวจจากรอยโรคด้วยวิธีที่ถูกต้องและเหมาะสม ในกรณีที่มีการติดเชื้อที่ผิวหนังและเห็นรอยโรคชัดเจน การทำ skin scraping จะเป็นวิธีที่ได้สะดวกและง่ายที่สุด ส่วนถ้ามีการติดเชื้อที่เยื่อเมือก เช่น เยื่อช่องปาก, เยื่อหูอักเสบสืบพันธุ์ จะสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจโดยใช้ swab สำลี และในการเก็บสิ่งส่งตรวจทุกครั้ง จะต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อที่เหมาะสมเช่นเดียวกับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำสิ่งส่งตรวจมาตรวจหาเชื้อราโดยการเพาะแยกเชื้อในอาหารและตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. การเพาะแยกเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจ เป็นขั้นตอนสำคัญที่จำเป็นสำหรับการระบุชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุก่อโรค อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA) หรือ SDA+ chloramphenical หรือ Mycosel agar ซึ่งเป็น SDA+ Chloramphenical+ Cycloheximide หลังจากได้สิ่งส่งตรวจลงไปแล้ว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 oC บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และทำการระบุชนิดของเชื้อราตามขั้นตอนที่เหมาะสมต่อไป

2. การตรวจหาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจหาโครงสร้างของเชื้อราในสิ่งส่งตรวจ สามารถช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคและให้การรักษาผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็ว การเตรียมสิ่งส่งตรวจทำได้หลายวิธี ขึ้นกับลักษณะของสิ่งส่งตรวจ ถ้าเป็น Skin scraping หรือหนอง หรือ เป็นสารกึ่งเหลวจาก swab สามารถนำมาเตรียมสไลด์ด้วยวิธี KOH preparation ถ้าเป็นของเหลว สามารถ wet mount ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หรือ smear แล้วย้อมสีเช่น Gram's stain ได้

การทดลองที่ 1 การทำ KOH preparation

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาสามารถ

1. ตรวจหาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจโดยการทำ KOH preparation ได้
2. บอกลักษณะของเชื้อราที่พบจากสิ่งส่งตรวจโดยวิธี KOH preparation ได้
3. ระบุกลุ่มของเชื้อราและวินิจฉัยโรคติดเชื้อราได้จากลักษณะของเชื้อราที่พบในสิ่งส่งตรวจ

วัสดุอุปกรณ์

1. Skin scraping ของผู้ป่วย โรคติดเชื้อราที่ผิวหนัง โรคกลาก และ/หรือ เกื้ออื่น
2. 20% KOH
3. Forcep

4. สไลด์แก้ว และ cover glass

5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีทำ

1. หยด 20% KOH ลงบนสไลด์แก้ว 1 หยด

2. ใช้ forcep คีบ skin scraping วางบนหยด KOH แล้วปิดทับด้วย cover glass

3. นำสไลด์ไปลนไฟพออุ่นๆ 2-3 ครั้ง

4. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า และ 400 เท่า บันทึกลักษณะโครงสร้างของเชื้อราที่พบใน skin scraping

ผลการทดลอง

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1

สิ่งส่งตรวจ	ลักษณะ โครงสร้างเชื้อราที่พบ	วาดรูปลักษณะที่พบ
สะเก็ดผิวหนังผู้ป่วยกลาก		
ขุยผิวหนังผู้ป่วยเกลื้อน		

การทดลองที่ 2 การศึกษารูปร่างลักษณะของ Dermatophytes

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาสามารถ

1. เตรียมตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม Dermatophytes เพื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี tease mount technique ได้

2. บอกลักษณะรูปร่างและ โครงสร้างของเชื้อราสายกลุ่มนี้จากการตัวอย่างที่เตรียมได้

วัสดุอุปกรณ์

1. เข็มเขี่ยเชื้อรา (teasing needle)

2. สี lactophenol cotton blue (LPCB)

3. สไลด์แก้ว และ cover glass

4. ตะเกียงแอลกอฮอล์

5. เชื้อรา Dermatophytes ได้แก่ *Trichophyton sp.*, *Microsporum sp.*, *Epidermophyton sp.* (กลุ่มละ 1 ตัวอย่าง)

วิธีทำ

1. ศึกษารูปร่าง ลักษณะ ผิวหน้าของโคโลนี ตลอดจนสีของ pigment ด้านล่าง ของเชื้อราสายที่ได้รับแต่ละชนิด บันทึกผลในตาราง
2. เตรียมตัวอย่างของราสายดังกล่าวโดยวิธี tease mount technique
3. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า และ 400 เท่า บันทึกลักษณะใยรา และโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ ลักษณะของสปอร์ ในตารางบันทึกผล พร้อมวาดรูป

ผลการทดลอง

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2

เชื้อรา	ลักษณะของโคโลนี	ลักษณะของใยราและโครงสร้างที่เกี่ยวข้อง	ลักษณะของสปอร์และโครงสร้างที่เกี่ยวข้อง

วาดรูปแสดงลักษณะของเชื้อราที่พบจากกล้องจุลทรรศน์



การสาธิตที่ 1 ลักษณะที่ใช้ในการระบุชนิดของ *Candida albicans*

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ นักศึกษาสามารถบอกขั้นตอนที่ใช้ในการระบุชนิดของ *Candida albicans* ได้
วัสดุอุปกรณ์

1. Slide บนกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะ budding yeast cells ของ *Candida albicans*
2. Slide บนกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะการสร้าง chlamydospore ของ *C. albicans* ที่พบจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแป้งข้าวโพดผสม tween 80
3. Slide บนกล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะ germ tube ของ *C. albicans* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน plasma อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 3 ชั่วโมง

วิธีการ นักศึกษาทำการศึกษาดูตัวอย่างของเชื้อราที่จัดแสดงด้วยตนเอง และบันทึกลักษณะของเชื้อราที่พบในตารางที่ 1

ตารางบันทึกผลการสาธิตที่ 1

ลักษณะ	บันทึกลักษณะที่พบ	วาดรูปลักษณะที่พบ
Budding yeast cells		
Chlamydospores		
Germ tube		

การสาธิตที่ 2 ลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของเชื้อรากลุ่ม Dermatophytes

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ นักศึกษาสามารถ

1. บอกลักษณะ โครงสร้างทางกายและโครงสร้างสืบพันธุ์ของเชื้อราสายที่จัดแสดงได้
2. บอกชื่อสกุล หรือกลุ่มของราสายที่จัดแสดงได้

วัตถุประสงค์ Slide บนกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของตัวอย่าง Dermatophytes 3 สกุล คือ *Trichophyton sp.*, *Microsporum sp.*, และ *Epidermophyton sp.*

วิธีการ นักศึกษาทำการศึกษาตัวอย่างของเชื้อราที่ตัวเองได้เตรียม และบันทึกลักษณะของเชื้อราที่พบในตารางที่ 2

ตารางบันทึกผลการสาธิตที่ 2

เชื้อรา	ลักษณะโครงสร้างที่พบ	วาดรูปโครงสร้างที่พบ
<i>Trichophyton sp.</i>		
<i>Microsporum sp.</i>		
<i>Epidermophyton sp.</i>		

Viral infection

หลักการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส

โดยทั่วไปการที่จะบอกว่าคน ๆ หนึ่งมีการติดเชื้อไวรัสหรือไม่นั้น ต้องหาหลักฐานว่ามีการติดเชื้อไวรัสจริง คือการตรวจหาไวรัสจากคน ๆ นั้น หรือการตรวจหาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสนั้น ในกรณีการตรวจหาไวรัสจากผู้ติดเชื้อสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งจัดเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Direct examination ได้แก่ การตรวจหาอนุภาคของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส การตรวจหารดนิวคลีโอทิกของไวรัส การตรวจดูเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสซึ่งมีลักษณะจำเพาะด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. Viral isolation หรือการเพาะเลี้ยงแยกเชื้อไวรัส

3. Serology เป็นการหาหลักฐานการติดเชื้อในซีรัมของผู้ป่วย ได้แก่ การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับไวรัสที่สงสัย ซึ่งเป็นการตรวจหาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสนั้นเอง

อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดไม่สามารถทำได้ทุกวิธีที่กล่าวมา ขึ้นอยู่กับว่ามีวิธีใดบ้างที่ถูกพัฒนาขึ้นมาสำหรับตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดนั้น

นอกจากนี้ผู้แปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการควรมีความรู้เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดเป็นอย่างดีจึงจะสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจ และแปลผลการตรวจได้อย่างถูกต้อง

การเลือกวิธีการและชนิดของสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสทางห้องปฏิบัติการมีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิด และวิธีการที่ใช้ในการตรวจ ดังนั้นก่อนเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย ควรตรวจสอบว่าห้องปฏิบัติการใช้วิธีการใด และใช้สิ่งส่งตรวจชนิดใด ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการสามารถให้บริการได้หลายวิธีแพทย์สามารถเลือกวิธีการตรวจได้ โดยทั่วไปให้พิจารณา ดังนี้

- รอยโรคอยู่ในบริเวณที่เก็บสิ่งส่งตรวจได้ง่าย เช่น ที่ผิวหนัง และการติดเชื้อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น inclusion body และ multinucleated giant cell การตรวจนี้จะเป็นวิธีที่เลือกใช้ เพราะทำได้ง่ายและรวดเร็ว

- การตรวจหาแอนติบอดีสามารถใช้วินิจฉัยได้หรือไม่ เพราะการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในร่างกาย การตรวจหาแอนติบอดีอาจไม่ช่วยในการวินิจฉัย และการติดเชื้อเฉพาะที่บางชนิดอาจไม่มีการสร้างแอนติบอดี นอกจากนี้การตรวจหาแอนติบอดีอาจไม่ช่วยในการดูแลรักษาเพราะต้องเจาะเลือด 2 ครั้งห่างกัน 1-4 สัปดาห์ ยกเว้นบางโรคที่มีวิธีการตรวจหา specific IgM สามารถทราบผลจากการเจาะเลือดครั้งเดียว ข้อดีของการตรวจหาแอนติบอดี คือ เก็บสิ่งส่งตรวจได้ง่าย วิธีการส่งไม่ยุ่งยาก

- เชื้อก่อโรคสามารถเพาะเลี้ยงได้หรือไม่ ห้องปฏิบัติการบางแห่งสามารถให้บริการตรวจแยกเชื้อไวรัสแต่ก็มีข้อจำกัดด้านเซลล์เพาะเลี้ยง ไวรัสแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับเซลล์เพาะเลี้ยง แม้ว่าเชื้อก่อโรคนั้นสามารถเพาะเลี้ยงได้ก็ควรสอบถามห้องปฏิบัติการก่อนว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสชนิดนั้นได้หรือไม่ นอกจากนี้ต้องทราบว่าเชื้อไวรัสนั้นมีอยู่ที่ใดบ้างในร่างกายหรือ แพร่กระจายออกจากร่างกายของผู้ป่วยทางใด เพื่อจะได้เก็บสิ่งส่งตรวจได้ถูกต้อง

- เวลาที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์อยู่ในช่วงใดของการดำเนินโรค ต้องทราบว่าสิ่งที่ต้องการจะตรวจหาจะพบได้ในช่วงเวลาใด เช่น การตรวจแยกเชื้อไวรัสควรทำในระยะแรกของการป่วย

การสาธิตที่ 3: Tzanck's test (ดูผลที่ดูแสดง)

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ให้นักศึกษา

1. สามารถอธิบายวิธีการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ herpes simplex virus และ varicella-zoster virus โดย Tzanck's test
2. อ่านผล และแปลผลได้

Tzanck's test เป็นวิธีการตรวจหาเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส

การเก็บสิ่งส่งตรวจ: ขูดเอาเซลล์ที่ฐานของตุ่มน้ำใส (vesicular scrape) ของผู้ป่วยแล้วนำมา smear บน สไลด์

วิธีทำ: ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa หรือ Wright

การอ่านผล : ผลบวกคือพบเซลล์ขนาดใหญ่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell หรือ syncytial cell) ซึ่งเกิดจากการหลอมรวมกันของเซลล์ที่ติดเชื้อหลายเซลล์

การแปลผล : พบผลบวกได้ในโรคริม อีสุกอีใส และงูสวัด การแปลผล ให้ดูจากอาการทางคลินิกร่วมด้วย วิธีการตรวจยืนยันชนิดของไวรัสคือ immunofluorescence test ซึ่งเป็นการย้อมเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยแอนติบอดีต่อไวรัสชนิดที่สงสัยซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เมื่อตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์จะพบเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนั้นเรืองแสง

หมายเหตุ Tzanck's test เป็นวิธีที่นักศึกษาสามารถทำได้เองเมื่อเรียนในชั้นคลินิก

References

1. กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์. วิทยาเชื้อราพื้นฐาน Basic Mycology. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2546: 218-234.
2. นเรศ วโรภาสตระกูล. รูปร่างและโครงสร้างของเชื้อรา ใน : กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์, กัญญลักษณ์ ชัยคำภา, บรรณาธิการ. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา Microbiology Laboratory Manual.ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2542 : 10-1 -7.
3. GS de Hoog, J Guarro, J Gene, MJ Figueras. Atlas of Clinical Fungi 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2000: 39-53.

Appendix

1. Lactophenol cotton blue: Phenol crystals 20 g, Lactic acid 20 ml, Glycerol 40 ml, Distilled water 20 ml, Cotton Blue 0.05 g.
2. 20%KOH Solution: KOH 20 g, Glycerol 20 ml, Distilled water 80 ml