

### บทที่ 3

#### การตรวจหาเชื้อราในเล็บ

มีโรคของเล็บหลายโรคที่ให้ลักษณะทางคลินิกคล้ายกับการติดเชื้อราในเล็บเช่นโรคสะเก็ดเงิน ดังนั้นการอาศัยลักษณะทางคลินิกที่เข้าได้กับการติดเชื้อราในเล็บเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ถูกต้อง จำเป็นต้องตรวจพบเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคร่วมด้วยจึงจะทำให้การวินิจฉัยได้แน่นอนยิ่งขึ้น

ในอดีตถึงปัจจุบัน ได้มีการตรวจหาเชื้อราในเล็บได้หลายวิธีดังนี้

1. Direct microscopic examination
2. การเพาะเชื้อ
3. การตรวจทางพยาธิวิทยา
4. Immunohistochemistry
5. Flow cytometry

#### การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ

การตรวจหาเชื้อราในเล็บมีปัจจัยหลายอย่างที่อาจทำให้การตรวจผิดพลาดไม่พบเชื้อราได้เช่นการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทำไม่ถูกต้องหรือถูกที่ และได้ตัวอย่างที่ไม่เพียงพอ จากการศึกษาพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่บริเวณ conified layer ของ nail bed หรือส่วนใต้ของแผ่นเล็บยกเว้น การติดเชื้อแบบ WSO ซึ่งเชื้อจะอยู่บน nail plate เพราะฉะนั้นจะต้องขูดเอาส่วนของเล็บไปให้ถูกที่และมากพอจึงจะได้ผลการตรวจที่มีประสิทธิภาพ

#### วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจหาเชื้อราในเล็บ

1. ทำความสะอาดเล็บโดยใช้ 75% alcohol และขูดขี้เล็บหรือสิ่งสกปรกบริเวณใต้แผ่นเล็บออกไปก่อน โดยใช้ใบมีดเบอร์ 15
2. การขูดขุยใต้เล็บ ตำแหน่งที่จะเก็บตัวอย่างขึ้นอยู่กับรูปแบบของการติดเชื้อดังนี้
  - 2.1 DSO ควรนำเนื้อใต้แผ่นเล็บและขุยบริเวณ nail bed มาตรวจโดยใช้ใบมีดเบอร์ 15 สอดใต้แผ่นเล็บและตัวใบมีดด้านแหลมขึ้นข้างบน
  - 2.2 WSO นำใบมีดเบอร์ 15 ขูดบริเวณแผ่นเล็บที่ผิดปกติ

2.3 PSO ทำการเปิด nail plate ตรงบริเวณที่สงสัยว่าจะติดเชื้อแล้วจึงชุดขุยที่อยู่ข้างใต้นำมาตรวจหาเชื้อ

2.4 Candidal onychomycosis ให้เก็บขุยใต้เล็บตรงบริเวณที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ

#### Direct microscopic examination

นำขุยใต้เล็บวางบนสไลด์แล้วหยดน้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์แล้วนำไปตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์จะพบเชื้อราสีไม่มีสี

สารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์มีฤทธิ์ละลายเคอราตินทำให้ conified layer ของเล็บแยกตัวออกทำให้มองเห็นเชื้อราได้ง่ายขึ้น โดยทั่วไปอาจใช้ความเข้มข้น 10-20% หยดลงบนสไลด์และนำแผ่นสไลด์ไปอังไฟให้อุ่น ซึ่งจะทำให้เซลล์เกิดการรวมและแยกออกจากกันได้เร็วขึ้น ในการอังไฟไม่ควรอังให้ร้อนจนสารละลายเดือดเพราะจะทำให้เกิดการตกผลึกของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ตรวจหาเชื้อได้ยาก การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ให้หรี diaphrame ลงและใช้กำลังขยายต่ำก่อนจะมองเห็นเชื้อราได้ง่ายขึ้นถ้าหากตรวจไม่พบเชื้อ ให้ตั้งสไลด์ทิ้งไว้ 20-30 นาที เพื่อให้ขุยใต้เล็บแยกตัวออกและบางลงซึ่งอาจตรวจพบเชื้อได้ง่ายขึ้นเมื่อดูด้วยกำลังขยายต่ำแล้วพบเชื้อ ให้เปลี่ยนเป็นกำลังขยายสูง เพื่อตรวจดูลักษณะที่ละเอียดยิ่งขึ้นจะสังเกตเห็นว่าเชื้อราจะสะท้อนแสงออกเป็นสีเขียวอ่อนซึ่งต่างจาก cytoplasm ของ epithelium cells ซึ่งจะใสไม่มีสี นอกจากนี้ถ้าเป็นเชื้อกลากจะเห็นผนังกัน

การใช้ 10%-20% KOH with DMSO (dimethylsulfoxide) ตรวจหาเชื้อราในเล็บ สามารถตรวจหาเชื้อได้เร็วขึ้นโดยไม่ต้องใช้ความร้อนเนื่องจาก DMSO นั้นเป็นตัวเร่งทำให้เซลล์รวมและเพิ่ม permeability โดย DMSO มีคุณสมบัติเป็น hygroscopic จะเพิ่ม hydration ของเซลล์ทำให้เกิดการซึมผ่านเพิ่มขึ้น (Head,1984)

#### การเพาะเชื้อ

การเพาะเชื้อราจากขุยใต้เล็บสามารถเพิ่มการวินิจฉัยการติดเชื้อราในเล็บในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อโดยวิธี direct microscopic examination ได้อีก 5-15% (Head,1984)

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ใช้มีสองอย่างคือ

1. Sabouraud's dextrose agar and modified SDA
2. DTM (dertomatophyte test medium) อาหารชนิดนี้ไม่ค่อยนิยมใช้

### Sabouraud's dextrose agar (SDA)

เป็นอาหารมาตรฐานที่ใช้ในการเพาะเชื้อราทั่วไปรวมทั้ง saprophyte และแบคทีเรียก็จะเจริญได้ดีในอาหารนี้

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Dextrose	40 g.
Pepton	10 g.
Agar	20 g.
น้ำกลั่น	1000 cc.

ปรับ PH ให้เป็น 5.6 ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วเทลงหลอดทดลองหรือจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 120 c. นาน 10 นาที

### Modified SDA

อาหารชนิดนี้มีการเติมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียคือ chloramphenicol และนอกจากนี้ยังมี cycloheximide เพื่อยับยั้งเชื้อราบนเพื่อนทางห้องปฏิบัติการ

ส่วนประกอบ

SDA	
cycloheximide	0.50 mg/ml
chloramphenicol	0.05 mg/ml

เตรียมวุ้นของ SDA แล้วเติม chloramphenicol และ cycloheximide ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งที่ 118 c. นาน 10 นาที

### วิธีการเพาะเชื้อ

นำขุยใต้เล็บหรือแผ่นเล็บมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด คือเติมและไม่เติมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียใช้ inoculation needle ด้านปลายแต่ละสิ่งส่งตรวจ ลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 °C

### การแปลผล

อ่านผลเพาะเชื้อทุก 4-6 วัน ถ้ามีเชื้อราในอากาศขึ้นปนกับเชื้อราที่สงสัยว่าเป็น เชื้อกลาก ต้องทำ subculture คือถ่ายเชื้อที่สงสัยเหล่านั้นลงบน Sabouraud's agar ใหม่เพื่อใช้อ่านผลต่อไป ถ้ายังไม่

มีเชื้อราขึ้นต้องเก็บต่อไปจนครบ 1 เดือนจึงจะสรุปว่าใน specimen นั้นไม่มีเชื้อรา ถ้ามีเชื้อราขึ้นต้องนำไปศึกษาลักษณะโคโลนีและลักษณะจุลสัณฐานเพื่อแยก species

### Histopathology

การตรวจทางพยาธิวิทยาโดยนำ nail plate หรือ nail biopsy มาย้อมและตรวจเหมือนชิ้นเนื้อทั่วไป สามารถเห็นเชื้อได้ง่ายและบอกได้แน่นอนว่าเชื้อนั้นเป็นเชื้อก่อโรคหรือเชื้อปนเปื้อน

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจ

1. nail clipping วิธีนี้สามารถตรวจการติดเชื้อแบบDSO
2. nail biopsy

เมื่อได้สิ่งส่งตรวจแล้วถ้าเป็นแผ่นเล็บต้องนำไปทำให้อ่อนตัวก่อนที่จะนำไปย้อมตามวิธีพยาธิวิทยาเนื่องจากเล็บเป็นเคอราตินที่แข็ง

วิธีการเตรียมแผ่นเล็บมีหลายวิธี

1. Heller's method Macleod and Muende (1946) ได้เป็นผู้ค้นพบการเตรียมแผ่นเล็บวิธีนี้ โดย fixed แผ่นเล็บหรือชิ้นเนื้อใน Mueller's solution 2-3วัน หลังจากนั้นนำไป decalcification ด้วย nitric acid เป็นเวลา 4-6 วันแล้วนำไปแช่ใน celloidium (Sagher, 1948)

2. Chitin softening solution

ส่วนประกอบ

Mercuric chloride

Chromic acid

Nitric acid

95% alcohol

water

นำแผ่นเล็บที่ได้มาแช่ในน้ำยานี้เป็นเวลาสองวัน หลังจากเตรียมแผ่นเล็บเรียบร้อยแล้วจะนำไปย้อมสีเหมือนการย้อมชิ้นเนื้อทั่วไป สีย้อมที่สามารถย้อมให้เห็นจะย้อมให้เห็นเชื้อราได้มีหลายชนิดด้วยกันคือ Hematoxyline - eosin, polychrome methylene blue, toluidine blue, van Gieson's stain, Gram's

stain, Weigert's stain, Giemsa's stain, Periodic acid Schiff stain (PAS) สีแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป แต่ที่นิยมใช้หาเชื้อราคือ PAS stain (Sagher, 1948)

นอกจากช่วยในการวินิจฉัยแล้ว การตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยายังสามารถบอกชนิดของเชื้อราได้ว่าเป็นสายราหรือยีสต์เซลล์ ซึ่งมีประโยชน์ในการวางแผนการรักษา

#### Immunohistochemistry and flow cytometry

ทั้งสองวิธีเป็นวิธีใหม่ มีใช้แต่ในห้องทดลองเท่านั้นเพราะเป็นวิธีที่ยุ่งยากมีค่าใช้จ่ายที่สูงในการตรวจหาเชื้อราที่เล็บ

#### Immunohistochemistry

เป็นการใช้ antibody ต่อเชื้อราที่ติดกับสารเรืองแสงแล้วนำมาย้อมในชิ้นเนื้อ ถ้าชิ้นเนื้อนั้นมีเชื้อราต่อ antibody นั้นอยู่ก็จะให้เรืองแสงออกมา (Vincent, 1994)

#### Flow cytometry

เป็นอีกวิธีหนึ่งที่พิสูจน์ได้ว่าเล็บนั้นติดเชื้อราหรือไม่ วิธีการนำ nail plate มาละลายใน Tween 40 แล้วย้อมด้วย fluorescein isothiocyanate เพื่อ label protein บนผนังของเชื้อราและใช้ propidium iodide label nucleic แล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง flow cytometry ซึ่งสามารถจะแยก protein และ DNA (Vincent, 1994)