

PCR-sequencing study of invasive fungal rhinosinusitis by histopathologic samples

Miss Saichon Chaturantabut



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

การศึกษาโรคติดเชื้อราชนิดลูกกลมในโพรงจมูกและไซนัสโดยวิธีพีซีอาร์ซีเควนซึ่งจากชิ้นเนื้อทาง
พยาธิวิทยา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาโรคติดเชื้อราชนิดลูกกลมในโพรงจมูกและไซนัส โดยวิธีพีซีอาร์ซีเควนซึ่งจากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา
โดย	นางสาวสายชนม์ จาตุรันตบุตร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ ศิลาวัดน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์นครินทร์ กิตกำธร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ ศิลาวัดน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทันทแพทย์นครินทร์ กิตกำธร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุพินดา คุณมี)

สายชนม์ จาตุรันตบุตร : การศึกษาโรคติดเชื้อราชนิดลูกกลมในโพรงจมูกและไซนัสโดยวิธีพีซีอาร์ซีควนจิงจากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (PCR-sequencing study of invasive fungal rhinosinusitis by histopathologic samples) อ.ที่ปริกษาวิทยาลัยพนธ์หลัก: รศ. นพ.สมบุญ คีลาวัฒน์, อ.ที่ปริกษาวิทยาลัยพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำธร, 75 หน้า.

บทคัดย่อ

ความเป็นมา โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมเป็นโรคที่มีความรุนแรงโดยพบอัตราการพิการและการตายที่สูงหากไม่ได้รับการวินิจฉัยที่รวดเร็วหรือต้องคอยผลการยืนยันชนิดของเชื้อก่อโรค อาจทำให้การเริ่มต้นรักษาเยียดออกไป ก่อให้เกิดการแพร่กระจายการติดเชื้อนำไปสู่การตายได้ *จุดมุ่งหมาย* 1) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจหาชนิดของเชื้อราที่พบบ่อยในโรคนี้ 2) เพื่อหาความชุกของเชื้อราในเนื้อเยื่อตัวอย่างผู้ป่วยด้วยโรคนี้ *วิธีการทดลอง* ตัวอย่างในการทดลองเป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการแช่ฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน จากนั้นนำมาตรวจยืนยันเชื้อราที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง แล้วจึงนำตัวอย่างมาตัดและทำการสกัดดีเอ็นเอเก็บไว้เพื่อทำพีซีอาร์ เริ่มจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ZP3 (housekeeping) ตามด้วยไพรเมอร์ panfungal และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อราที่ออกแบบมาใหม่เรียกว่าไพรเมอร์ differentiated *ผลการทดลอง* จากจำนวนผู้ป่วย 81 ราย พบว่ามีเนื้อเยื่อตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจนตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ differentiated และทำ PCR-sequencing ได้ผลอยู่ 20 ราย ใน 20 รายนี้ 9 ราย (45%) มีการติดเชื้อ Aspergillus sp. 4 ราย (20%) ติดเชื้อ Candida sp. 4 ราย (20%) ติดเชื้อ Cladosporium sp. 1 ราย (5%) ติดเชื้อ Mucor sp. 1 ราย (5%) ติดเชื้อ Alternaria sp. และ 1 ราย (5%) ติดเชื้อ Dendryphiella sp. โดยไม่พบว่ามี การติดเชื้อ Fusarium sp.ในการทดลองนี้ *สรุปผลการทดลอง* โดยสรุปแล้วไพรเมอร์ที่ออกแบบมาสามารถใช้หาชนิดของเชื้อราได้อย่างจำเพาะ ซึ่งมีประโยชน์สำหรับแพทย์ในการรักษาโรคได้ทันเวลา นอกจากนี้สามารถให้ยาด้านเชื้อราต่อเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดจากการศึกษานี้ได้ในช่วงตอนต้นของการเกิดโรคโดยยังไม่ต้องทราบชนิดของเชื้อราหรือในระหว่างการรอผลทางห้องปฏิบัติการ



สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5574170030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: INVASIVE FUNGAL RHINOSINUSITIS / PCR-SEQUENCING / ASPERGILLUS SP.

SAICHON CHATURANTABUT: PCR-sequencing study of invasive fungal rhinosinusitis by histopathologic samples. ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON KEELAWAT, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NAKARIN KITKUMTHORN, D.D.S.,Ph.D., 75 pp.

Abstract

Background: Invasive fungal rhinosinusitis (IFR) is a fatal disease with high morbidity and mortality rates. Without prompt diagnosis and definite fungus confirmation, specific therapy can be delayed leading to more severe infection and death. *Aims:* 1) To design a pair of primers for detection of common fungi causing invasive fungal rhinosinusitis 2) to evaluate the prevalence of fungal organisms. *Methods:* Formalin-fixed paraffin-embedded samples from eighty-one patients who were pathologically diagnosed with IFR were enrolled in this study. After confirmation of histological appearance of every sample, each sample was deparaffinized and followed by DNA extraction. Thereafter, PCRs of ZP3 (housekeeping gene), panfungal PCR and specific PCR-Sequencing (Differentiated PCR) was performed sequentially. *Results:* Of 81 cases 20 cases were capable for differentiated PCR-sequencing. Among 20 cases, 9(45%) were infected with *Aspergillus sp.*, 4(20%) with *Candida sp.*, 4(20%) with *Cladosporium sp.*, 1(5%) with *Mucor sp.*, 1(5%) with *Alternaria sp.* and 1 case(5%) with *Dendryphiella sp.* There was no *Fusarial* infection found in this study. *Conclusion:* Our in-house primers can specify fungal species which benefit for physicians in management of IFR on time. Moreover empirical anti-fungal drugs directed to the common types of fungi as revealed by this study can be started early in the course of disease while waiting for laboratory result.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ ที่เมตตาสละเวลา ทุ่มเทกำลังสติปัญญา และคอยเป็นผู้ให้คำแนะนำปรึกษาและเป็นกำลังใจในการเรียนและการทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการให้ได้รับผลงานจนประสบความสำเร็จ และขอขอบพระคุณในความช่วยเหลือในการแก้ไขและข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์ในการเขียนผลงานวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์นครินทร์ กิตกัธธในการเป็นกำลังใจสำคัญในการให้คำแนะนำแก้ไขปรับปรุงการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการและการรวบรวมการเขียนในส่วนต่างๆของวิทยานิพนธ์ และข้อสังเกตที่น่าสนใจ รวมถึงการเดินทางของงานวิจัยทุกขั้นตอนในครั้งนี้โดยมีอาจารย์ให้คำแนะนำและเสนอแนะตลอดมา ขอขอบพระคุณอาจารย์อภิวัฒน์ มุทิตรากร ในการดูแลการทำงานในห้องปฏิบัติการด้วยความอบอุ่นและเอาใจใส่จนประสบความสำเร็จในงานวิจัยและให้คำแนะนำอันมีคุณค่ายิ่งในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบพระคุณอาจารย์วิไล ชินธเนศ และอาจารย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ในการเอาใจใส่สอบถามและเป็นกำลังใจจนผลงานประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณนักศึกษาและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ได้ทำงานร่วมกัน ในความเป็นมิตรไมตรี ให้ความรู้ และแลกเปลี่ยนประสบการณ์ในการศึกษาและการทำงาน และได้ให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ที่ได้สนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยจนได้ผลงานที่ประสบความสำเร็จด้วยดี และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่เป็นทั้งแบบอย่างที่ดีและให้คำสั่งสอนที่มีคุณค่าในการศึกษาเล่าเรียนจนจบและในการทำงานในอนาคตต่อไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	1
บทที่1 บทนำ.....	1
บทที่2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่3 วิธีการทดลอง.....	15
1. การเก็บตัวอย่าง.....	17
2. ที่มาของ positive control (เชื้อรา 2 ชนิด).....	19
3. การดูลักษณะทางคลินิกเทียบกับชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบโดยวิธี PCR.....	19
4. การสกัดดีเอ็นเอ.....	20
5. การออกแบบไพรเมอร์.....	21
6. การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอ.....	22
7. ทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ.....	22
8. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction.....	22
9. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยกระบวนการโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพรเรซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis).....	26
10. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยกระบวนการอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโพรเรซิส (Agarose gel electrophoresis).....	27
11. การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดย SYBR Green Dye และการตัดเจล.....	27
12. ขั้นตอนวิธีการสกัดเจล (Gel Extraction).....	27

13. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์.....	28
14. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์.....	28
15. การตรวจหาลำดับเบสที่จำเพาะของดีเอ็นเอของเชื้อราหรือ sequencing.....	29
16. การวิเคราะห์เพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อราก่อโรคโพรงงมูกอีกเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในตัวอย่าง.....	29
17. การดูลักษณะทางhistopathology เทียบกับชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบโดยวิธี PCR.....	29
บทที่4 ผลการทดลอง	31
บทที่5 อภิปรายผลการทดลอง.....	43
บทที่6 สรุปผลการทดลอง	46
รายการอ้างอิง.....	47
ภาคผนวก.....	49
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	75



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 รายชื่อเชื้อราและรหัสชื่อเชื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) หรือ Thailand Institute of Scientific Technological Research (TISTR)	19
ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสและ melting temperature ของ primer forward และ primer reverse	22
ตารางที่ 3 ลำดับดีเอ็นเอและการตั้งค่าสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR ในการทดสอบยีน internal control ZP3	23
ตารางที่ 4 ลำดับดีเอ็นเอและการตั้งค่าสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR ในการทดสอบหาเชื้อรา Pan fungal ในตัวอย่าง	24
ตารางที่ 5 ชนิดของเชื้อราและขนาดของพีซีอาร์โปรดักส์	25
ตารางที่ 6 ลำดับดีเอ็นเอและการตั้งค่าสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR ในการหาเชื้อรา positive control และเชื้อราสาเหตุของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในตัวอย่างผู้ป่วย	26
ตารางที่ 7 Morphology of fungi	30
ตารางที่ 8 แสดงผลการวินิจฉัยด้วยการดูรูปร่างของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์และผลการวินิจฉัยชนิดของเชื้อราจากการศึกษาทางโมเลกุล	38
ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลผู้ป่วยและผลการวินิจฉัยทางคลินิกเทียบกับผลการวินิจฉัยทางโมเลกุล	40

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 แสดงdifferentiated primers : forward primer และ reverse primer.....	31
รูปภาพที่ 2 แสดง sensitivity of differentiated primers มีค่าอยู่ที่ 0.1 ng	32
รูปภาพที่ 3 แสดงการนำลำดับเบสของเชื้อ positive control ชนิด Aspergillus fumigatus ที่ ได้ทำ sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ Aspergillus sp. สปีชีส์ต่างๆที่สืบค้น จากเว็บไซต์ NCBI พบลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะต่อลำดับเบสของ Aspergillus fumigatus	33
รูปภาพที่ 4 แสดงการนำลำดับเบสของเชื้อ positive control ชนิด Fusarium solani ที่ได้ทำ sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ Fusarium sp. สปีชีส์ต่างๆที่สืบค้นจาก เว็บไซต์ NCBI พบลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะต่อลำดับเบสของ Fusarium solani.....	34
รูปภาพที่ 5 ลำดับขั้นตอนการทดลองและผลการทดลอง	35
รูปภาพที่ 6 Electrophoresis A,ZP3 primer; B, Panfungal primer ; C,Differentiated primer; M, DNA ladder 100bp; Neg, distilled water	36
รูปภาพที่ 7 ลักษณะรูปร่างของเชื้อราเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ A,Aspergillus sp.; B,Candida sp.; C,Cladosporium sp.; D,Mucor sp.; E,Alternaria sp.; F,Dendryphiella sp.	39

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อราเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคโพรงจมูกอักเสบที่พบได้ไม่บ่อยที่มีอัตราการเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้น ในปัจจุบัน มีเชื้อราหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อรา เช่น *Aspergillus sp.*, เชื้อราในกลุ่ม Dematiaceous และ Zygomycetes เชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคอาจแตกต่างกันในประเทศทางตะวันตกกับประเทศทางตะวันออกหรือในประเทศไทย โดยมีรายงานหนึ่งจากประเทศอินเดียได้กล่าวไว้ว่าพบเชื้อราชนิด dematiaceous ในประเทศทางตะวันตกได้บ่อยกว่า ในขณะที่พบเชื้อ *Aspergillus sp.* ได้บ่อยกว่าในอนุทวีปอินเดีย(1) โดยเชื้อราที่ต่างชนิดกันจะให้การรักษาที่แตกต่างกันออกไป(2-4)

ในการรักษาผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบ สามารถแบ่งผู้ป่วยได้เป็น 2 กลุ่มคือ ผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลุกลาม ซึ่งได้แก่ fungal ball และ allergic fungal sinusitis(5) และผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม(4)งานวิจัยครั้งนี้ ผู้ศึกษาสนใจศึกษาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคที่อันตราย มีผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมและทัน่วงที ส่วนโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลุกลามนั้น เป็นโรคที่มีผู้ศึกษาค่อนข้างมากเนื่องจากเป็นโรคที่พบได้บ่อย(1) และมักไม่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต

สำหรับกลุ่มโรคที่ผู้ศึกษาต้องการให้ความสำคัญในการวิจัยครั้งนี้คือ กลุ่มโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดคือ 1. โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเฉียบพลัน 2. โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบ Granulomatous และ 3. โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเรื้อรัง(6) ในการรักษาโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามทั้ง 3 กลุ่มนี้ แพทย์จะทำการผ่าตัดส่องกล้องและตัดชิ้นเนื้อ และให้ยาทางระบบเพิ่มเติมในการผ่าตัดจะให้การรักษามีหลักการเหมือนกันคือผ่านเนื้อเยื่อที่ตายและเนื้อเยื่อที่มีเชื้อราลุกลามเข้าไปออกให้หมด ส่วนการรักษาทางระบบด้วยยาจะต่างกันออกไปตามชนิดของเชื้อรา(2-4)

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้ศึกษามีจุดมุ่งหมายในการค้นหาชนิดของเชื้อราที่พบบ่อยซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม รวมทั้งการพัฒนา primers เพื่อตรวจหาเชื้อราโดยวิธีทาง

PCR technique ซึ่งมีการอ้างอิงจากหลายรายงานว่ามีความไวและมีความจำเพาะต่อการพบเชื้อมากที่สุด เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการดูแลผู้ป่วยให้ได้รับการรักษาด้วยยาที่ตรงกับชนิดของการติดเชื้อนำไปช่วยให้มีการรักษาเบื้องต้นที่ถูกต้องก่อนที่โรคจะดำเนินลุกลามมากขึ้นหรือระหว่างรอผลการตรวจหาชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

คำถามงานวิจัย

1. ไพรเมอร์ที่ออกแบบของกระบวนการพีซีอาร์ซีเควนซึ่งในการหาเชื้อราที่ก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษามีประสิทธิภาพเพียงใด
2. ชนิดของเชื้อราที่พบบ่อยในการก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามเป็นเชื้อชนิดใดบ้าง
3. ลักษณะทางพยาธิวิทยาและลักษณะทางคลินิกมีความสัมพันธ์เพียงใดต่อชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามที่หาได้จากกระบวนการพีซีอาร์ซีเควนซึ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบไพรเมอร์ของกระบวนการพีซีอาร์ซีเควนซึ่งในการหาเชื้อราที่ก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษา
2. เพื่อหาชนิดของเชื้อราที่พบบ่อยในการก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษา
3. เพื่อหาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพยาธิวิทยาและลักษณะทางคลินิกว่ามีความสัมพันธ์เพียงใดต่อชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามที่หาได้จากกระบวนการพีซีอาร์ซีเควนซึ่ง

สมมติฐาน

1. ไพรเมอร์ที่ออกแบบของกระบวนการพีซีอาร์ซีเควนซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจหาชนิดของเชื้อราที่ก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษา
2. เชื้อ *Aspergillus sp.* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในการก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษา

3. ลักษณะทางพยาธิวิทยาและลักษณะทางคลินิกสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์ชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR ให้มีความจำเพาะต่อการตรวจหาชนิดของเชื้อรา เพื่อใช้ในการตรวจหาชนิดของเชื้อราที่จำเพาะกว่าการตรวจทางพยาธิวิทยาและมีความไวสูงกว่าการเพาะเชื้อ และผลการวิจัยยังจะช่วยให้พบชนิดของเชื้อรากลุ่มโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษา ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาเบื้องต้นไปก่อนในผู้ป่วยที่พบว่าเป็นโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม โดยไม่ต้องรอผลของการตรวจหาชนิดของเชื้อราทางห้องปฏิบัติการซึ่งใช้เวลาหลายวัน นอกจากนี้ผลที่ได้ยังสามารถนำมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะทาง histopathology เพื่อทราบถึงความแม่นยำของการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อรากลุ่มโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมได้ต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การวินิจฉัยและการแบ่งแยกโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อรา

โรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราเป็นโรคที่พบได้ไม่บ่อย แต่มาในระยะหลังนี้มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม โรคนี้มีอัตราการเสียชีวิตสูง(1) แพทย์ควรสงสัยโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในกรณีมีอาการผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ(4) โรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมมักเกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยอาการสำคัญของโรคได้แก่ ไข้ ไอ แผลถลอกของเยื่อบุผิวของโพรงจมูก แผลแข็งดำ คล้ายรอยไหม้ เลือดกำเดาไหล และปวดศีรษะ(1, 4) ภาวะภูมิคุ้มกันต่ำที่มักเกิดร่วมกับโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม ได้แก่ โรคมะเร็ง โดยเฉพาะ leukemia(1, 4), aplastic anemia(3), neutropenia ที่มีนิวโทรฟิลล์ต่ำกว่า 500 เซลล์/mL(2-4, 7) เป็นเวลามากกว่า 10 วัน(7), โรคเบาหวาน, hemochromatosis(3, 4), หรือสภาวะขาดสารอาหารโปรตีน-แคลอรี รูปแบบเรื้อรังของโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมอาจแสดงด้วยการมีลูกตาโปน(2, 4) การมีก้อนบวมในโพรงจมูกหรือ sinus การกัดเซาะกระดูก(2) หรือกลุ่มอาการที่เรียกกันว่า orbital apex syndrome(4) หากไม่ได้รับการเชื้อสามารถลูกกลมเข้าสู่โพรงลูกตาได้(1-3) หรือลูกกลมโดยตรงเข้าสู่เนื้อสมอง(1-4)และหลอดเลือดสมอง(1, 4) ส่งผลให้มีการตีบและและเกิดการตายของเนื้อสมองตามมา(4)

การแยกระหว่างโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมและโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลูกกลม

ในการรักษาผู้ป่วยโรคโพรงงมูกอักเสบ สามารถแบ่งผู้ป่วยได้เป็น 2 กลุ่มคือ โรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลูกกลม และโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม งานวิจัยครั้งนี้ ผู้ศึกษามุ่งการศึกษาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม เนื่องจากโรคนี้เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญคือ มีผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมและทัน่วงที่

มีเชื้อราหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อรา โดยเชื้อที่ถูกรายงานว่าพบบ่อยที่สุดในการก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม ได้แก่ *Aspergillus sp.*, *Mucorales*, *Candida sp.*, *Fusarium sp.*, *Pseudallescheria boydii* และ *Dematiaceous fungi*(1)

กลุ่มอาการของโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม และโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลูกกลม มีลักษณะทางคลินิกแตกต่างกัน กล่าวคือ ผู้ป่วยที่จะติดเชื้อชนิดลูกกลมมักมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ส่วนกลุ่มที่ไม่ลูกกลมมักพบในคนที่มีภูมิคุ้มกันปกติ เชื้อราชนิดลูกกลมมักจะลูกกลมเข้าสู่โครงสร้างของตาหรือเข้าสู่สมอง มีเนื้อเยื่อตายเน่าหรือเป็นหนองมีกลิ่นเหม็นอยู่ในโพรง

จมูก ส่วนเชื้อราชนิดที่ไม่ลุกลามมักเกิดร่วมกับผู้ป่วยที่เป็นโรคฮีตววงจมูก ตัวเชื้อจะจับตัวเป็นก้อน (fungal ball) อยู่ในโพรงจมูกหรือ sinus มักมี calcium มาจับซึ่งทำให้เห็นเป็นจุดที่ติดสีทึบในภาพถ่ายทางรังสี CT(4)

Aspergillus sp. เป็นเชื้อที่ถูกรายงานว่าพบบ่อยที่สุดของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม(2-4) อุบัติการณ์ของการติดเชื้อรา *Aspergillus* ชนิดลุกลาม คือ 1.5% ถึง 4% ในผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายตับ และ 0.4% ถึง 2.4% ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไต ส่วนในผู้ป่วย HIV การติดเชื้อชนิดลุกลามมักจะเกิดในผู้ที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด $CD4^+$ ต่ำมาก (น้อยกว่า $150/\mu L$) และ *Aspergillus* sp. เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มนี้เช่นกัน เชื้อตัวอื่นที่อาจพบได้ในผู้ป่วย HIV ได้แก่ *Cryptococcus neoformans* และ *mucormycosis* (*zygomycosis*) แต่ไม่ค่อยบ่อย(2) โดยทั่วไป เชื้อทั้งสองชนิดมีความรุนแรงกว่า *Aspergillus* sp. โดยพบการลุกลามเข้าสมองได้บ่อยกว่า(2) ส่วน *Candida albicans* พบได้ประมาณ 4 % ของการติดเชื้อในโพรงจมูกของผู้ป่วย AIDS แต่เชื้อราตัวนี้มักทำให้เกิดการติดเชื้อแค่บนผิวเยื่อบุเท่านั้นไม่ค่อยลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันนี้ โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลาม สามารถแยกจากโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลุกลามด้วยการใช้เกณฑ์ทางคลินิก คือทางรังสีวิทยา รวมถึงการตรวจสอบทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ของชิ้นเนื้อจากโพรงจมูก(2, 4, 7, 8) จากการทำ biopsy(1) ตามเกณฑ์การวินิจฉัยในปัจจุบัน ผู้ป่วยที่มีโรคโพรงจมูกอักเสบเรื้อรังที่พบผลเพาะเชื้อจากโพรงจมูกขึ้นเพียงอย่างเดียวแต่ไม่พบตัวเชื้อในการตรวจพยาธิสภาพเนื้อเยื่อทางกล้องจุลทรรศน์จะไม่จัดว่ามีเชื้อราภายในโพรงจมูก(9) ลักษณะทางรังสีวิทยาของโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราอาจมีลักษณะร่วมกับโรคโพรงจมูกอักเสบจากแบคทีเรีย เช่น การมี air-fluid levels หรือมีการหนาตัวของเยื่อเมือกบุผิวที่หุ้มกระดูก(1, 4) มากกว่า 8mm.(4) สิ่งที่น่าพิจารณาสำหรับโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อรา ได้แก่ การเกาะตัวเป็นก้อนแคลเซียม และการหายไปของขอบกระดูกของโพรงจมูก ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น การเพาะเชื้อของสารคัดหลั่งจากจมูกไม่สามารถเชื่อถือได้ในการวินิจฉัยทุกรูปแบบของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อรา

ในการวินิจฉัยแยกโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราทั้งสองชนิดนั้น จำเป็นที่ต้องได้เนื้อเยื่อเพียงพอในการนำมาตรวจทางพยาธิวิทยา และเนื่องจากการย้อมด้วยวิธีปกติ เช่น Haematoxylin and Eosin (H&E) จะเห็นเชื้อราได้ลำบาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้การย้อมด้วย silver-impregnation fungal stains เป็นตัวช่วยในการวินิจฉัย นอกจากนี้ หากสงสัย ควรส่งเนื้อเยื่อไปเพาะเชื้อด้วยเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อรา

โรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม

สำหรับกลุ่มที่ผู้ศึกษาต้องการให้ความสำคัญในการวิจัยครั้งนี้คือ กลุ่มโรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดคือ 1. โพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบเฉียบพลัน 2. โพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบ Granulomatous และ 3. โพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบเรื้อรัง

ในการวิจัยของ Das A, Bal A, et al. โดยวิธีการตรวจทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีผู้ป่วยที่มีโรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบเฉียบพลันมากที่สุด รองลงมาคือรูปแบบ granulomatous และน้อยที่สุดคือ แบบเรื้อรัง โดยมีปริมาณได้แก่ 17.3%, 16.9% และ 1.4% ตามลำดับ(5)

โรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบเฉียบพลัน

Rhinocerebral mucormycosis เป็นโรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อ Mucor มักมีอาการร่วมกับแผลของเพดานปากที่เป็นสีดำปนเนื้อตาย หรือแผลในแผ่นกั้นจมูก โรคนี้หากไม่รักษาให้ทันท่วงที เชื้อราอาจกระจายอย่างรวดเร็วเข้าทางหลอดเลือด และเสียชีวิตภายในไม่กี่วัน(4) อัตราตายของโรคนี้สูงถึง 50% ถึง 80% ในกรณีที่โรคลูกกลมเข้าสู่โพรงงลูกตาและในช่องสมอง(3) มีงานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ได้รายงานว่าอัตราการเสียชีวิตของโรคลดลงโดยพบได้ 7% ถึง 18% ซึ่งสาเหตุเนื่องมาจากการตรวจพบและได้รับการรักษาตั้งแต่ในช่วงต้นของโรค(8) ถึงแม้ว่าจะพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานและผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ แต่ในบางครั้งโรคนี้ก็สามารถเกิดขึ้นได้ในผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีมาก่อน เชื้อราก่อโรคในกลุ่มนี้คือ เชื้อใน order Mucorales ซึ่งได้แก่ rhizopus, rhizomucor, absidia, mucor, cunninghamella, saksenaea และ apophysomyces และกลุ่มอาการที่เกิดจากเชื้อเหล่านี้เรียกว่า zygomycosis(4) เชื้อที่มีการลูกกลมเข้าสู่เส้นเลือดและเส้นประสาทเป็นอย่างมาก ในกลุ่มนี้คือ *Rhizopus sp.*(10) โดย *Rhizopus arrhizus* เป็นเชื้อที่พบบ่อยที่สุดของโพรงงมุกอักเสบชนิดลูกกลมแบบเฉียบพลัน ส่วน *Aspergillus sp.* เป็นเชื้อสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุดในโพรงงมุกอักเสบชนิดลูกกลมแบบเรื้อรัง(1)

การศึกษาทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นการแพร่กระจายของสายราเข้าสู่หลอดเลือด(4, 8) ได้แก่ carotid arteries และ cavernous sinuses(4) การมีหลอดเลือดอักเสบ ก้อนเลือดแข็งตัว การมีเลือดออก(4, 8) การตายของเนื้อเยื่อ(4) เยื่อเมือก ชั้นใต้ต่อเยื่อเมือก และกระดูก(8) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่มีลักษณะที่แน่นอน อาจมีการรวมตัวของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทร

ฟิลล์ หรือบางรายอาจพบปฏิกิริยาอักเสบเพียงเล็กน้อย เห็นเป็นบริเวณเนื้อเยื่อตายแทน นอกจากนี้ยังสามารถพบหลอดเลือดโป่งพองจากเชื้อราได้ด้วยเช่นกัน

กลุ่มอาการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมถึงแผลถลอกในแผ่นกั้นจมูก ถูกเรียกว่า โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบ fulminant ซึ่งมักเกิดจากการติดเชื้อ *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Pseudallescheria boydii* อาการที่พบได้บ่อยที่สุดของการติดเชื้อ คือ การมีไข้(4) โดยเฉพาะไข้โดยไม่ทราบสาเหตุที่ไม่ตอบสนองหลัง 48 ชั่วโมงของการให้ยาปฏิชีวนะชนิดกว้างขวางแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำ(3) ไอ แผลถลอกแข็งของเยื่อบุจมูก เลือดออกทางจมูก และปวดศีรษะ(4) นอกจากนี้อาจพบอาการเฉพาะที่เช่น การเจ็บบริเวณใบหน้าหรือรอบโพรงลูกตา การคั่งบริเวณจมูกและมีน้ำมูกไหล(1,4) โรคนี้มักเกิดในผู้ป่วยที่มีกลุ่มอาการบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน(2-4) หรือ systemic lupus erythematosus (SLE)(4) และผู้ที่ได้รับการรักษาที่มีการกดภูมิคุ้มกันในโรคมะเร็งและภายหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก(1, 2, 4) เนื่องจากกลุ่มอาการของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบ fulminant และ rhinocerebral mucormycosis มีลักษณะเหมือนกัน จึงถูกเรียกรวมกันว่า โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเฉียบพลัน (fulminant)(4)

เมื่อกลุ่มอาการของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามปรากฏขึ้น ควรกระทำการผ่าตัดอย่างเร่งด่วน เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อมาตรวจสอบทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเป็นการขจัดเนื้อเยื่อที่กำลังตายซึ่งเป็นที่เจริญเติบโตของเชื้อราออกไป เมื่อการศึกษาทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ยืนยันว่ามีการลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง ควรเริ่มต้นการรักษาทันทีด้วย amphotericin B ด้วยปริมาณยา 1.0 to 1.5 mg ต่อ kgของน้ำหนักร่างกาย ต่อวัน โดยไม่ต้องรอผลเพาะเชื้อ(4) เนื่องจากใช้เวลานานกว่าจะรู้ผล และควรทานต่อเนื่องอย่างน้อย 14 วัน โดยยา amphotericin B ขนาด 2,500 ถึง 4,000mg อาจมีความจำเป็นในผู้ป่วยที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน ยา Amphotericin B ที่อยู่ในรูปแบบ liposomal มีประสิทธิภาพที่มากกว่าและก่อให้เกิดพิษน้อยกว่าชนิดธรรมดา ยาตัวนี้จัดเป็นตัวเลือกสำหรับรักษาเชื้อราในกลุ่ม zygomycetes และ *Aspergillus*(1) แต่ใช้ไม่ได้ผลในเชื้อ *Pseudallescheria boydii*(3) สำหรับยาต้านเชื้อราในกลุ่ม Azole นั้น มีฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ได้ดีแต่ใช้ไม่ค่อยได้ผลต่อเชื้อ *Mucorales species*(4) การรักษาโดยการผ่าตัดร่วมกับยาต้านเชื้อราได้ผลราว 30-80% ปัจจัยที่ทำให้การรักษาได้ผลไม่ดีคือการกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อสมอง

โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบ Granulomatous

Primary paranasal granulomatous fungal sinusitis เป็นกลุ่มอาการหนึ่งของโรคโพรงจมูกอักเสบแบบเรื้อรัง ซึ่งได้ถูกเรียกอีกอย่างว่า 'indolent fungal sinusitis' รายงานของสภาวะนี้มาจากประเทศชูดาน ประเทศอินเดีย ปากีสถานและสหรัฐอเมริกา ผู้ป่วยในกลุ่มนี้จะมีภูมิคุ้มกันที่เป็นปกติ

และการติดเชื้อเกือบทั้งหมดเป็นเชื้อ *Aspergillus flavus*(4, 8) สามารถตรวจพบการเจริญเติบโตมากมายของเชื้อราและมีการลุกลามในเนื้อเยื่อเป็นบางบริเวณ(4) พบสายเชื้อรารายในโพรงจมูก เยื่อเมือก ชั้นใต้เยื่อเมือก หลอดเลือด และกระดูก(3) พบ granuloma ที่ไม่ใช่ชนิด caseous (noncaseating granulomas)(4, 8) พร้อมกับ giant cells(1, 4, 8), lymphocyte, histiocyte(8) และ plasma cells พบ eosinophils บริเวณศูนย์กลางของ granuloma มีการตายที่มีลักษณะเป็น fibrin, fibrosis และหลอดเลือดอักเสบ (vasculitis)(4, 8) หากไม่มีการผ่าตัดออก ก้อนเชื้อราที่มีลักษณะเป็นสายเส้นใยอาจกระจายเข้าไปในเบ้าตา(4) เยื่อหุ้มเซลล์ประสาท และสมอง(4, 8) การรักษาโดยการให้ itraconazole 8-10 mg ต่อ kg ต่อวัน ช่วยลดอัตราการเป็นซ้ำหลังการผ่าตัดลง

โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเรื้อรัง

โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเรื้อรัง สามารถแยกแยะจากโรคโพรงจมูกอักเสบอีก 2 ชนิด โดยการดำเนินโรคที่เรื้อรัง การรวมกลุ่มแน่นของสายราที่คล้ายกับก้อนเชื้อรา mycetoma จากโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลุกลาม และการปรากฏของอาการ orbital apex syndrome โรคในกลุ่มนี้มักเกิดร่วมกับ diabetes mellitus (DM) การได้รับ corticosteroid(4) และสถานะอื่นของการมีภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่ม granulomatous ที่จะเป็นในคนที่มีภูมิปกติ Orbital apex syndrome แสดงออกโดยมีการมองเห็นที่ลดลง การไม่สามารถเคลื่อนไหวลูกตาซึ่งเกิดมาจากมีก้อนในส่วนบนของเบ้าตา โดยก้อนมาจากการกักเซาะของกระดูกและการแพร่กระจายของเชื้อราจาก ethmoid sinus โรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเรื้อรังอาจได้รับการวินิจฉัยผิดเป็น inflammatory pseudotumor การนำเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตรวจและการตรวจลูกตาพบเชื้อราที่มีการลุกลามเข้าไปในเส้นเลือด ส่วนเซลล์อักเสบมีจำนวนน้อย การกระจายเข้าสู่ cavernous sinuses มักนำไปสู่การเสียชีวิต โรคนี้อาจเริ่มต้นจากก้อนเชื้อรา mycetoma จากโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลุกลามก่อนแล้วจึงกลายมาเป็นชนิดลุกลาม อาจเป็นผลจากภูมิคุ้มกันต่ำจากโรคเบาหวาน หรือการรักษาด้วยยา corticosteroid หากอาการผู้ป่วยมีแนวโน้มรุนแรง ควรได้รับการรักษาแบบเดียวกับโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบเฉียบพลัน (fulminant)

ปัจจัยเสี่ยง

ความเสี่ยงลำดับแรกสำหรับโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบรุนแรงเฉียบพลัน คือ การมีสถานะภูมิคุ้มกันต่ำ(3) โรคนี้จะเกิดในผู้ป่วยที่มีการตอบสนองของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลที่ผิดปกติ เป็นผลสืบเนื่องมาจากโรคต่างๆเช่น โรคเบาหวานประเภทที่ 1ที่มีการควบคุมไม่ดี โรค AIDS ภาวะ hemochromatosis โรค aplastic anemia การกดภูมิคุ้มกันจากการรักษา การปลูกถ่ายอวัยวะ

หรือมะเร็งเม็ดเลือด(2, 3) โรคนี้อาจเกิดขึ้นได้ถึง 2% ของผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายไขกระดูก ช่วงเวลาของการพัฒนาเป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบรุนแรงเฉียบพลัน(3) ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูกอยู่ที่ประมาณ 3 สัปดาห์หลังจากการปลูกถ่าย การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ทั้งหมดที่ต่ำกว่า 500 เซลล์/mL จะมีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับการพัฒนาเป็นโรคการติดเชื้อราชนิดลุกลาม(2, 3)

ความเสี่ยงต่อมา คือ การใช้ยาจำพวก steroids อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งได้แก่ prednisolone(3) นอกจากนี้ การได้รับยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างเป็นเวลาตั้งแต่สองสัปดาห์ขึ้นไป ก็อาจทำให้มีติดเชื้อราตามมาได้(2, 3)

อาการ

อาการตั้งต้นของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบรุนแรงเฉียบพลันมีลักษณะที่ไม่ชัดเจน ส่วนมากผู้ป่วยจะมีไข้โดยไม่ทราบสาเหตุและไม่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง ชนิดฉีดเข้าเส้นเลือดดำ ภายใน 48 ชม. คนไข้บางรายอาจไม่มีไข้ มีเพียงอาการเฉพาะที่ เช่น การเจ็บบริเวณใบหน้า หรือรอบโพรงลูกตา การคั่งบริเวณจมูก และมีน้ำมูกไหล และการปวดศีรษะ พบได้ราว 20% ถึง 60% อาการในระยะท้ายๆ ได้แก่ การมองเห็นไม่ชัด กลอกตาไม่ได้เนื่องจากกล้ามเนื้อตาอ่อนแรง ตาโปน อาการทางสมอง เช่น ไม้รู้สึกตัว หรือ ชัก(2)

การตรวจร่างกาย

การตรวจร่างกายในผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามแบบรุนแรงเฉียบพลัน มักจะมีความไม่ชัดเจนเท่ากับอาการแสดงออกของโรค ลักษณะที่พบจากการตรวจร่างกายที่พบตรงกันมากที่สุด คือการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวของจมูก โดยพบว่าการเปลี่ยนของสี กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อที่เกิดจากการอักเสบ granulation tissue และการเกิดแผล การเปลี่ยนสีของเยื่อบุผิวมีได้หลากหลายและอาจเป็นสีเทา เขียว ขาว หรือดำ การเปลี่ยนสีเป็นสีขาวของเยื่อบุผิวสะท้อนถึงการขาดเลือดของเนื้อเยื่อที่เป็นผลมาจากการลุกลามของเชื้อเข้าไปในหลอดเลือด ขณะที่การเปลี่ยนสีเป็นสีดำ แสดงถึงการตายของเนื้อเยื่อ

จากข้อมูลที่อ้างอิง ความผิดปกติของเยื่อบุผิวถูกพบมากที่สุดบน middle turbinate (67% ของผู้ป่วย) ตามด้วยผนังข้างจมูก (24%) เพดานปาก (19%) และ inferior turbinate (10%). การตรวจสอบจมูกด้วย Anterior rhinoscopy ด้วย nasal speculum หรือ การตรวจหูด้วย otoscope ไม่ค่อยช่วยในการวินิจฉัยโรค ควรตรวจด้วยกล้องนำแสงแบบแท่ง เนื่องจากสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวได้ดีกว่า

ควรทำการตรวจสอบบริเวณศีรษะและลำคอในผู้ป่วยทุกราย นอกเหนือจากการส่องกระจกด้วย กล้องส่อง ระดับของความรู้สึกตัวโดยการรับรู้ต่อบุคคล สถานที่และเวลาจะช่วยในการประเมิน คร่าวๆของระบบประสาทส่วนกลาง การคลำบริเวณใบหน้าช่วยดูการกดเจ็บบริเวณโพรงจมูกรอบๆ จมูก ซึ่งมีประโยชน์ในการบอกตำแหน่งข้างของโรค ควรตรวจเส้นประสาทสมอง โดยเฉพาะ ความรู้สึกบริเวณใบหน้า การทำงานกล้ามเนื้อรอบตา การตอบสนองต่อการรับแสงโดยอัตโนมัติของ ม่านตา และการมองเห็น ควรตรวจตาดูการระคายเคืองหรือการฉีกของเยื่อบุตา การตรวจของช่อง ปากและบริเวณต่อเนื้องของช่องปากและคอหอย ควรดูการปรากฏของความผิดปกติของเพดานปาก หรือสารถหลังบริเวณหลังจมูก(2)

การถ่ายภาพทางรังสี

ภาพถ่ายทางรังสี Computed Tomography (CT) ของโพรงจมูก paranasal sinus เป็นภาพที่ใช้ บ่อยมากที่สุดสำหรับการประเมินผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีโรคเป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะทำการถ่ายภาพรังสี CT อย่างน้อย 1 ภาพที่บริเวณของโพรงจมูก การตัด บางๆให้ความหนาประมาณ 2mm. ในการทำ CT scans ของโพรงจมูกควรกระทำทั้งในแนวระนาบ พับตามแกนหรือ axial plane และในแนวระนาบหน้าหลังหรือ coronal plane เพื่อให้ได้รายละเอียด โครงสร้างที่ขยายใหญ่ การใส่สารทึบรังสีทางหลอดเลือดดำมีประโยชน์ในการวิเคราะห์การอักเสบ รอบโพรงเบ้าตาและที่เยื่อหุ้มเส้นประสาท การตรวจ CT scan ให้ผลไม่จำเพาะในผู้ป่วยโรคโพรงจมูก อักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม อย่างไรก็ตาม การตรวจนี้ก็มีประโยชน์สูงในด้านอื่น ประการแรก คือ สามารถวินิจฉัยโพรงจมูกอักเสบและตำแหน่งที่เป็น ประการที่สอง สามารถแสดงถึงความผิดปกติ ของโครงสร้างกระดูก เช่น low fovea ethmoidalis ซึ่งมีประโยชน์ในการวางแผนผ่าตัด ประการ สดท้ายคือ อาจทำให้ตรวจพบการกัดเซาะของกระดูก การลุกลามเข้าโพรงเบ้าตา หรือการเกิดโพรง หนองนอกขอบเขตของช่องจมูกและโพรงจมูก

เนื่องด้วยความสามารถของการทำ CT scan สามารถบอกขอบเขตของโครงสร้างของกระดูก ได้ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีการศึกษาภาพที่ถูกเลือกใช้ศึกษาผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อรา ชนิดลูกกลม อย่างไรก็ตาม Magnetic resonance imaging (MRI) มีข้อดีเหนือ CT ในการวิเคราะห์ ส่วนประกอบที่อยู่ภายในสมองของโรค MRI มีบทบาทประเมินผู้ป่วยที่แสดงอาการลุกลามเข้าสู่สมอง เช่น การเปลี่ยนแปลงของสภาวะสมองและภาวะการรู้สึกตัว orbital apex syndrome ชัก หรือ เป็น ลม

หลักฐานของการเกิดลักษณะของโพรงจมูกอักเสบบนภาพถ่ายทางรังสี ได้ถูกนำเสนอให้เป็น เกณฑ์ตัดสินสำหรับการวินิจฉัยของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม อย่างไรก็ตามในผู้ป่วย บางรายที่เป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม อาจมีผล CT เป็นปกติได้ โดยพบกรณีนี้ถึง

12 % ในเอกสารอ้างอิง ดังนั้น การประเมินจุกด้วยวิธีการทางการส่องกล้อง และตัดนำชิ้นเนื้อมาตรวจจึงจำเป็นในการวินิจฉัยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม นอกเหนือจาก CT และ MRI(2)

การวินิจฉัย

การวินิจฉัยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมมีเกณฑ์การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาต่อไปนี้เป็น 1) สายรากอวัยวะในชั้นใต้ต่อเยื่อบุผิว โดยอาจมีหรือไม่มีของการลูกกลมเข้าหลอดเลือด และ 2) มีการตายของเนื้อเยื่อโดยที่มีการรวมกลุ่มของเซลล์อักเสบเพียงเล็กน้อย การย้อมด้วยวิธี Gomori-methenamine silver stain จะทำให้เห็นรูปร่างเชื้อราชัดเจนขึ้นซึ่งอาจช่วยในบอกชนิดของเชื้อราได้อย่างคร่าวๆ(2)

การรักษา

หลักสำคัญของการรักษาโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบรุนแรงเฉียบพลันประกอบไปด้วยการรักษาร่วมกัน 2 อย่างคือ การให้ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราและการรักษาด้วยการผ่าตัดนำเนื้อตายออกมา กลุ่มผู้ป่วยหลายรายแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของการผ่าตัดในการรักษาโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในหนึ่งกลุ่มซึ่งประกอบไปด้วยผู้ป่วย 17 ราย ผู้ป่วยทั้ง 7 รายที่ไม่ได้รับการผ่าตัดเสียชีวิตด้วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม

การรักษาด้วยการผ่าตัดในโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมมีความก้าวหน้าขึ้นในช่วงหลายปี การผ่าตัดโดยวิธีการ radical maxillectomy, craniofacial resection และ orbital exenteration ได้ช่วยให้สามารถกำจัดเชื้อได้มากกว่าจากวิธีการผ่าตัดด้วยการส่องกล้องทางจุกซึ่งมีความจำกัดมากกว่า การทำการผ่าตัดบริเวณที่อยู่นอกช่องจมูกและโพรงจมูกนั้น มักจะไม่สามารถผ่าตัดเนื้อตายออกได้หมดจึงไม่ค่อยช่วยทำให้ผลลัพธ์ของผู้ป่วยดีขึ้นมากนัก

การผ่าตัดไม่ได้ช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตยืนยาวขึ้นในกรณีของผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ต่ำ อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ต่ำที่ได้รับ GCSF (granulocyte colony stimulating factor) มีแนวโน้มจะสามารถรอดชีวิตจากโรคนี้นี้ได้มากกว่า แต่ยังคงมีความเสี่ยงต่อการตายจากโรคได้อยู่ดี

การผ่าตัดนำเนื้อตายออกมามีประโยชน์หลายประการได้แก่ 1. ทำให้การดำเนินโรคช้าลง ทำให้มีเวลาสำหรับการฟื้นตัวของไขกระดูก 2. ลดจำนวนเชื้อรา ลดภาระในการทำงานของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ 3. ได้ชิ้นเนื้อในการเพาะเชื้อ ส่วนของชิ้นเนื้อทั้งหมดที่ได้มาจากการผ่าตัดควรนำมาเพาะเชื้อเพื่อให้ข้อมูลทางความชุกของการเกิดโรคและการระบาดของเชื้อรา นอกจากนี้ยังบ่งบอกชนิดของเชื้อราซึ่งเป็นข้อมูลในการรักษาผู้ป่วยที่สำคัญ เนื่องจากเชื้อราบางชนิด เช่น

Pseudallescheria boydii ไม่ตอบสนองต่อ amphotericin การรีบเร่งในการทำการผ่าตัดและนำเนื้อเยื่อที่มีเชื้อราและเนื้อตายออกมาโดยการส่องกล้อง ควรทำในผู้ป่วยทุกรายที่มีผลชิ้นเนื้อที่ได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นโรคหรือในผู้ป่วยใดก็ตามที่สงสัยว่ามีโรคติดเชื้อราชนิดลูกกลม การผ่าตัดควรเน้นที่จะทำในโพรงจมูก หรือโครงสร้างที่เกี่ยวข้อง (เช่น turbinate, septum) ไปถึงขอบที่มีเลือดออก การมีเลือดออกแม้จะเกิดได้ในผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำ แต่จะไม่มีผลแทรกซ้อนถ้าได้รับการถ่ายเกล็ดเลือดให้มีมากกว่า $60 \times 10^9/L$ ชิ้นเนื้อควรถูกส่งเพื่อเพาะเชื้อและส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ผู้ป่วยควรถูกนัดครั้งที่สองภายใน 48 ถึง 72 ชั่วโมงถ้ายังคงมีโรคหลงเหลือภายในช่องจมูกหรือโพรงจมูกเพื่อดำเนินการผ่าตัดต่อ ผู้ป่วยที่มีกลุ่มอาการ orbital apex หรือกระจายเข้าไปในสมองมีแนวโน้มที่จะไม่ค่อยตอบสนองต่อการผ่าตัดชนิดเอาเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อออกมากที่สุด ข้อที่ไม่ควรมองข้ามคือการติดตามผู้ป่วย ผู้ป่วยควรทำการส่องกล้องทางจมูกด้วยกล้องนำแสงแบบแทงทุกสัปดาห์จนกว่าจะแก้ไขสภาวะเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ต่ำ และหลังจากนั้นเดือนละครั้งเป็นเวลา 6 เดือน

Amphotericin B ขนาดสูง (มากกว่า 1.25 mg ต่อ kg ต่อวัน) เป็นส่วนประกอบสำคัญในการรักษาโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม ขนาดยาในการรักษาทั้งหมดด้วยยา amphotericin B ได้แก่ 2g หรือมากกว่า ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำส่วนใหญ่ที่มีไข้จากเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ต่ำ มักได้รับ amphotericin ครบคลุมไว้เรียบร้อยแล้วเมื่อถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม รายงานหนึ่งได้บอกถึงว่ามีการตอบสนองในระยะต้น 85% ต่อ amphotericin B อย่างไรก็ตาม 61% ของผู้ตอบสนองเสียชีวิตจากการติดเชื้อราด้วยโรค aspergillosis ดังนั้นการให้ยา amphotericin B อย่างเดียวถือว่าไม่เพียงพอในการรักษาโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม

การใช้ amphotericin B มีข้อจำกัดเนื่องจากเป็นพิษของไต ผู้ป่วยที่ทนผลข้างเคียงของ amphotericin B มาตรฐานอาจได้รับการรักษาแทนด้วยยา liposomal amphotericin B สารประกอบไขมันนี้ส่งผลในความเข้มข้นของยาเพิ่มสูงขึ้นในปอด ตับ และม้าม ส่งผลให้ความเข้มข้นต่ำลงที่ไตและในเลือด Liposomal amphotericin (5mg ต่อkg ต่อวัน) มีประสิทธิภาพเหนือกว่ายา amphotericin B มาตรฐาน (1mg ต่อkg ต่อวัน) ในการรักษาการติดเชื้อราในปอดและในโพรงจมูก ผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมที่ไม่ตอบสนองต่อ amphotericin B สามารถรักษาให้หายด้วย lipid complex ขนาด 10g ตามด้วย itraconazole ข้อเสียของ liposomal amphotericin คือมีราคาแพง โดย amphotericin B ที่ขนาดมาตรฐาน (1.25mg ต่อkg ต่อวัน) ราคา 6 เหรียญสหรัฐต่อวัน ขณะที่ liposomal amphotericin ขนาดมาตรฐาน (4mg ต่อkg ต่อวัน) มีราคา 220 เหรียญสหรัฐต่อวัน โดยทั่วไป liposomal amphotericin มีไว้สำหรับการรักษาผู้ติดเชื้อราที่มีภูมิต้านทานต่ำที่มีค่า creatinine ในเลือดขึ้นสูง (มากกว่า 2.5mg/dL) หรือการดำเนินโรคเชื้อราขณะที่ได้รับขนาดยาสูงสุดของ amphotericin มาตรฐาน (1.25mg ต่อkg ต่อวัน)(2)

การป้องกัน

มีการใช้ high efficiency particulate air (HEPA) filters ใช้เพื่อหวังป้องกันโรคติดเชื้อราชนิดลูกกลม แต่ยังคงได้ผลจำกัด มีการพยายามใช้ amphotericin nasal spray ในหน่วยปลูกถ่ายไขกระดูกแห่งหนึ่งซึ่งลดอัตราการเกิดโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมลงเป็น 1.8% จาก 13.8%(2)

ความสำคัญของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการหาชนิดของเชื้อราที่นำมาศึกษา

เทคนิคที่ใช้ค้นหาชนิดของเชื้อราที่ก่อโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในผู้ป่วยที่นำมาศึกษา มีความสำคัญต่องานวิจัยครั้งนี้ โดยเทคนิคที่ถูกต้องแม่นยำ และให้ผลในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากจะได้ผลการศึกษาที่ถูกต้องรวดเร็วแล้ว ในการประยุกต์ใช้ในการรักษาก็สามารถทำให้ได้รับการรักษาอย่างทันที่ และเหมาะสม(11)

ถึงแม้ว่าการติดเชื้อราชนิดลูกกลมพบได้น้อย แต่โรคนี้ก็เป็นโรคแทรกซ้อนที่อันตรายถึงชีวิตที่พบได้บ่อยและพบมากขึ้นในผู้ป่วยที่อยู่ในขั้นวิกฤตที่มีอยู่หลายสภาวะ การติดเชื้อยีสต์ในส่วนของสายพันธุ์ *non-albicans Candida species* และเชื้อในกลุ่ม molds โดยเฉพาะสายพันธุ์ต่างๆของ *Aspergillus, Fusarium, and Mucorales* พบได้มากขึ้น(11) แต่เนื่องจากวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมไม่สามารถตรวจพบเชื้อราหลายสายพันธุ์ของทั้งสองกลุ่มนี้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเทคนิคใหม่ๆในการตรวจทางโมเลกุลเพื่อแยกแยะเชื้อเหล่านี้ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ(12)

การวินิจฉัยการติดเชื้อราอาจกระทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเชื้อ, การตรวจชิ้นเนื้อ, การตรวจทางรังสีวิทยา (CT, MRI) อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ ต่างมีข้อจำกัด ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของความไวต่ำหรือขาดความจำเพาะ การตรวจบางชนิดใช้เวลานาน เช่น การเพาะเชื้อซึ่งอาจทำให้การรักษาล่าช้า

เทคนิคอื่น ๆ ที่มีการใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อรา ได้แก่ การตรวจสอบ fungal antigen โดยเลือกส่วนประกอบของผนังเซลล์, galactomannan และ (1,3)- β -D-glucan เป็นตัวบ่งชี้ของตัวเชื้อรา อย่างไรก็ตามข้อมูลในเรื่องประสิทธิภาพของการตรวจด้วยวิธีนี้ยังไม่ชัดเจน(11) สำหรับ Glucan นั้น อาจตรวจพบในเลือดของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อราชนิดต่างๆหลายชนิด ได้แก่ *Candida, Aspergillus, Fusarium, Saccharomyces, Trichosporun* และ *Acremonium species* ซึ่งจัดว่าไม่จำเพาะ ส่วน galactomannan นั้น มีความจำเพาะต่อ Aspergillosis และสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคดังกล่าวตั้งแต่ระยะแรกๆของการติดเชื้อ นอกจากนี้ใช้สำหรับวินิจฉัยแล้ว galactomannan ยังอาจใช้ในการเฝ้าติดตามผลการรักษาได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม อาจพบผลบวกหลงตามหลังการรักษาด้วยเคมีบำบัด ซึ่งกลไกการเกิดผลดังกล่าวยังไม่ทราบแน่ชัด การตรวจวินิจฉัยเชื้อราด้วยวิธีนี้มีข้อด้อยตรงที่ราคาค่อนข้างสูง(13)

ในปัจจุบัน มีการนำ PCR-based assay มาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อรา ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวและความจำเพาะสูง(14) ใช้เวลาไม่นาน และยังสามารถนำเนื้อเยื่อที่เก็บใน paraffin มาศึกษาต่อได้ ข้อมูลเบื้องต้น ชี้ให้เห็นว่า การตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อราด้วย PCR สามารถลดจำนวนการตายของผู้ป่วย และลดการรักษาด้วยยาต้านเชื้อราที่ไม่จำเป็นได้ ซึ่งนอกจากเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายแล้วยังลดผลข้างเคียงจากยาได้อีกด้วย(14) นอกจากนี้ ข้อดีอีกอย่างของเทคนิค PCR ก็คือ สามารถบ่งบอกถึงตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่ต่อการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา(14) และหากนำ PCR product มาทำ pyrosequencing ด้วยแล้ว จะยิ่งทำให้การแยกแยะตัวเชื้อราที่มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น(15)

ด้วยข้อดีหลายประการดังที่กล่าวมานี้ การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคนี้จึงน่าจะมีบทบาทต่อการรักษาค้นไขมากขึ้นในอนาคต โดยเฉพาะหากนำมาใช้ร่วมกันกับการตรวจด้วยวิธีอื่น เช่น การเพาะเชื้อ และการตรวจด้วยวิธี histopathology(16) โดยข้อดีของ PCR ที่เหนือกว่าการเพาะเชื้อคือสามารถศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่อยู่ในรูปแบบของ formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) ได้

อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธี PCR ก็มีข้อจำกัดอยู่บ้าง คือ ด้วยผนังของเชื้อที่หนา อาจทำให้ถูกสลายตัวได้ยาก ทำให้ได้จำนวน DNA ซึ่งอยู่ภายใน cells ไม่เพียงพอที่จะนำมาศึกษา และเกิดผลลบลงได้ ในทางกลับกัน เชื้อตัวอื่นที่อยู่ในธรรมชาติอาจปนเปื้อนเข้ามาในกระบวนการทำ PCR และเกิดผลลบลงได้เช่นเดียวกัน

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทำงานวิจัย

1. เครื่องชั่งดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
2. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
3. เครื่องอเล็กโตรโพรซิสนิตโพลีอะคริลาไมด์เจล (Bio-Rad, USA)
4. เครื่องอเล็กโตรโพรซิสนิตอะกาโรสเจล (Atto, China)
5. เครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล (Syngene, UK)
6. เครื่องหมุนเขย่าสาร (Biosan, Latvia)
7. เครื่องเขย่าสาร (Scientific Industries, USA)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดขนาด 1.5ml (Boeco, Germany)
9. ไมโครปิเปตต์ขนาด P2, P20, P100 และ P1,000 (Rainin, USA)
10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Bio-Rad, USA)
11. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific, USA)
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto, Denmark)
13. ตู้อบ (Mettler, Germany)
14. ตู้ดูดควัน (S.K. Powerable, Thailand)
15. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20°C (Revco, Japan)
16. ตู้เย็น (Mitsubishi, Japan)
17. Storm 840 and ImageQuant Software (Amersham biosciences, UK)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ซ้อนดักสาร
2. กระดาษซั่งสาร
3. คีมปากคีบสำหรับคีบวัสดุ
4. ถังมือ (Sri Trang, Thailand)
5. ถาดเตรียมเจลพร้อมหัวชนิดโพลีอะคริลาไมด์เจล (Bio-Rad, China)

6. ถาดเตรียมเจลพร้อมหรือชนิดอะกาโรสเจล (Atto, China)
7. ทิปขนาด 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Axygen, USA)
8. แท่นวางหลอด (Autopack, USA)
9. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
10. หลอดขนาด 0.2ml, 0.5ml และ 1.5ml (Bio-Rad Elkay, USA)
11. ปีกเกอร์ขนาด 50ml, 100ml และ 250ml (Duran, Germany)
12. ซีโรโลจิคัล ปีเปตต์ ขนาด 5ml, 10ml และ 25ml (Costar Stripette, USA)
13. ปีเปตต์บอย (Integra Biosciences, Switzerland)
14. ไบมีดสำหรับผ่าตัด



วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

หน่วยงานที่เป็นแหล่งตัวอย่าง

มีหน่วยงาน 3 หน่วยงานที่เป็นแหล่งที่ใช้บล็อกชิ้นเนื้อตัวอย่างมาทำงานวิจัยได้แก่ บล็อกชิ้นเนื้อจาก

1. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วงปี 2547 -2556
2. โรงพยาบาลราชวิถีปี 2555-2556 และ
3. บริษัท ไฮเทค แล็บ จำกัดปี 2554-2556 ซึ่งบริษัท ไฮเทค แล็บ จำกัด เป็นหน่วยงานการตรวจทางพยาธิวิทยาเอกชนที่อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำงานอยู่ด้วย และมีการเก็บเนื้อเยื่อในบล็อกชิ้นเนื้อ ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการขออนุญาตใช้บล็อกชิ้นเนื้อมาใช้ในการวิจัย เพื่อเพิ่มจำนวนตัวอย่าง

โดยผ่านการพิจารณาจริยธรรมจาก คณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ เลขที่ 426/57

ตัวอย่างที่ใช้

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ บล็อกชิ้นเนื้อที่ได้ผ่านกระบวนการชนิด formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) ของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์ว่าเป็นโรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดตุ๊กลามของตัวอย่างผู้ป่วยที่เก็บไว้หลังการตรวจตามปกติที่หน่วยงานทั้ง 3 แหล่ง โดยบล็อกชิ้นเนื้อจะนำมาทำสไลด์เพื่อใช้ในการดูรูปร่างของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์และให้การวินิจฉัยชนิดของเชื้อร่าก่อโรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดตุ๊กลาม และนำมาหาความสัมพันธ์กับผลการทดลองด้วยวิธี PCR-sequencing และหลังจากเสร็จสิ้นการดำเนินงานวิจัย ผู้ศึกษาจะส่งคืนบล็อกชิ้นเนื้อตัวอย่างให้กับภาควิชาพยาธิวิทยา เพื่อเก็บไว้อ้างอิงต่อไป

ขนาดตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็น บล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่พยาธิแพทย์ได้วินิจฉัยว่าเป็นโรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดตุ๊กลาม 3 กลุ่ม ได้แก่ 1. โรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดตุ๊กลามแบบเฉียบพลัน 2. โรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดตุ๊กลามแบบ granulomatous และ 3. โรคโพรงงมุกอักเสบจากเชื้อราชนิดตุ๊กลามแบบเรื้อรัง ทั้งนี้

ขนาดตัวอย่างที่เลือกมามีขนาดค่อนข้างเล็ก เนื่องจากมีอุบัติการณ์เกิดโรคนี้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดไม่ลุกลาม แม้ขนาดตัวอย่างจะมีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ผู้ศึกษาได้ให้ความสนใจ เนื่องจากผลการศึกษานี้จะมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของชีวิตของผู้ป่วยเมื่อได้รับการรักษาที่เหมาะสมและทันที่ ผู้ศึกษาได้พยายามรวบรวมตัวอย่างให้ได้จำนวนมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ และสามารถรวบรวมบล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมาได้ทั้งหมดจำนวน 81 ราย จากสถานพยาบาล 3 แห่ง คือ บล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทยปี 2547 -2556 จำนวน 56 ราย , จากบริษัท ไฮเทค แล็บ จำกัดปี 2554-2556 จำนวน 13 ราย และจากโรงพยาบาลราชวิถีปี 2555-2556 จำนวน 12 ราย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากบล็อกชิ้นเนื้อ โดยนำบล็อกชิ้นเนื้อตัวอย่างมาสไลซ์ด้วยเครื่อง microtome ให้หนาประมาณ 10 μm จะได้แผ่น paraffin 2-3 แผ่น ที่มีชิ้นเนื้อตัวอย่างอยู่ใน ใก้บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเตรียมทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ จะมีการละลาย paraffin ด้วย xylene แล้วล้าง xylene ด้วย ethanol หลังจากนั้นนำมาทำการย่อยเนื้อด้วย lysis buffer II, proteinase K และ SDS แล้วจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction ต่อไป โดยบล็อกชิ้นเนื้อจะต้องนำมาทำการสไลด์ด้วยเครื่อง microtome ให้หนาประมาณ 3-5 μm อีกครั้งเพื่อนำมาย้อมสไลด์ดูผลทาง histopathology เปรียบเทียบกับผลการทดลองด้วยวิธี PCR-sequencing

การขออนุญาตใช้บล็อกชิ้นเนื้อตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้เป็นบล็อกชิ้นเนื้อโดยได้ทำการออกหนังสือขออนุญาตใช้บล็อกชิ้นเนื้อถึงผู้อำนวยการโรงพยาบาลและหัวหน้าของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง 3 แห่ง ได้แก่

1. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. โรงพยาบาลราชวิถี
3. บริษัท ไฮเทคแล็บ จำกัด

2. ที่มาของ positive control (เชื้อรา 2 ชนิด)

เชื้อราที่นำมาใช้เป็น positive control นั้นได้มีการทดสอบความจำเพาะด้วยวิธีพีซีอาร์ซีเควนซึ่งแล้วว่ามีลำดับเบสตรงกับลำดับเบสที่ได้จาก NCBI โดยที่ลำดับเบสดังกล่าวเป็นส่วนของสายดีเอ็นเอที่ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาเพิ่มจำนวนได้เป็นลำดับเบสที่จำเพาะของเชื้อชนิดนั้นๆ ซึ่งได้แก่เชื้อราต่อไปนี้

1. *Aspergillus fumigatus*
2. *Fusarium solani*

ตารางที่ 1 รายชื่อเชื้อราและรหัสชื่อเชื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) หรือ Thailand Institute of Scientific Technological Research (TISTR)

ชื่อเชื้อรา	รหัสเชื้อรา
<i>Aspergillus fumigatus</i>	TISTR 3464
<i>Fusarium solani</i>	TISTR 3436

การเก็บ Positive control

เชื้อราที่นำมาใช้เป็น positive control นี้ เป็นเชื้อตายแล้วและนำมาย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย lysis buffer II, proteinase K และ SDS และจะทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มต่อไป

3. การดูลักษณะทางคลินิกเทียบกับชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบโดยวิธี PCR

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในด้านข้อมูล ดังต่อไปนี้

1. เพศ
2. อายุ
3. Underlying diseases
4. Symptom

5. Definite diagnosis
6. Treatment
7. Duration of Symptom
8. Clinical Outcome
9. Location of infection
10. Extra sinus involvement

4. การสกัดดีเอ็นเอ

เชื้อรา positive control และตัวอย่างทั้ง 81 ราย นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี

Phenol-Chloroform extraction

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชนิด formalin-fixed paraffin-embedded

1. ใส่ xylene ลงในหลอด 500-1000 μ ตามขนาดตัวอย่าง , vortex, ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วดูดส่วนบนทิ้ง
2. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1. อีกครั้ง เพื่อละลาย paraffin
3. ใส่ 100% ethanol 500 μ l, vortex, centrifuge 1,000 rpm นาน 3 นาที แล้วดูดส่วนบนทิ้ง
4. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3. อีกครั้ง เพื่อล้าง xylene ออก

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอสำหรับตัวอย่าง(ต่อจากขั้นตอนที่ 4.) และสำหรับ positive control

5. ใส่ Lysis buffer II 500 μ l, proteinase K 20 μ l, และ SDS 50 μ l
6. ตั้งไว้ที่ 50⁰ C นานข้ามคืนหรือรอจนชั้นเนื้อตัวอย่างถูกย่อยจนหมด
7. ใส่ Phenol-chloroform 500 μ l
8. centrifuge 14,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่
9. ใส่ 10M NH₄COOH₃ 250 μ l และ 100% ethanol 500 μ l
10. เก็บไว้ที่ -20⁰ C นานข้ามคืน
11. centrifuge 12,000 rpm นาน 15 นาที เเทน้ำทิ้ง ใส่ 70% ethanol 500 μ l
12. centrifuge 14,000 rpm นาน 5 นาที เท ethanol ทิ้ง ตั้งไว้ให้แห้งในตู้อบ

13. เติมน้ำกลั่น 50 μ l ที่ 50⁰C นานข้ามคืน
14. นำมาทำการวัด OD เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ
15. เก็บไว้ที่ -20⁰C เพื่อรอนำมาใช้ในกระบวนการทำ PCR ต่อไป

5. การออกแบบไพรเมอร์

เชื้อราที่นำมาออกแบบไพรเมอร์มี 10 ชนิด ดังนี้

1. *Aspergillus clavatus* (AB 244778.1)
2. *Neosartorya fischeri* (AB 185254.1)
3. *Aspergillus flavus* (AB 008415.1)
4. *Aspergillus fumigatus* (AB 055971.1)
5. *Mucor indicus* (AB 113027.1)
6. *Rhizopus oryzae* (AB 181327.1)
7. *Fusarium solani* (AM 412639.1)
8. *Fusarium chlamydosporum* (HG 798770.1)
9. *Candida albicans* (HE 860439.1)
10. *Pseudallescheria boydii* (AJ 888438.1)

การศึกษานี้ได้ใช้ไพรเมอร์เริ่มต้นตั้งแต่ไพรเมอร์ ZP3 เพื่อดูคุณภาพดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ panfungal ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 18S ribosomal RNA gene เพื่อดูการติดเชื้อรา และท้ายที่สุดคือการทดสอบด้วยไพรเมอร์ differentiated ซึ่งเป็นไพรเมอร์ของ variable site ที่ตำแหน่ง 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2 จนถึง 28S ribosomal RNA gene เพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค โดยการออกแบบไพรเมอร์ differentiated สำหรับเชื้อราทั้ง 10 ชนิดทำโดยค้นหานิวคลีโอไทด์ของเชื้อราแต่ละชนิดจากเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov จากนั้นนำนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้ง 10 ชนิดมา alignment โดยใช้โปรแกรม bioedit (BioEdit Version 7.1) เพื่อดูว่ามีส่วนใดของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันและเหมือนกัน ต่อมาเลือกส่วนของนิวคลีโอไทด์ให้ยาวประมาณ

200 ถึง 300 bp โดยให้มีส่วนที่เหมือนกันประมาณ 20 bp ที่บริเวณหัวและท้าย และเลื่อนให้ลำดับเบส 20 bp ทั้ง 2 ตำแหน่งมี melting temperature ใกล้เคียงกันมากที่สุดโดยใช้โปรแกรม OligoCalc (จากเว็บไซต์ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) และบริเวณตรงกลางของนิวคลีโอไทด์ซึ่งยาว 200 ถึง 300 bp นั้นจะให้ลำดับเบสแตกต่างกันเป็นการแสดงถึงความจำเพาะของเชื้อแต่ละชนิด จะได้ลำดับเบส 20 bp ที่บริเวณหัวเป็น primer forward และลำดับเบส 20 bp ที่บริเวณท้ายเป็น primer reverse

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสและ melting temperature ของ forward primer และ reverse primer

	Sequence	Tm
Forward Primer	GTGAATCATCGARTCTTTGAACGCA	54.4-56
Reverse Primer	AGTTCAGCGGGTADYCCYACCTGA	57.4-62.5

6. การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอ

ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ซึ่งดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอออกมาในหน่วยนาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร

7. ทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

ใช้เทคนิคพีซีอาร์ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ทำการสกัดมาได้ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ZP3 ซึ่งเป็น internal control แล้วจึงคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้มาทำการวิจัยต่อ

8. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

Master Mix ที่เป็นส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR (ต่อ 1 ตัวอย่าง) สำหรับการทดสอบไพรเมอร์ ZP3

dNTP	0.2	μl
10x buffer	1	μl
Mgcl ₂	0.4	μl
Primer forward	0.15	μl
Primer reverse	0.15	μl
Tag polymerase	0.1	μl
Distilled water	6	μl
DNA	2	μl

ตารางที่ 3 ลำดับดีเอ็นเอและการตั้งค่าสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR ในการทดสอบยีน internal control ZP3

Primer	sequence	T _m	cycle	Product size
ZP3Forward primer	5' AGCCATCCTGAGACGTCCGTACA 3'	58.8 ^o C	40	190
ZP3 Reverse primer	5' CCTGACCACATCTTCTGTGCCAT 3'	57.4 ^o C		

PCR stage	Temperature	Reaction time	Cycle
Stage 1 Initial Denaturation	95 ^o C	5 นาที	1
Stage 2 Denaturation	95 ^o C	1 นาที	40
Annealing	55 ^o C	1 นาที	
Extension	72 ^o C	2 นาที	
Stage 3 Final Extension	72 ^o C	7 นาที	1
Stage 4 Hold	15 ^o C	∞	1

Master Mix ที่เป็นส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR (ต่อ1 ตัวอย่าง) สำหรับการทดสอบไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 18s rRNA ที่มีชื่อว่าไพรเมอร์ panfungal

dNTP	0.2	μl
10x buffer	1	μl
Mgcl ₂	0.4	μl
Primer forward	0.15	μl
Primer reverse	0.15	μl
Tag polymerase	0.1	μl
Distilled water	6	μl
DNA	2	μl

ตารางที่ 4 ลำดับดีเอ็นเอและการตั้งค่าสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR ในการทดสอบหาเชื้อรา Pan fungal ในตัวอย่าง

Primer	sequence	T _m	cycle	Product size
Pan fungal Forward	5' CCCGGGACGTTTTCATTGAT 3'	51.8 ⁰ C	45	100
Pan fungal Reverse	5' TATGCCGACTAGAGATTGGG 3'	51.8 ⁰ C		

PCR stage	Temperature	Reaction time	Cycle
Stage 1 Initial Denaturation	95 ⁰ C	15 นาที	1
Stage 2 Denaturation	95 ⁰ C	45 วินาที	45
Annealing	63 ⁰ C	45 วินาที	
Extension	72 ⁰ C	45 วินาที	
Stage 3 Final Extension	72 ⁰ C	7 นาที	1
Stage 4 Hold	15 ⁰ C	∞	1

การเตรียมส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR (ต่อการทำ sequencing ของ 1 positive control และ 1 ตัวอย่าง)

ทำโดยการทำให้มีปริมาตรรวม 100 ul โดยใช้หลอดละ 20 ul 5 หลอด

dNTP	0.4 μl	(ต่อ 1 หลอด) x 5 หลอด = 2 μl
10x buffer	2 μl	10 μl
Primer forward	0.3 μl	1.5 μl
Primer reverse	0.3 μl	1.5 μl
Tag polymerase	0.2 μl	1 μl
Distilled water	12.8 μl	64 μl
DNA	4 μl	20 μl
ปริมาตรรวม	20 μl	<u>100 μl</u>

ตารางที่ 5 ชนิดของเชื้อราและขนาดของพีซีอาร์โปรดักส์

Fungus	PCR product
<i>Aspergillus clavatus</i>	276
<i>Neosartorya fischeri</i>	272
<i>Aspergillus flavus</i>	276
<i>Mucor indicus</i>	289
<i>Rhizopus oryzae</i>	302
<i>Fusarium solani</i>	290
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	288
<i>Candida albicans</i>	289

ตารางที่ 6 ลำดับดีเอ็นเอและการตั้งค่าสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ในการหาเชื้อรา positive control และเชื้อราสาเหตุของโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในตัวอย่างผู้ป่วย

Primer	sequence	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	cycle	Product size
Sinusitis Forward	5' GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA 3'	54 - 65	40	200 - 300
Sinusitis Reverse	5' AGTTCAGCGGGTADYCCYACCTGA 3'			

PCR stage	Temperature	Reaction time	Cycle
Stage 1 Initial Denaturation	95 $^{\circ}\text{C}$	15 นาที	1
Stage 2 Denaturation	95 $^{\circ}\text{C}$	45 วินาที	40
Annealing	65 $^{\circ}\text{C}$	45 วินาที	
Extension	72 $^{\circ}\text{C}$	45 วินาที	
Stage 3 Final Extension	72 $^{\circ}\text{C}$	7 นาที	1
Stage 4 Hold	15 $^{\circ}\text{C}$	∞	1

9. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยกระบวนการโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis)

การเตรียม 8% polyacrylamide gel

40% Acrylamide	2 ml
10x TBE	1 ml
Distilled water	7 ml
TEMED	10 μl
APS	100 μl

หล่อเจลทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำมาวิ่งด้วยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก ระวังอย่าให้แถบสี (dye) ตกจากแผ่นเจล ตั้งค่าไว้ที่ 130 Volts 50 นาที

10. การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยกระบวนการอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

ทำการเตรียม agarose gel โดยใช้ผง Agarose 2 g ละลายในสารละลาย 1x TBE Buffer 100 ml จะเตรียมได้สารละลาย 2% agarose gel นำไปให้ความร้อนในไมโครเวฟจนเดือดและผงละลายจนหมด จากนั้นนำมาเทในแป้นหล่อ agarose gel อย่าให้มีฟองอากาศทิ้งไว้ 20-30 นาที จากนั้นทำการวิ่งด้วยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้เวลาประมาณ 40 นาที สังเกตอย่าให้แถบสี (dye) ตกจากแผ่นเจล ส่วนการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อเตรียมการส่ง sequencing จะใช้ 1% agarose gel สามารถเตรียมได้โดยใช้ผง Agarose 1g ละลายในสารละลาย 1x TBE Buffer 100ml เพื่อให้มีปริมาณเนื้อเจลที่น้อยทำให้สะดวกต่อการแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจาก agarose gel โดยการทำการสกัดเจลในขั้นตอนต่อไป

11. การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดย SYBR Green Dye และการตัดเจล

SYBR Green Dye เป็นสารเรืองแสงชนิดหนึ่ง สามารถเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง Ultraviolet จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของ fluorescent เห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอได้ หลังจากการส่องด้วยแสง Ultraviolet จะทำการตัดเจลเฉพาะในบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการปรากฏให้เห็นมาเก็บไว้ในหลอดเพื่อรอการทำการสกัดเจลเพื่อเตรียมทำ sequencing ต่อไป

12. ขั้นตอนวิธีการสกัดเจล (Gel Extraction)

เนื่องจากค่าดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่มีปริมาณที่น้อยจึงใช้ชุด Mini Elute Gel Extraction Kit และเมื่อพบว่าหากมีปริมาณดีเอ็นเอมาก อาจเติม Elution Buffer ลงไปเพิ่มได้ในตอนหลัง

1. ใส่ QG buffer 3 เท่าของ volume (โดยประมาณ 900 ul)
2. Incubate 50°C 10 นาที , mix ทุก 2-3 นาที
3. ใส่ cold 100% isopropanol 300 ul , mix
4. ดูดใส่ filter tube ที่ประกอบด้วย collection tube เรียบร้อยแล้วทีละ 750 ul

5. นำไป centrifuge 13,000 rpm 1 นาที ,เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube
ทิ้งไป
 6. ทำจนสารละลายที่ผสมไว้ถูกปั่นกรองจนครบ
 7. ใส่ QG buffer 500 ul
 8. Centrifuge 13,000 rpm 1 นาที, เทสารที่อยู่ใน collection tube ทิ้งไป
 9. Wash ด้วย PE buffer 750 ul
 10. Centrifuge 13,000 rpm 1 นาที, เทสารที่อยู่ใน collection tube ทิ้งไป
 11. ทำให้ filter แห้งโดย Centrifuge 13,000 rpm 1 นาที อีกรอบ
 12. นำ filter tube ไปประกอบกับ microtube ขนาด 1.5 ml
 13. ใส่ elution buffer 10 ul , incubate 1 นาที
 14. Centrifuge 13,000 rpm 1 นาที
- หากพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอมีมากเกินไป อาจเติม elution buffer ได้อีก ดังนี้
15. ใส่ elution buffer อีก 10 ul , incubate 1 นาที
 16. Centrifuge 13,000 rpm 1 นาที
 17. นำสารละลายที่กรองลงมาใน microtube ไปวัด OD
 18. เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่ -20 °C
- 13. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์**

นำดีเอ็นเอของเชื้อมาเจือจางได้ดีเอ็นเอปริมาณต่างๆ ดังนี้ 50, 25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 นาโนกรัม นำปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาทำพีซีอาร์ เพื่อทดสอบว่าที่ปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อน้อยที่สุด ที่ไพรเมอร์ในสภาวะเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ยังสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อได้ คือที่ดีเอ็นเอปริมาณเท่าใด

14. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดใดทำได้โดยใช้ Primer forward และดีเอ็นเอของ positive control ทั้ง 2 ชนิดมาทำ sequencing ลำดับเบสที่จำเพาะภายใน sequenceจะเป็นลำดับเบสที่จำเพาะของเชื้อชนิดนั้นๆ โดยเทียบกับ NCBI แล้วว่ามีลำดับเบสตรงกัน

15. การตรวจหาลำดับเบสที่จำเพาะของดีเอ็นเอของเชื้อราหรือ sequencing

สายนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 200-300 bp จะมีส่วนต้นที่ยาวประมาณ 20 bp เป็น primer forward เมื่อนำดีเอ็นเอใน PCR product ที่ทำการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Agarose gel electrophoresis และทำการ purified โดยการสกัดออกจากเจลแล้วกับ primer forward ไปทำ sequencing จะได้ลำดับ sequence ที่มีความจำเพาะกับเชื้อแต่ละชนิด

16. การวิเคราะห์เพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อราก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในตัวอย่าง

ทำโดยการนำลำดับเบสของ sequence ที่จำเพาะที่ได้จากการทำ sequencing มาหาความจำเพาะกับชนิดของเชื้อ โดยนำมา blast ในเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> จะได้ชนิดของเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับชนิดของเชื้อที่ได้จากการทำ sequencing มากที่สุด

17. การดูลักษณะทาง histopathology เทียบกับชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบโดยวิธี PCR

นำตัวอย่างชนิดที่ผ่านการแช่ฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินมาสไลด์หนาประมาณ 3 μM วางบนสไลด์และย้อมด้วยเทคนิค Haematoxylin and Eosin (H&E) และ Grocott's methenamine silver stain (GMS) เพื่อประเมินลักษณะรูปร่างเชื้อราและให้การวินิจฉัยชนิดของเชื้อราทาง histopathology หลังจากนั้นเทียบชนิดของเชื้อราจากการดูลักษณะทาง histopathology กับชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบโดยวิธี PCR และหาเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องที่ได้จากการวินิจฉัยด้วยลักษณะทาง histopathology

ลักษณะทาง histopathology ที่นำมาหาความสัมพันธ์กับชนิดของเชื้อที่ตรวจพบโดยวิธี PCR-sequencing

ตารางที่ 7 Morphology of fungi

	<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i>	<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
Hyphae size	medium	medium	large	small
Regularity	Regular	Regular	Irregular	Pseudohyphae
Septation	Septate	Septate	Rare	Pseudohyphae
Angle of branching	45 ⁰	45 ⁰ / 90 ⁰	90 ⁰	No

	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Dendryphiella sp.</i>
Hyphae size	Medium	Large	large
Regularity	Regular and Irregular	Mostly regular Some irregular	Regular and Irregular
Septation	Rare	Septate	Septate
Angle of branching	unidentified	Club-like appearance Straight or Bending	90 ⁰

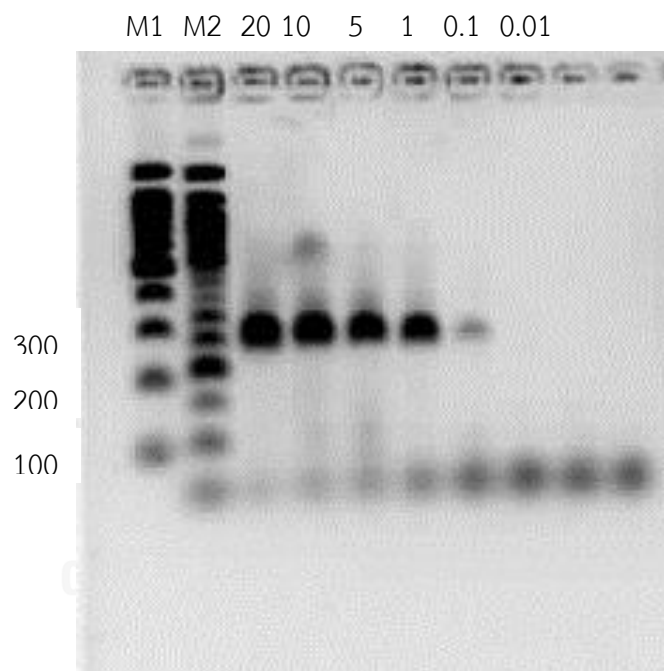
บทที่ 4 ผลการทดลอง

ภายหลังการค้นหาลำดับเบสของเชื้อรา 10 ชนิด จึงทำการเลือกบริเวณที่มีความแตกต่างของลำดับเบสซึ่งมีความยาว 200-300 คู่เบส และทำการหา forward primer และ reverse primer ได้ตามรูปภาพข้างล่างนี้

1. *Aspergillus clavatus* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: NKCM1003
2. *Neosartorya fischeri* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete cds, strain: JCM 1740
3. *Aspergillus flavus* gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, partial and complete sequence
4. *Aspergillus fumigatus* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA
5. *Rhizopus oryzae* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: CBS 393.34
6. *Mucor indicus* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: CBS 671.79
7. *Fusarium solani*, 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain FMR 7240
8. *Fusarium chlamydosporum* genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain TUFc26
9. *Candida albicans* genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain Kw1772
10. *Pseudallescheria boydii* 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain IHEM 14358

รูปภาพที่ 1 แสดงdifferentiated primers : forward primer และ reverse primer

การทดสอบความไวและความจำเพาะของ differentiated primers พบว่าความไวของ primer ที่ทดสอบจากการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อรา positive control มีปริมาณของดีเอ็นเออยู่ที่ 0.1 ng



รูปภาพที่ 2 แสดง sensitivity of differentiated primers มีค่าอยู่ที่ 0.1 ng

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ differentiated ที่ใช้ในการหาชนิดของเชื้อรา พบว่าเชื้อ positive control ที่นำมาหาความจำเพาะโดยการนำมาทำพีซีอาร์ตามด้วยการทำ DNA sequencing นั้น มีลำดับเบสตรงกันหรือเข้าได้กับลำดับเบสที่ใช้อ้างอิงจากเว็บไซต์ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ดังรูปภาพข้างล่างนี้

	350	360	370	380	390	400	410	420
Aspergillus clavatus	GTAATCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-TCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCCCCGTCCCC							
Neosartorya fischeri	GTAATCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-TCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCCCCGTCCCC							
Aspergillus flavus	GTAATCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-TCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCCCCGTCCCC							
Aspergillus fumigatus	GTAATCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-TCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCCCCGTCCCC							
Sequencing	GGAATCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-TCAAGCACGGCTTGTGTGGGGCCCCGTCCCC							

	430	440	450	460	470	480	490	500
>GGTTTCCCGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACC								
>-TCTCCCGGGG-ACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACC								
>TCTGC								
>CTCTCCCGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACC								
>CTCTCCCGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACC								

	510	520	530	540	550	560	570	580
;GGCCGGCCGGCGCCTGTCGACACC-AA								
;GCCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACTTTA								
;GCCCCGGCCGGCGCCTGTCGACACC-AA								
;GCCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACTTTA								
;GCCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACTTTA								

รูปภาพที่ 3 แสดงการนำลำดับเบสของเชื้อ positive control ชนิด Aspergillus fumigatus ที่ได้ทำ sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ Aspergillus sp. สปีชีส์ต่างๆ ที่สืบค้นจากเว็บไซต์ NCBI พบลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะต่อลำดับเบสของ Aspergillus fumigatus

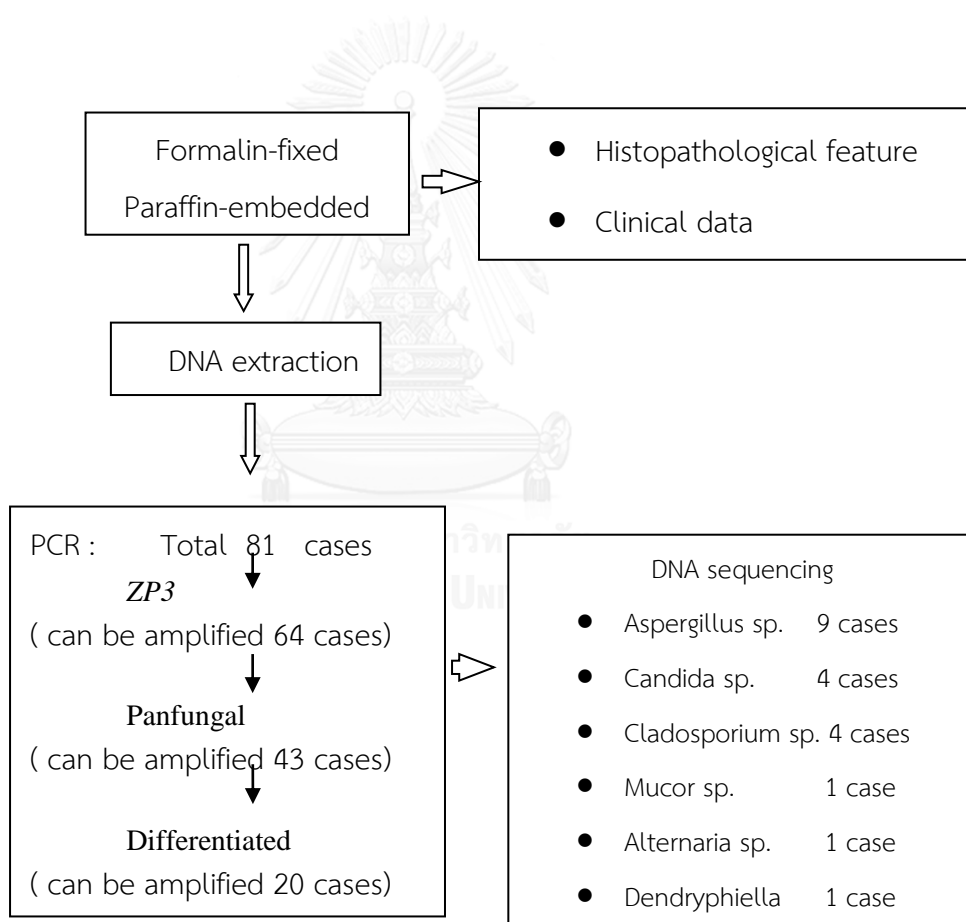
```

300 310 320 330 340 350 360 37
Fusarium solani ACATTGCGCCCGCCAGTATTCCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAGGCCCGGGCCCT
Fusarium chlamydosporum ACATTGCGCCCGCCAGTATTCCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAAGCTC--AGCTT
Sequencing result ACAAATGCGAC--GCAGTATTCCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAGGCCCGGGCCCT
170 380 390 400 410 420 430 440 450
:TTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCCAAAATACAGTTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATTGCGTA
:TTGGTGTGGGACTCG-CGGTAACCCGC-----GTCCCCAAAATCGATTGGCGGTCCAGCTCG-AGCTTCCATAGCGTA
:TTGGCGTTGGGGATCGGCGGA-GCCCCCGTGGGCA-CCGCCGCCAAAAATACAGTTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATCGCGTA
460 470 480 490 500 510
TAGTAGCTA-ACACCTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCGGTAAAAACACCCAACT
TAGTAATCATACACCTCGTTACTGGTAATTCGTCGCGGCCACGCGGTAAAAAC-CCCAACT
TAGTAGCTA-ACACCTCGCGACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCGGTAAAAACACCCAACT

```

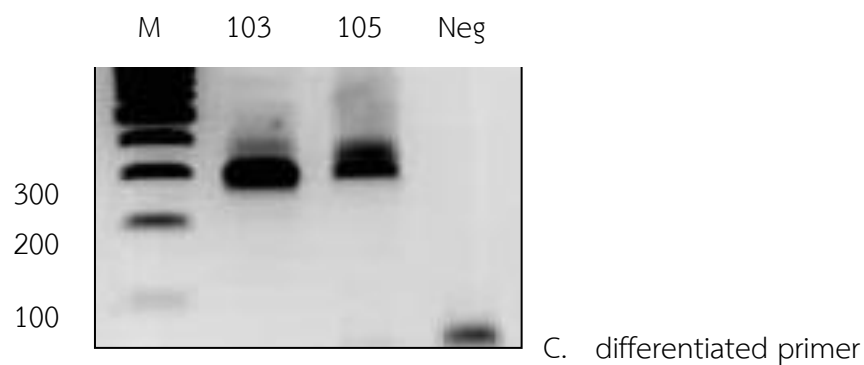
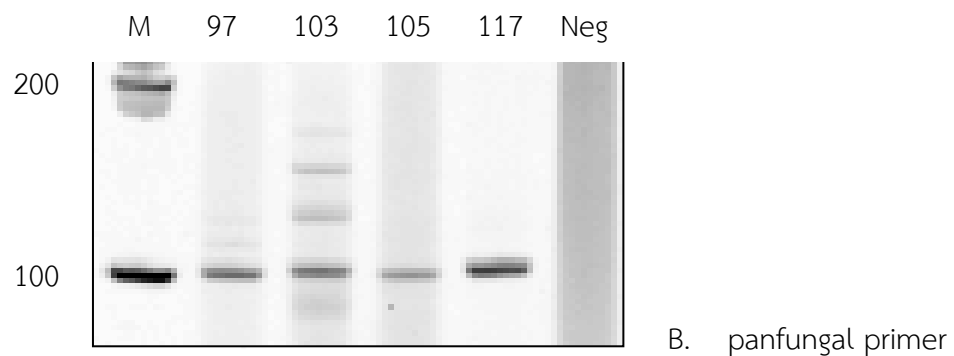
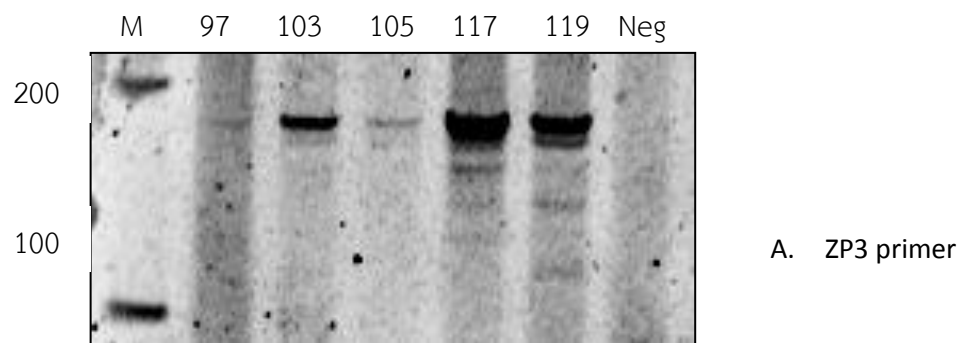
รูปภาพที่ 4 แสดงการนำลำดับเบสของเชื้อ positive control ชนิด *Fusarium solani* ที่ได้ทำ sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *Fusarium* sp. สปีชีส์ต่างๆที่สืบค้นจากเว็บไซต์ NCBI พบลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะต่อลำดับเบสของ *Fusarium solani*

การทดลองในผู้ป่วยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามทั้ง 81 รายพบว่า การทดสอบด้วย ZP3 primer สามารถตรวจพบได้ 64 ราย (79%) การศึกษาต่อมาด้วย panfungal 18s rRNA primer พบมีการติดเชื้อราอยู่จำนวน 43 ราย และในการทดลองสุดท้ายด้วย differentiated primers พบว่ามีผู้ป่วย 20 รายที่สามารถทำ PCR และให้ผล DNA sequencing เป็นผลสำเร็จ ในผู้ป่วยทั้ง 20 ราย พบว่ามีเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยที่สุดคือ *Aspergillus sp.* คือพบเป็นจำนวน 9 ราย (45%) ส่วนที่เหลือเป็นการติดเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Aspergillus sp.* ได้แก่ การติดเชื้อ *Candida sp.* เป็นจำนวน 4 ราย (20%), *Cladosporium sp.* เป็นจำนวน 4 ราย (20%), *Mucor sp.* เป็นจำนวน 1 ราย (5%), *Alternaria sp.* เป็นจำนวน 1 ราย(5%) และ *Dendryphiella sp.* เป็นจำนวน 1 ราย (5%) สามารถแสดงผลการทดลองตามลำดับขั้นตอนการทดลองดังรูปข้างล่าง



รูปภาพที่ 5 ลำดับขั้นตอนการทดลองและผลการทดลอง

จากผลการทดลองการทำกระบวนการ PCR สามารถตรวจพบโดยใช้ไพรเมอร์ ZP3 ตรวจสอบตัวอย่างโดยพบได้ในผู้ป่วย 64 ราย จาก 81 ราย การตรวจสอบด้วย panfungal 18s rRNA primer พบได้ในผู้ป่วย 43 รายจาก 64 ราย และการทดลองด้วย differentiated primer พบได้ในผู้ป่วย 20 รายจาก 43 รายนั้น สามารถแสดงถึงผลการตรวจสอบพบได้ด้วยกระบวนการ PCR ได้ดังตัวอย่างการตรวจพบดังภาพ



รูปภาพที่ 6 Electrophoresis A,ZP3 primer; B, Panfungal primer ;
C,Differentiated primer; M, DNA ladder 100bp; Neg, distilled water

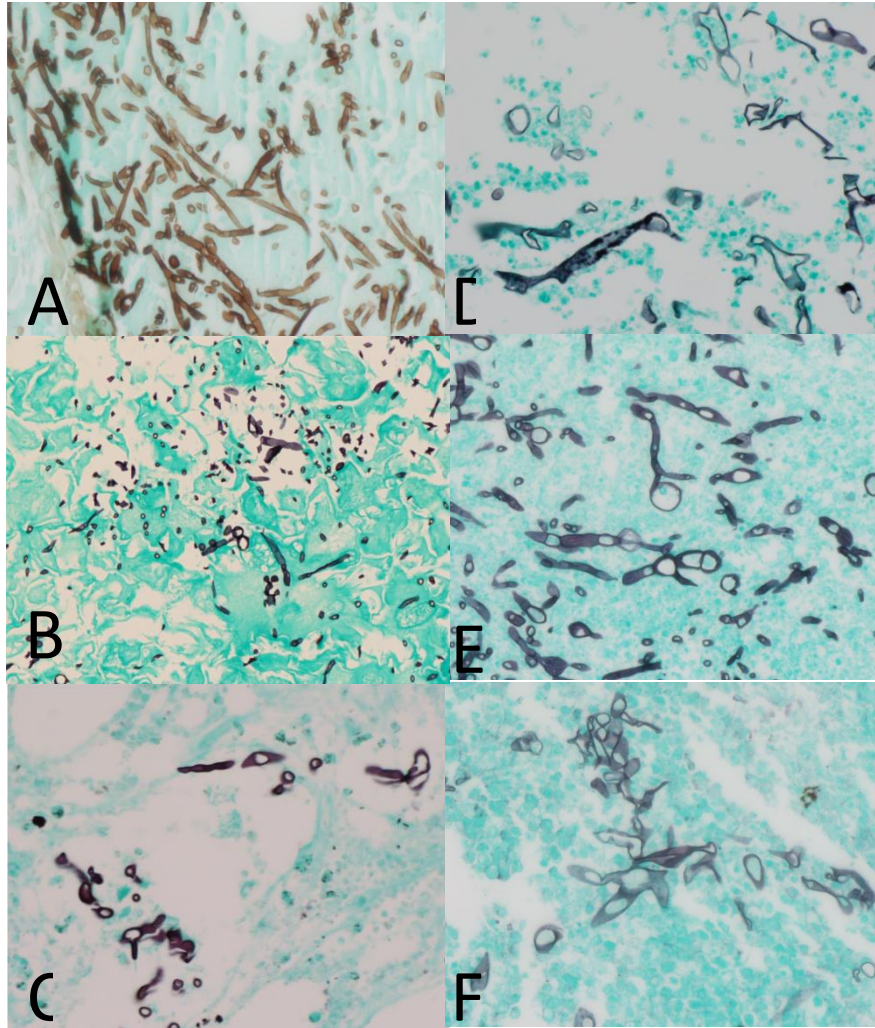
จากผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์พบว่า มีตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อรา *Aspergillus sp.* จำนวน 5 ราย เชื้อรา *Cladosporium sp.* จำนวน 5 ราย เชื้อรา *Mucor sp.* จำนวน 2 ราย เชื้อรา *Candida sp.* จำนวน 1 ราย เชื้อรา mix infection จำนวน 3 ราย ได้แก่ *Mucor sp.+ Candida sp.*, *Aspergillus sp.+ Candida sp.*, และ *Mucor sp.+ Aspergillus sp.* และตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจสอบชนิดของเชื้อราสาเหตุของโรคได้โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เนื่องจากมีปริมาณเชื้อที่น้อยมากอยู่ 4 ราย ตามผลการศึกษารูปร่างของเชื้อราในตารางดังต่อไปนี้



ตารางที่ 8 แสดงผลการวินิจฉัยด้วยการดูรูปร่างของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์และผลการวินิจฉัยชนิดของเชื้อราจากการศึกษาทางโมเลกุล

No.	Size	Hyphae parallel pattern	Hyphae regularity	Hyphae septation	Hyphae branching	Histological diagnosis	Molecular diagnosis
16	medium	No	regular	septate	acute angle (45°)+ right angle (90°)	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
30	small to large	No	pseudohyphae	pseudohyphae	pseudohyphae	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
31	medium	Yes	regular	septate	45°	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
35	unidentify	Yes	regular	pseudohyphae	45°	<i>Mucor sp.+ Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
36	medium	Yes	regular	septate	45°	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
41	medium	Yes	regular	septate	45°	<i>Aspergillus sp. + Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
66						inadequate for diagnosis	<i>Aspergillus sp.</i>
84		Yes	regular	septate	45°	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
92	large	No	irregular	septate	90°	<i>Mucor sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>
94						inadequate for diagnosis	<i>Aspergillus sp.</i>
96	medium		regular			inadequate for diagnosis	<i>Aspergillus sp.</i>
97						inadequate for diagnosis	<i>Aspergillus sp.</i>
103	medium	No	regular	inadequate to specify	45°	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
105	medium	No	regular	septate	45°	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>
117	medium	Yes	regular	septate	45°	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
119	medium	No	irregular	non-septate	90°	<i>Mucor sp.</i>	<i>Dendryphie lla sp.</i>
120	medium to large	No	irregular	septate	90°	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
125	medium	No	regular	septate	45°	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
128	medium	No	irregular	septate	45°	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
132	large	No	irregular	pseudohyphae	90°	<i>Mucor sp.+ Aspergillus sp.</i>	<i>Candida sp.</i>

ลักษณะรูปร่างที่ได้ทำการตรวจสอบดูลักษณะจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
สามารถพบลักษณะที่แสดงถึงลักษณะของเชื้อราชนิดต่างๆได้ดังภาพแสดงด้านล่างนี้



รูปภาพที่ 7 ลักษณะรูปร่างของเชื้อราเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ A, *Aspergillus* sp.;
B, *Candida* sp.; C, *Cladosporium* sp.; D, *Mucor* sp.; E, *Alternaria* sp.;
F, *Dendryphiella* sp.

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในด้านต่างๆ สามารถเก็บรวบรวมข้อมูลที่สมบูรณ์ครบถ้วนได้ในผู้ป่วยจำนวน 7 ราย ดังตารางข้างล่างต่อไปนี้

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลผู้ป่วยและผลการวินิจฉัยทางคลินิกเทียบกับผลการวินิจฉัยทางโมเลกุล



Cas e no.	Sex	Age	Comorbidity	Complaint Symptom	Clinical finding	Location	extra sinus involvement	Treatment	Duration of symptom	Clinical outcome	Definite diagnosis	molecular diagnosis
18	M	55	DM type I	occipital headache, blurred vision and proptosis right eye, tinnitus both ears	proptosis, total ophthalmoplegia	sphenoid sinus, right maxillary sinus	Carvernous sinus, brain, eye	Voriconazole, Amphotericin B	6 days	improved	invasive mucormycosis	Cladosporium sp.
35	F	57	DM type II, HT, CHF, AF	blurred vision right eye, headache	Blindness left eye	pansinusitis	nasopharynx, base of skull, carvernous sinus	Amphotericin B	2 weeks	improved	invasive mucormycosis	Candida sp.
41	M	20	AML, Agranulocytosis, stool strongyloid	nasal congestion, pain both cheeks	necrotic at inferior turbinate right nose	maxillary sinus	right septum, inferior and middle turbinate	Capofungin, Amphotericin B, itraconazole	2 weeks	transfer to other hospital	invasive aspergillosis	Candida sp.
54	F	34	Diffuse large B cell lymphoma, aplastic anemia	facial pain	swelling of left maxillary area	left maxillary sinus	Nasal canal, nasal turbinate	Amphotericin B	5 days	DEAD due to septicemia from other gram-neg organisms E.coli	invasive aspergillosis	Aspergillus sp.

117	F	52	diffuse large B cell lymphoma on CHOP	headache with fever, runny nose	conjunctivitis, endophthalmitis, epiphora	pansinusitis	middle turbinate, nasal septum, uncinate, skin, lung	Amphotericin B, voriconazole	1 week	improved	invasive aspergillosis	Aspergillus sp.
119	F	72	DM type II, HT, AF, septicemia (gram-)	blurred vision, swelling and pain right eye, pain and numbness right face	proptosis, diplopia, chemosis, impaired sensation CN V1, V2 Rt., ophthalmoplegia right eye	pansinusitis	middle turbinate, carvernous sinus, lateral nasal wall, septum, orbital floor, brain, lung	Amphotericin B, Posaconazole, Voriconazole	2 days	improved	invasive mucormycosis	Dendryphiella sp.
132	M	55	none	swelling, blurred vision and limit movement right eye, headache right side	right facial palsy, proptosis, ptosis, ophthalmoplegia	pansinusitis	right orbit, orbital apex, carvernous sinus	Amphotericin B	1 day	improved	invasive aspergillosis and invasive mucormycosis	Candida sp.

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

หนึ่งในปัญหาสำคัญในการให้การรักษาแก่ผู้ป่วยที่เป็นโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามคือ การไม่สามารถบอกชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคได้ การไม่สามารถบอกถึงชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคได้นี้ก่อให้เกิดการรักษาด้วยยาต้านเชื้อราที่ไม่ตรงกับชนิดของเชื้อราซึ่งจะก่อให้เกิดผลการรักษาผู้ป่วยได้ไม่ดีเพียงพอ

เท่าที่ผ่านมา การวินิจฉัยโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามได้อ้างอิงจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อรา โดยทั่วไปแล้วถึงแม้ว่าวิธีการเหล่านี้สามารถตรวจสอบได้แต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดหลายอย่าง การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ถึงแม้ว่าสามารถช่วยได้ในการบ่งบอกชนิดของเชื้อรา แต่ก็มีหลายครั้งที่กระบวนการเหล่านี้มีข้อจำกัด การตรวจด้วย Microscopy ซึ่งสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อราได้ด้วยการตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ แต่เนื่องจากอาจมีลักษณะรูปร่างที่ซ้อนทับกันของเชื้อราหลายชนิด วิธีการนี้จึงถือว่าไม่มีความน่าเชื่อถือในการให้การวินิจฉัยที่แน่นอนของชนิดของเชื้อราในโรคการติดเชื้อราชนิดลุกลาม กระบวนการดั้งเดิมอีกวิธีในการบ่งบอกชนิดของเชื้อราคือ การเพาะเชื้อ กระบวนการนี้ถึงแม้จะพิจารณาเป็นวิธีการมาตรฐานในการวินิจฉัยการติดเชื้อราเนื่องจากการมีความจำเพาะที่สูง แต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องด้วยการมีความไวที่ต่ำ นอกจากนี้กระบวนการนี้ยังทำได้เฉพาะในชิ้นเนื้อสดซึ่งการยืนยันการปรากฏของเชื้อราเป็นไปได้ยาก ไม่เหมือนกับชิ้นเนื้อที่ใช้ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการนำเทคนิคใหม่มาใช้ในการแยกชนิดและบ่งบอกชนิดของเชื้อราได้แก่วิธีพีซีอาร์ กระบวนการนี้มีข้อดีเหนือวิธีการดั้งเดิมในด้านของการมีความเร็ว ความไวและความจำเพาะที่มากกว่า นอกจากนี้ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่นำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการแช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ดังนั้น การเลือกบริเวณที่มีจำนวนของเชื้อร่าก่อโรคมกที่สุดสามารถทำได้โดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หาบริเวณตำแหน่งที่มีเชื้อราอยู่มาก ทำให้สามารถตรวจด้วยกระบวนการนี้ได้ผลมากขึ้น ข้อดีอีกอย่างสำหรับเนื้อเยื่อที่ผ่านการฝังพาราฟิน คือ สามารถนำเนื้อเยื่อตัวอย่างมาใช้ในการทดลองด้วยวิธีพีซีอาร์ซ้ำเป็นจำนวนหลายครั้งได้โดยไม่มีผลจำเป็นต้องทำการผ่าตัดใหม่ในผู้ป่วยด้วยโรคชนิดนี้

สำหรับการทดสอบด้วยกระบวนการพีซีอาร์ เริ่มต้นจากการทดสอบด้วยไพรเมอร์ ZP3 ซึ่งพบว่าสามารถให้ผลการทดลองได้ในผู้ป่วย 64 รายจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 81 ราย ผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้อาจเกิดจากการแตกของดีเอ็นเอในกระบวนการแช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน และอาจเกิดจากการมี inhibitors ในพาราฟิน กระบวนการทดสอบด้วยไพรเมอร์ ZP3 เป็นการทดสอบถึงคุณภาพดีเอ็นเอภายในตัวอย่าง ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีคุณภาพที่ดี ตัวอย่างก็จะสามารถ

ให้ผลการทดลองในกระบวนการพีซีอาร์ได้ ต่อมาเป็นการทดสอบการมีกรดดีออกซีไรโบสที่บริเวณ conserved 18s rRNA sequence เรียกไพรเมอร์ที่ทดสอบที่ตำแหน่งนี้ว่าไพรเมอร์ panfungal การทดสอบนี้สามารถตรวจพบในผู้ป่วย 43 รายจาก 64 ราย รายที่ตรวจพบสามารถบ่งบอกถึงการมีกรดดีออกซีไรโบส ส่วนในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบ อาจเกิดจากการมีเชื้อน้อยเกินไป หรือการขาดหายไปของกรดดีออกซีไรโบสในพาราฟินเมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องมือโครโมโตมในบางช่วงของการตัดชิ้นเนื้อทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยมากๆ และท้ายสุดเป็นการทดสอบด้วยไพรเมอร์บริเวณ variable site หรือเรียกว่าไพรเมอร์ differentiated ซึ่งปรากฏให้ผลการทดลองในผู้ป่วย 20 รายจากผู้ป่วย 43 ราย ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยไพรเมอร์ differentiated นี้เกิดจากการมีดีเอ็นเอของเชื้อราไม่เพียงพอต่อการทำ sequencing และเนื่องจากดีเอ็นเอที่ถูกทำลายในขั้นตอนการแช่ฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินมักจะมีขนาดเล็ก มีเพียงจำนวนน้อยที่เป็นสายยาว การมีผลผลิตของพีซีอาร์ที่มีขนาดใหญ่คือ ประมาณเกือบ 300 bp จึงยากต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์ สำหรับไพรเมอร์ differentiated นี้ ภายหลังจากการผ่านการทำกระบวนการ PCR-sequencing แล้ว จะทำให้สามารถแยกแยะชนิดของเชื้อราในระดับจีโนมส์ได้ เนื่องจากไพรเมอร์ชนิดนี้ครอบคลุมบริเวณที่เป็น variable site

สำหรับการวินิจฉัยโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตัวอย่างผู้ป่วยโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ differentiated ที่ออกแบบมาได้ในจำนวน 20 ราย พบว่ามีจำนวนตัวอย่างอยู่ 16 ตัวอย่างที่มีเชื้อรามากพอที่จะทำการดูรูปร่าง และให้การวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ โดยในการเปรียบเทียบผลการหาชนิดของเชื้อราด้วยวิธีการทางโมเลกุลกับการวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น พบว่าการวินิจฉัยได้ตรงกัน 13 ราย จาก 16 ราย คิดเป็น 81.25% ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เชื่อว่าการตรวจหาชนิดของเชื้อราก่อนเหตุโดยวิธีการทางโมเลกุลเป็นการตรวจที่มีความจำเพาะสูง มีความน่าเชื่อถือได้มาก ส่วนการตรวจวินิจฉัยด้วยการดูกล้องจุลทรรศน์อาจผิดพลาดได้ง่ายกว่าจากปัจจัยได้หลายอย่างเช่น ลักษณะรูปร่างของเชื้อราที่ไม่ชัดเจนไม่สามารถบ่งบอกชนิดของเชื้อราได้ หรืออาจเกิดได้จากผู้ให้การวินิจฉัย ทำให้ผลการวินิจฉัยจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่ตรงกับผลทางโมเลกุล การเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยที่ได้จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และการตรวจด้วยวิธีการทางโมเลกุลได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 8 และลักษณะรูปร่างของเชื้อราที่ให้การวินิจฉัยโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถเห็นได้จากรูปที่ 7 ตัวอย่างของการให้การวินิจฉัยที่ไม่ตรงกันระหว่างผลจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และผลจากวิธีการทางโมเลกุลสามารถพบได้ในรูปที่ 7E ซึ่งจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้การวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *Cladosporium* sp. ขณะที่ผลที่ได้จากวิธีการทางโมเลกุลให้ผลการวินิจฉัยว่าเป็น *Alternaria* sp. นอกจากนี้อาจสังเกตได้ว่าในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีเชื้อน้อยจนไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ด้วยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

นั้น การตรวจด้วยวิธีการพีซีอาร์ซีควอนซึ่งสามารถให้ผลในการตรวจหาเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ได้

สำหรับผลทางลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคโพรงงมุกอักษะจากเชื้อราชนิดลูกกลม พบว่าไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกและผลชนิดของเชื้อราที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีการทางโมเลกุลได้ อาจเนื่องจากข้อมูลทั้งหมดที่รวบรวมได้จากผู้ป่วยโรคโพรงงมุกอักษะจากเชื้อราชนิดลูกกลมนี้สามารถรวบรวมได้ทั้งหมดเพียง 7 ราย ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 9 โดยสามารถสังเกตได้ว่าในผู้ป่วยที่มาด้วยอาการเดียวกัน เช่นอาการทางตาหรืออาการปวดศีรษะเป็นไข้ แม้จะมาด้วยอาการเดียวกันแต่เชื้อต้นเหตุอาจเกิดได้จากเชื้อต่างชนิดกัน และจะเห็นว่าแพทย์ให้การรักษาโดยให้ยา azole antifungal ในผู้ป่วยที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ Mucorales เนื่องจากยา azole ไม่มีผลในการรักษาเชื้อในกลุ่ม Mucorales เป็นเช่นเดียวกับงานศึกษาที่เคยวิจัยมา แต่ก็ไม่สามารถบอกได้ว่าแพทย์ให้ยา azole ในผู้ป่วยที่เกิดจากเชื้อราชนิดที่จำเพาะเป็นชนิดใด เนื่องจากมีเชื้อหลายชนิดด้วยกันที่เป็นสาเหตุของโรคนี้

ในการศึกษานี้ ผู้ศึกษาได้ใช้วิธีพีซีอาร์พร้อมด้วยการออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาชนิดของเชื้อราที่โพรงงมุกอักษะจากเชื้อราชนิดลูกกลมในผู้ป่วย ซึ่งในผลการทดลองพบว่าเชื้อราที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยโรคโพรงงมุกอักษะจากเชื้อราชนิดลูกกลมคือเชื้อ *Aspergillus sp.* ผลการศึกษาที่ได้นี้ตรงกับผลที่ได้จากการทดลองของ Chen et al ซึ่งพบว่าเชื้อ *Aspergillus sp.* เป็นเชื้อราที่พบได้มากที่สุด แต่ผลการศึกษาที่ให้ผลที่ไม่ตรงกันกับผลการศึกษาที่ได้จากประเทศอินเดีย(1) ซึ่งพบว่าเชื้อที่พบมากที่สุดคือเชื้อ *Rhizopus arrhizus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบมากที่สุดในการก่อโรคโพรงงมุกอักษะจากเชื้อราชนิดลูกกลมแบบเฉียบพลัน การให้ผลที่แตกต่างกันออกไปนี้อาจอธิบายได้ว่ามีผลมาจากความแตกต่างของการกระจายที่อยู่ของเชื้อราที่โพรงงมุกอักษะชนิดต่างๆ ในภูมิภาคที่แตกต่างกันทั่วโลก

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนี้พบว่าไพรมอร์ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในกระบวนการฟิชเชอร์ซีเควนซึ่งมีประสิทธิภาพดีเพียงพอเพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อราในการก่อโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าจะเป็นโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม

การค้นพบจากการศึกษานี้อาจให้ข้อมูลทางระบาดวิทยาคร่าวๆในผู้ป่วยโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมจากห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา 3 แห่ง ถึงแม้ว่าข้อมูลที่ได้จะไม่ใช่อุบัติเหตุตัวแทนทั้งหมดสำหรับคนทั่วทั้งประเทศ แต่ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้ป่วยไทยที่มีโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม การค้นพบนี้มีประโยชน์ต่อแพทย์ผู้ให้การรักษาในการเลือกใช้ยาต้านเชื้อราอย่างครอบคลุมเพื่อให้การรักษาที่เหมาะสมต่อผู้ป่วยโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลมในช่วงตอนต้นของการตรวจวินิจฉัยพบ ในระหว่างการคอยผลทางห้องปฏิบัติการหรือการวินิจฉัยด้วยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus sp.* และ *Candida sp.* เป็นเชื้อที่พบได้มากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ การให้ยาร่วมกันของ Voriconazole และ Echinocandin(17) ซึ่งเป็นยาที่ให้ผลในการรักษาที่ดีต่อเชื้อทั้งสองชนิดนี้ ควรเป็นยาที่ใช้ในการรักษาในช่วงตอนต้นสำหรับผู้ป่วยที่คาดว่าน่าจะเป็นโรคโพรงงมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลูกกลม

จากการให้การวินิจฉัยด้วยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น การให้การวินิจฉัยโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์มีความแม่นยำในการให้การวินิจฉัยอยู่ที่ 81.25% ซึ่งถือว่ามีความเชื่อถือได้สูง

รายการอ้างอิง

1. Michael RC, Michael JS, Ashbee RH, Mathews MS. Mycological profile of fungal sinusitis: An audit of specimens over a 7-year period in a tertiary care hospital in Tamil Nadu. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2008;51(4):493-6.
2. Boyd GM, O'Malley BW. An algorithmic approach to the diagnosis and management of invasive fungal rhinosinusitis in the immunocompromised patient. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2000;33(2).
3. Johnson MD, Gleeson TD. Invasive Fungal Sinusitis. *Infections in Medicine*. 2010.
4. Richard D. deShazo MD, Kimberle Chapin MD, Ronnie E. Swain MD. Fungal Sinusitis. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337(4):254-9.
5. Das A, Bal A, Chakrabarti A, Panda N, Joshi K. Spectrum of fungal rhinosinusitis; histopathologist's perspective. *Histopathology*. 2009;54:854-9.
6. Richard D. deShazo MD, Margaret O'Brien M, Kimberle Chapin MD, Maria Soto-Aguilar M, Lloyd Gardner M, Ronnie E. Swain MD. A new Classification and Diagnostic criteria for Invasive fungal sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123:1181-8.
7. Chen C-Y, Sheng W-H, Cheng A, Chen Y-C, Tsay W, Tang J-L, et al. Invasive fungal sinusitis in patients with hematological malignancy: 15 years experience in a single university hospital in Taiwan. *BioMed Central Infectious Disease*. 2011;11(250).
8. Eli R. Groppo M, Ivan H. El-Sayed M, Ashley H. Aiken M, Christine M. Glastonbury M. Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging Characteristics of Acute Invasive Fungal Sinusitis *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;137(10):1005-10.
9. Jerome B. Taxy M. Paranasal fungal sinusitis: contributions of histopathology to diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(6):713-20.
10. Wiley A. Schell M. Histopathology of fungal rhinosinusitis. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2000;33(2).

11. Baskova L, Buchta V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol.* 2012;57:421-30.
12. Borman AM, Linton CJ, Miles S-J, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008;61(1):i7-i12.
13. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transplant Infectious Disease.* 2002;4(3):32-7.
14. Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, Desalermos A, Mylonakis E. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2012;54(9):1322-31.
15. Gharizadeh B, Norberg E, Loffler J, Jalal S, Tollemar J, Einsele H, et al. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses.* 2004;47:29-33.
16. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive Candidiasis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011;49(2):665-70.
17. Lai C-C, Tan C-K, Huang Y-T, Shao P-L, Hsueh P-R. Current Challenges in the management of invasive fungal infections. *J Infect Chemother.* 2008;14:77-85.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



สารละลายในการทดลอง

10% SDS

SDS 10 gram
 เติมน้ำ distilled water ให้ได้ 100 ml

Lysis buffer II

5M NaCl 15 ml
 0.5M EDTA (pH8) 48 ml
 เติมน้ำ distilled water ให้ได้ 1000 ml

10x TBE

Tris 108 gram
 Boric acid 55 gram
 EDTA (0.5 M) 40 ml
 เติมน้ำ distilled water ให้ได้ 1000 ml

1x TBE

10x TBE 100 ml
 เติมน้ำ distilled water ให้ได้ 1000 ml

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. Xylene (BDH, UK)
2. Ethanol (Hayman, UK)
3. NaCl (Univar, New Zealand)
4. EDTA (Serva, Germany)
5. Proteinase K (USB, USA)
6. SDS (USB, USA)
7. Phenol-Chloroform (USB, USA)
8. NH_4COOH_3 (Univar, New Zealand)

สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

1. dNTP (GeNei, USA)
2. 10x Buffer (Qiagen, Germany)
3. MgCl_2 (Qiagen, Germany)
4. Primers (Biodesign, Thailand)
5. Tag DNA Polymerase (Qiagen, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

1. 40% Acrylamide (Bio-RAD, China)
2. EDTA (Serva, Germany)
3. NaOH (Merck, USA)
4. Tris (Omnipur, China)
5. Boric acid (USB, Japan)
6. Temed (Omnipur, USA)
7. APS (Ammonium per Sulphate)
8. 25bp DNA Ladder (Promega, USA)
9. Cybr Green (Lonza, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose Gel Electrophoresis

1. Agarose (SeaKem, USA)
2. EDTA (Serva, Germany)
3. NaOH (Merck, USA)
4. Tris (Omnipur, China)
5. Boric acid (USB, Japan)
6. 100bp DNA Ladder (Promega, USA)
7. Cybr Green(Lonza, USA)

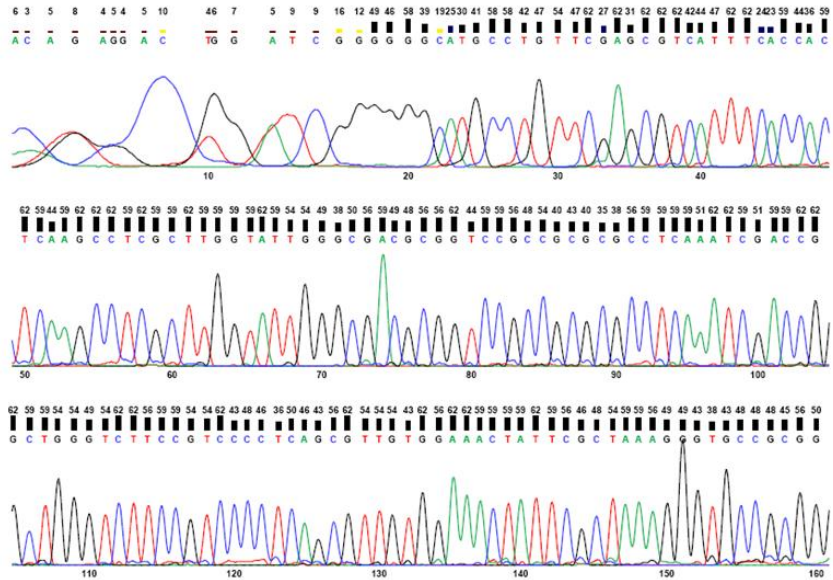
สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเจล

1. QG buffer (Qiagen, Germany)
2. Isopropanol (Burdick&Jackson, Korea)
3. PE buffer (Qiagen, Germany)
4. Elution buffer (Qiagen, Germany)

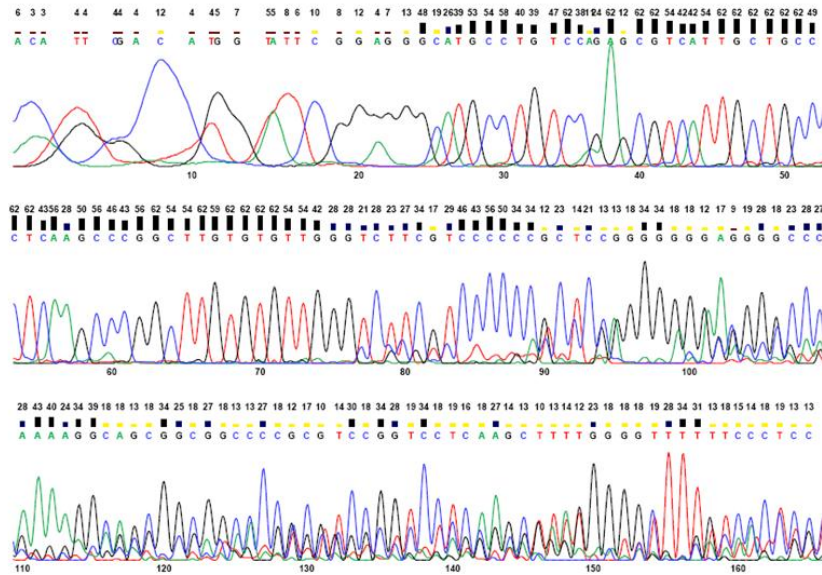
ภาคผนวก ข



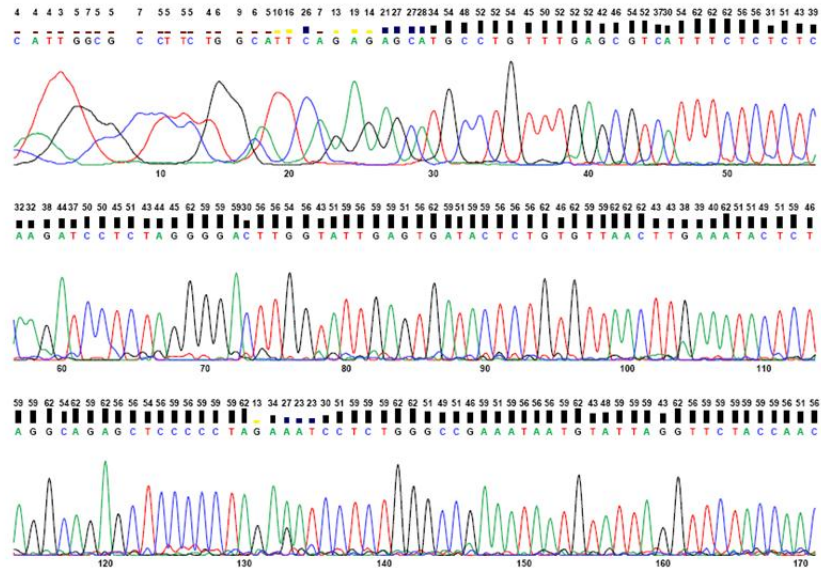
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพผนวก ข1 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 1 (ตัวอย่างที่ 16)
แสดงเชื้อ *Cladosporium sp.*



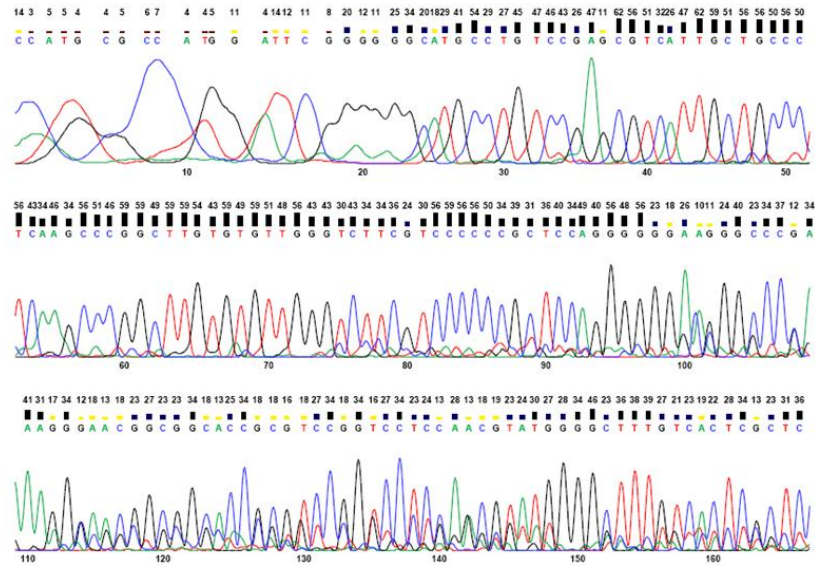
ภาพผนวก ข3 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 3 (ตัวอย่างที่ 31)
 แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*



ภาพผนวก ข4 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 4 (ตัวอย่างที่ 35)

แสดงเชื้อ *Candida sp.*

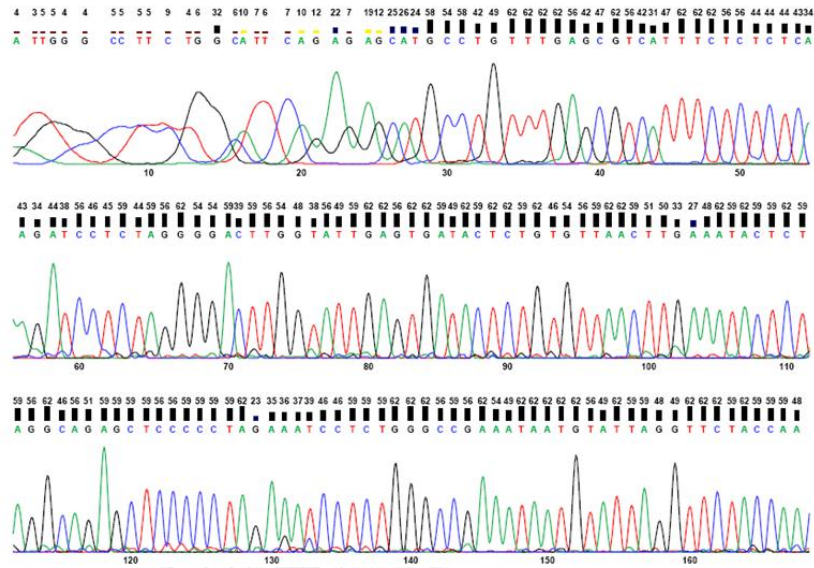
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพผนวก ข5 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 5 (ตัวอย่างที่ 36)

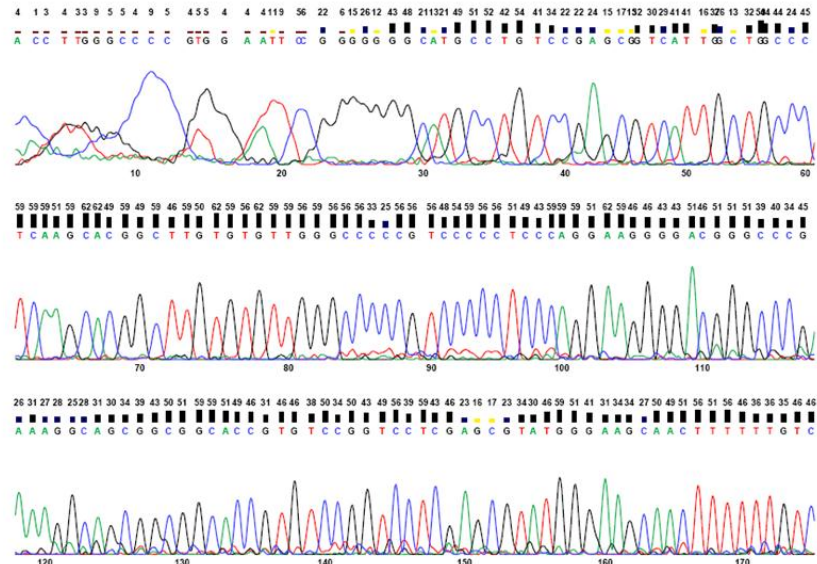
แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพผนวก ข6 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 6 (ตัวอย่างที่ 41)

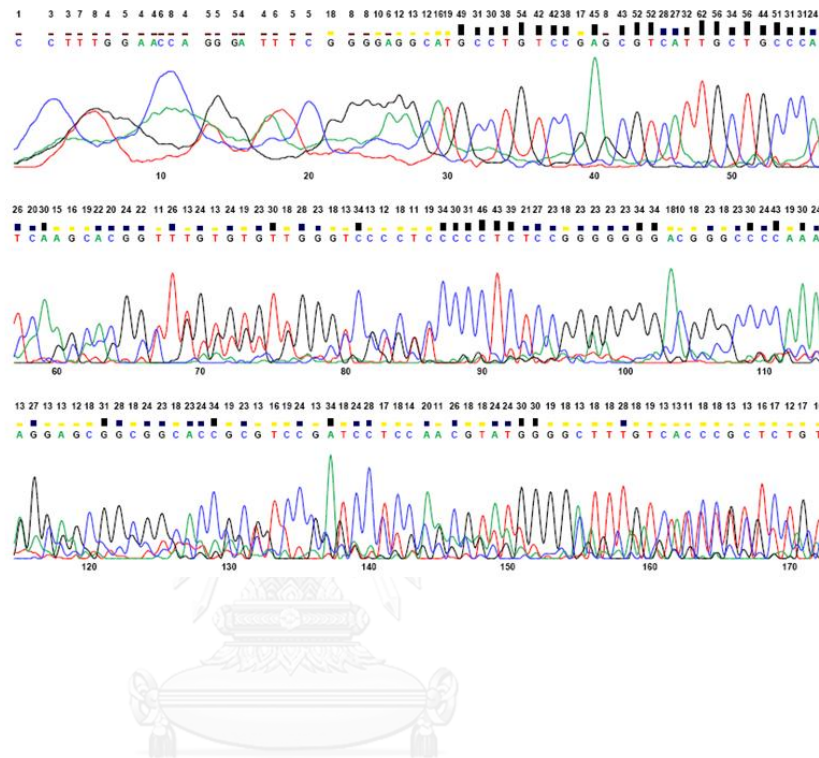
แสดงเชื้อ *Candida sp.*



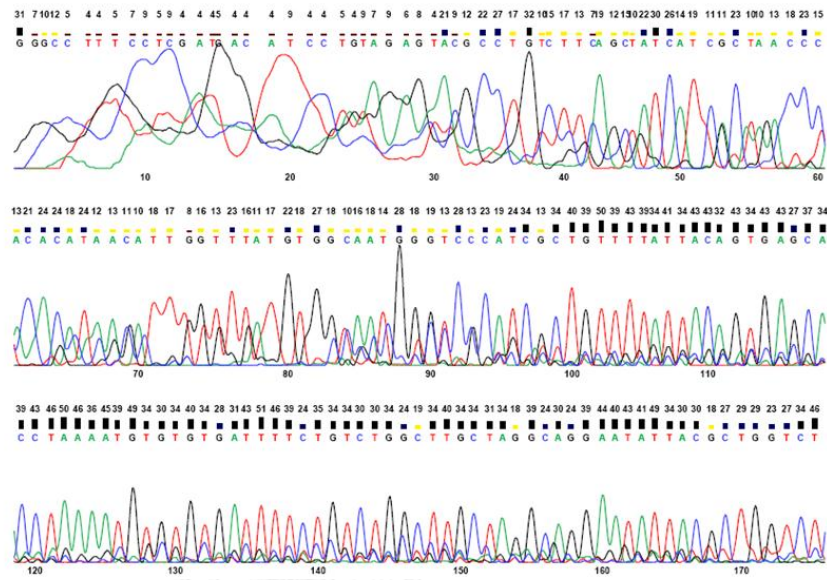
ภาพผนวก ข7 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 7 (ตัวอย่างที่ 66)

จุฬาฯ แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*

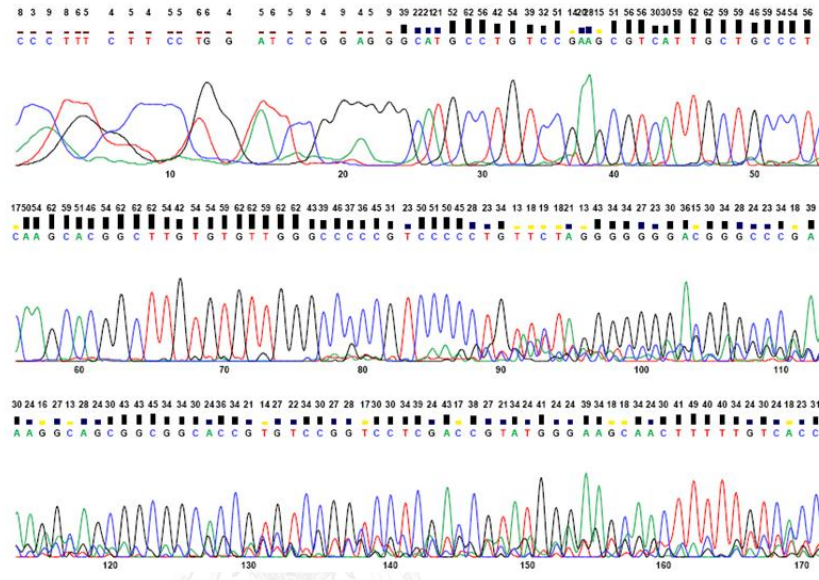
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพผนวก ข8 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 8 (ตัวอย่างที่ 84)
 แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*

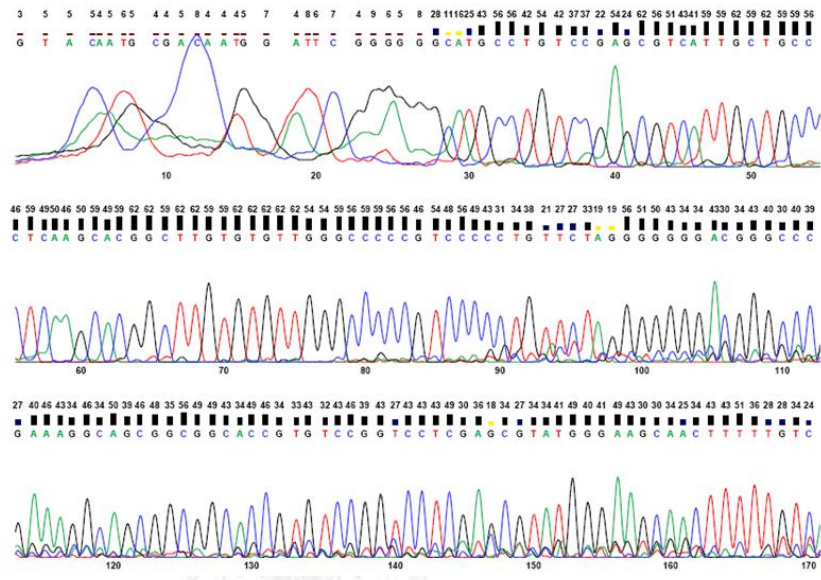


ภาพผนวก ข9 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 9 (ตัวอย่างที่ 92)
แสดงเชื้อ *Mucor sp.*

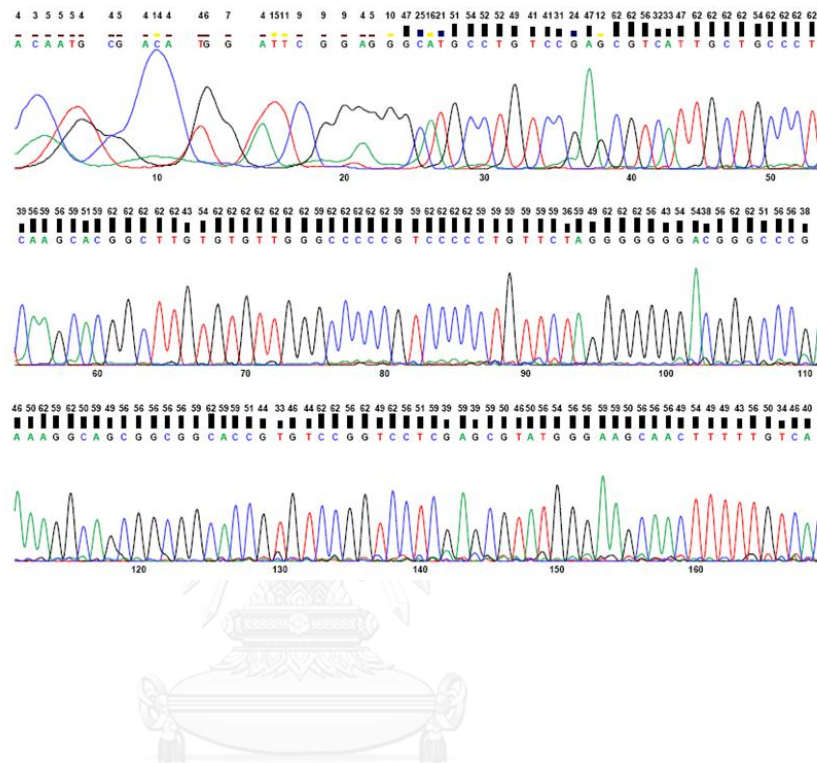


ภาพผนวก ข10 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 10 (ตัวอย่างที่ 94)

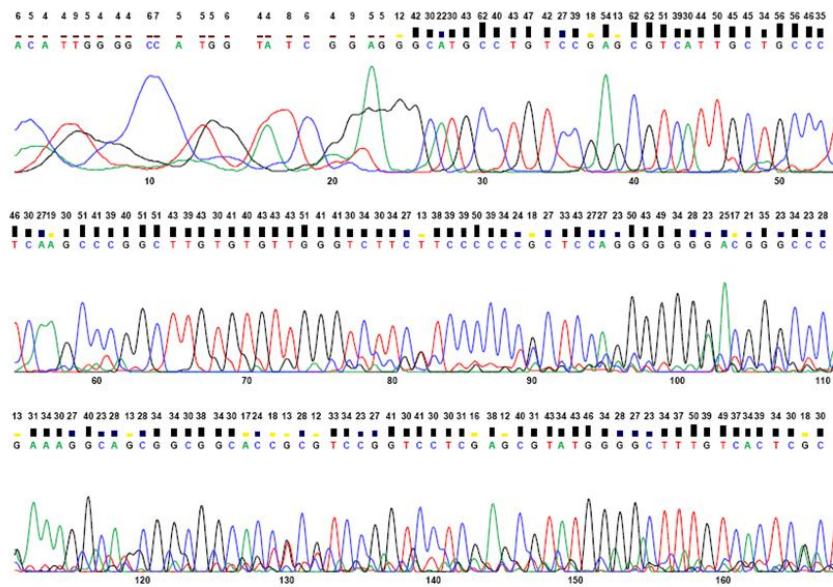
CHULA แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*



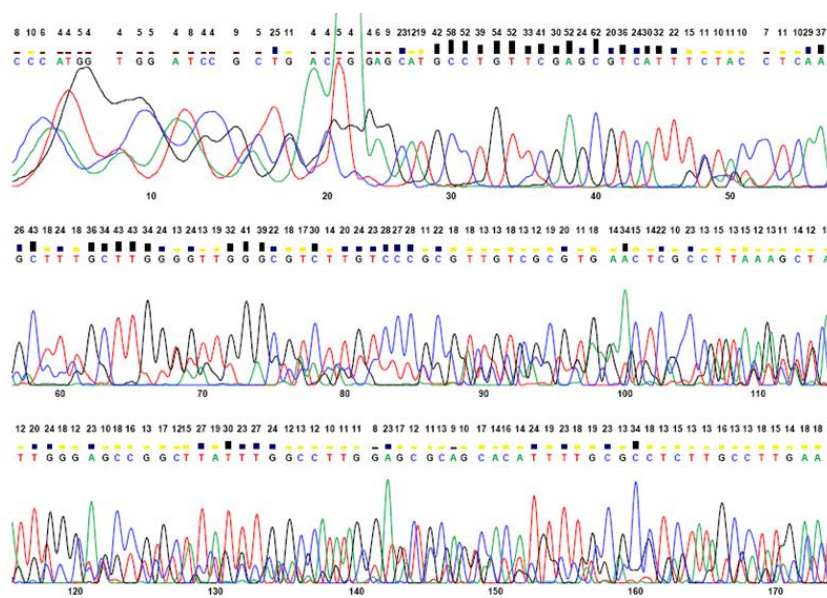
ภาพผนวก ข11 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 11 (ตัวอย่างที่ 96)
แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*



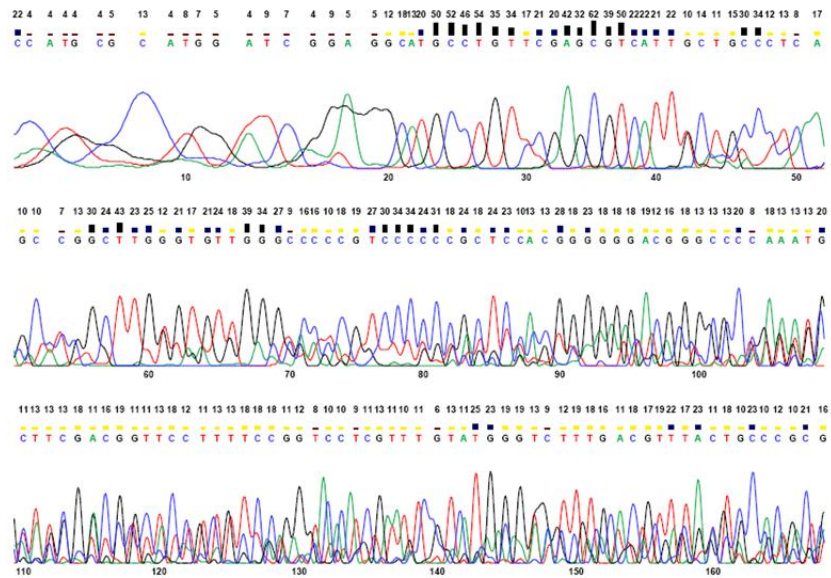
ภาพผนวก ข12 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 12 (ตัวอย่างที่ 97)
 แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*



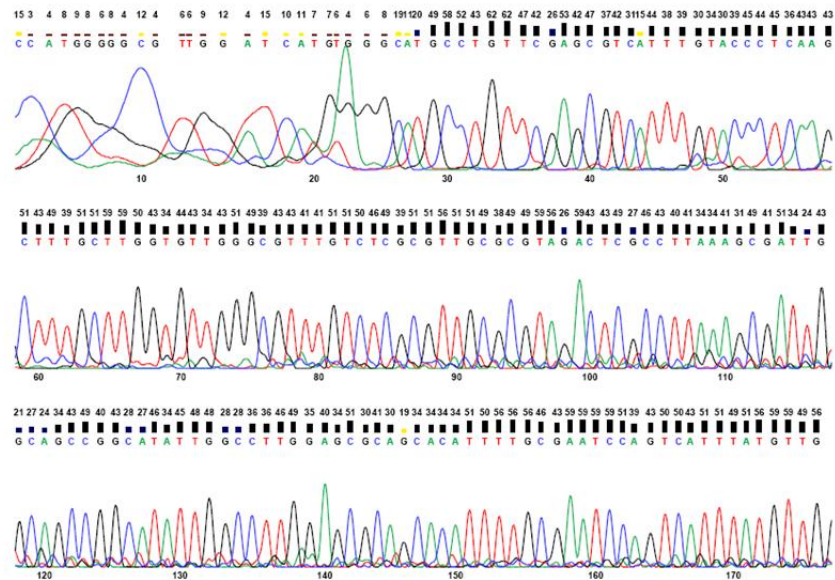
ภาพผนวก ข13 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 13 (ตัวอย่างที่ 103)
แสดงเชื้อ *Aspergillus sp.*



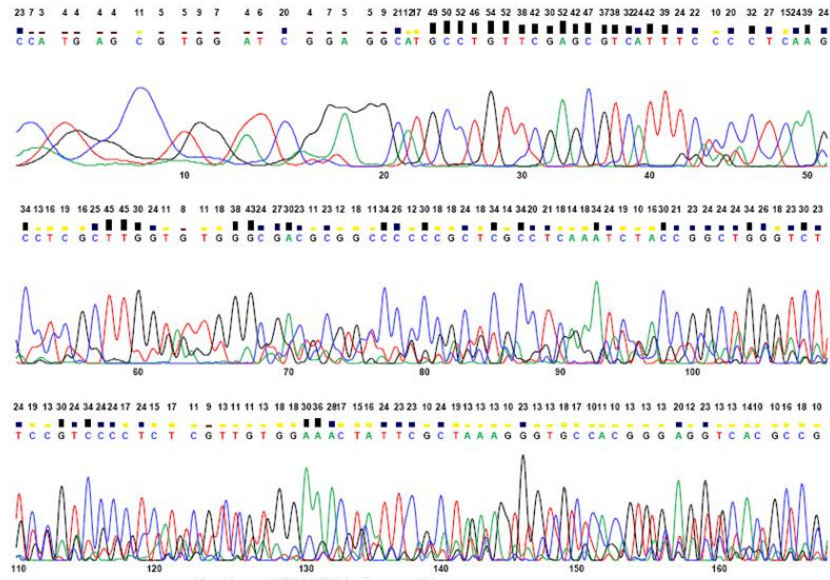
ภาพผนวก ข14 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 14 (ตัวอย่างที่ 105)
แสดงเชื้อ *Alternaria sp.*



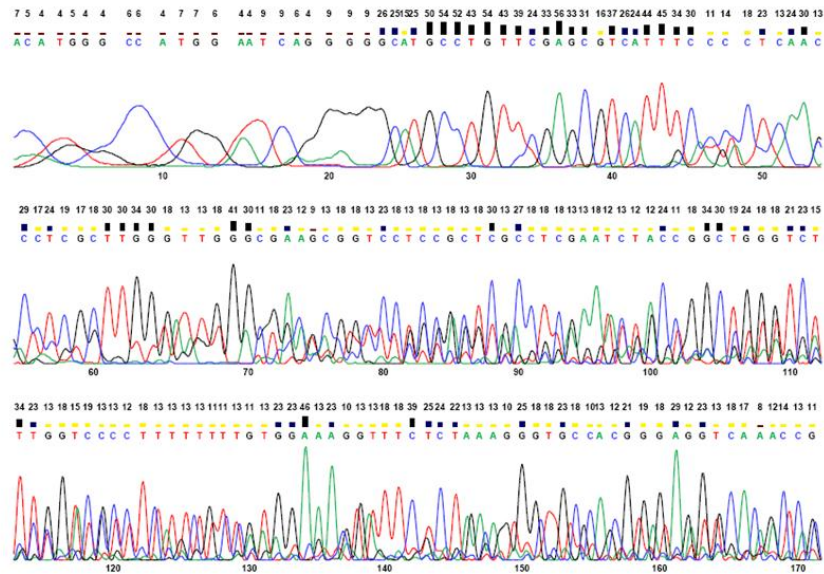
ภาพผนวก ข15 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 15 (ตัวอย่างที่ 117)
แสดงเชื้อ *Aspergillus* sp.



ภาพผนวก ข16 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 16 (ตัวอย่างที่ 119)
แสดงเชื้อ *Dendryphiella* sp.

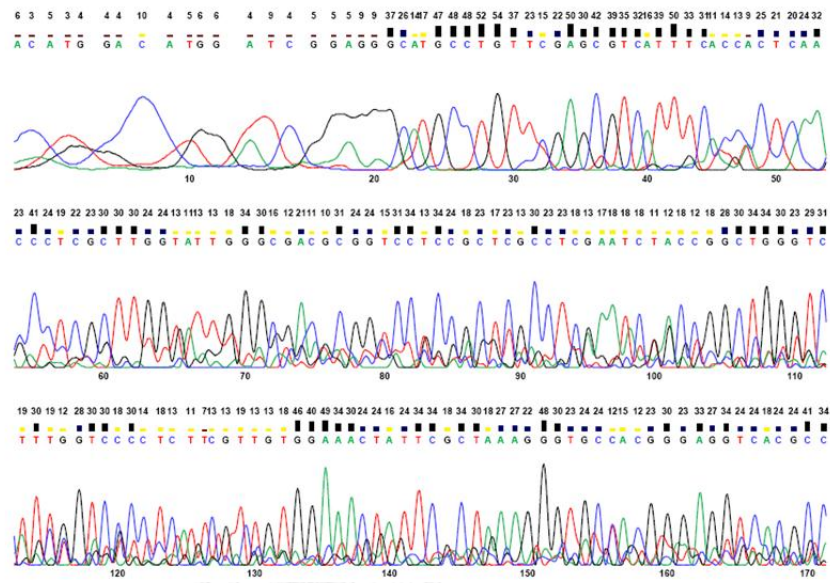


ภาพผนวก ข17 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 17 (ตัวอย่างที่ 120)
 แสดงเชื้อ *Cladosporium sp.*

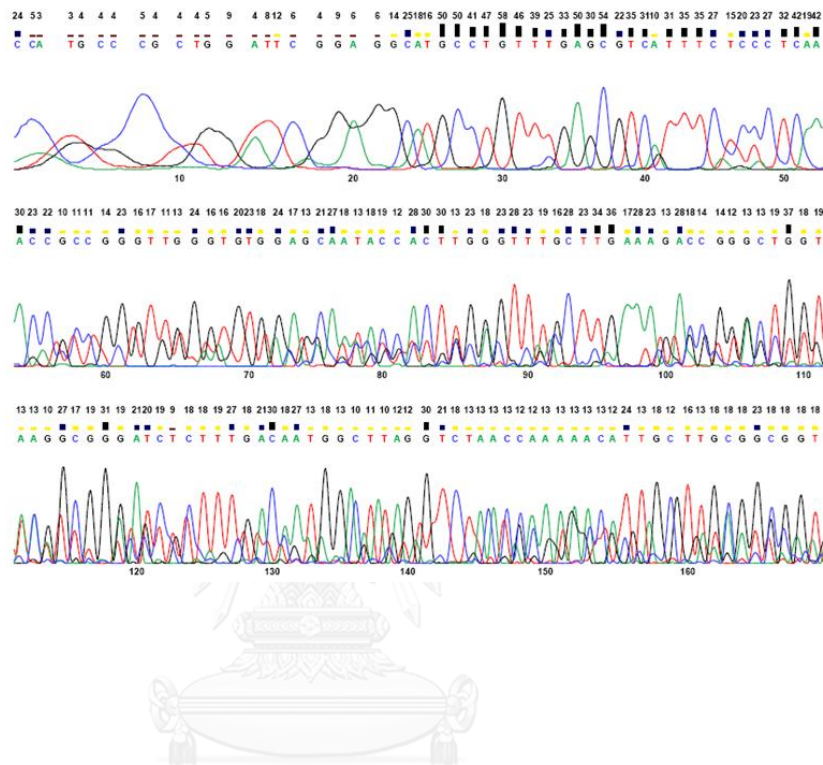


ภาพผนวก ข18 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 18 (ตัวอย่างที่ 125)

CHULA แสดงเชื้อ *Cladosporium* sp.



ภาพผนวก ข19 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 19 (ตัวอย่างที่ 128)
 แสดงเชื้อ *Cladosporium sp.*



ภาพผนวก ข20 ผลการทำ sequencing ในผู้ป่วยรายที่ 20 (ตัวอย่างที่ 132)
แสดงเชื้อ *Candida sp.*

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล สายชนม์ จาตุรันตบุตร

วัน เดือน ปีเกิด 16 กันยายน 2526

ที่อยู่ปัจจุบัน 259 ซอยพัฒนาการ 53 ถนนพัฒนาการ แขวงสวนหลวง

เขตสวนหลวง จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10250

เบอร์โทรศัพท์ 084-556-3069

อีเมลล์ saichonlan.m@gmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2549

สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์

การแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2555

ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์

การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงาน

พ.ศ. 2558

เข้าร่วมการนำเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ครั้งที่10 ปี

การศึกษา 2558

ในหัวเรื่อง “การศึกษาเชื้อราด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาเชื้อราที่พบ

บ่อย 4 ชนิดในโรคโพรงจมูกอักเสบจากเชื้อราชนิดลุกลามในผู้ป่วยชาวไทย “

วันที่ 11 สิงหาคม 2558 ณ มหาวิทยาลัยรังสิต