

การตรวจทางจุลภาคพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

Basic Microscopic Examination in Microbiology Laboratory

ศรินทร์ สมรูป*

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

การตรวจทางจุลภาคพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานั้น อาศัยเทคนิคการย้อมสีและการตรวจดูสด เทคนิคที่นิยมใช้ทั่วไป ได้แก่ Gram stain, Acid fast stain, Modified acid fast stain, Wright stain, India ink preparation และ KOH preparation ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ ให้ผลเร็วและมีความจำเพาะค่อนข้างสูง สามารถให้ข้อมูลเชื้อก่อโรคเบื้องต้นเพื่อการวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค ใช้เป็นแนวทางในการเลือกยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาก่อนจะทราบชนิดของเชื้อที่แน่นอนด้วยการเพาะเชื้อ หรือการตรวจทางซีโร โลยีและเทคนิคระดับโมเลกุล ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก แม้ว่าการตรวจทางจุลภาคพื้นฐานจะมีข้อจำกัดในการแยกชนิดของเชื้อ และมีความไวต่ำ แต่ถือเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญยิ่งต่อการเริ่มต้นในการรักษาผู้ป่วยเพื่อลดความรุนแรงของโรคและอัตราการเสียชีวิต

คำสำคัญ : Gram stain, Acid fast stain, Wright stain, India ink preparation, KOH preparation

Abstract

Basic microscopic examination in microbiology laboratory consists of two major principles: staining and wet preparation techniques. These techniques including Gram stain, Acid fast stain, Modified acid fast stain, Wright stain, India ink preparation and KOH preparation are the most simple and inexpensive techniques with rather high specificity for the rapid presumptive diagnosis and provide important data for the patient's treatment and prognosis. It is useful as guideline in selecting appropriate antimicrobial therapy before obtaining microorganism identification using culture or serology and molecular techniques, which could not available in small laboratory. Although, basic microscopic examinations are not able to identify into species level and provide a poor sensitivity, but they have a significant impact on initiate effective therapy to reduce the morbidity and mortality.

Keywords: Gram stain, Acid fast stain, Wright stain, India ink preparation, KOH preparation

*ผู้รับผิดชอบบทความ : s_somroop@yahoo.com

1. บทนำ

การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาต้องอาศัยวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อและบอกข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อก่อโรคได้ ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และให้ผลเร็ว ซึ่งโดยทั่วไปใช้วิธีการตรวจทางจุลภาค (microscopic examination) ได้แก่ Gram stain, Acid fast stain, Modified acid fast stain, Wright stain, India ink preparation และ KOH preparation ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีความจำเพาะค่อนข้างสูง และมีประโยชน์ต่อแพทย์เพื่อใช้เป็นแนวทางการเลือกยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย อย่างไรก็ตามความไวของเทคนิคดังกล่าวนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณภาพและปริมาณของตัวอย่างตรวจ การนำส่งและการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างตรวจ สีย้อมและเทคนิคการย้อมสี รวมทั้งความรู้และประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานด้วย

2. Gram stain

ใช้เพื่อศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อ การใช้เทคนิคนี้ทำให้จำแนกเชื้อได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะความแตกต่างของผนังเซลล์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยสายเปปติโดไกลแคนที่สานเป็นร่างแหมากถึง 40-80% ทำให้ทนต่อการล้างสี (decolorization) ขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีเปปติโดไกลแคนเพียง 5-10% และมีชั้น outer membrane ซึ่งมีไขมันเป็นส่วนประกอบปริมาณมาก สีจึงถูกชะล้างออกไปได้ง่าย [1] เมื่อย้อมด้วยสี crystal violet (primary stain) เชื้อทุกชนิดจะติดสีม่วงน้ำเงิน และเมื่อย้อมด้วย Gram iodine ซึ่งเป็น mordant จะไปทำปฏิกิริยา

กับสี crystal violet กลายเป็น insoluble crystal violet-iodine complex ทำให้สีย้อมยึดติดกับเซลล์ดียิ่งขึ้น หลังจากนั้นทำการล้างสีด้วยสาร decolorizer (95% ethyl alcohol) ไขมันที่มีปริมาณมากในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะละลายเกิดรูที่มีขนาดใหญ่ขึ้น สีจึงถูกล้างออกจากเซลล์ได้ง่ายทำให้เซลล์ไม่มีสี ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเปปติโดไกลแคนหนาและมีไขมันน้อย จะทนต่อการล้างสี เมื่อย้อมทับด้วย safranin O (counterstain) จะทำให้เซลล์ที่ยังไม่มีสีติดสีแดง ผลจากการย้อม Gram stain เชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะย้อมติดสีแดง ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงน้ำเงิน การตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า ดูลักษณะการติดสี รูปร่าง (กลม, cocci; ท่อน, bacilli/rods; คู่, diplococci; กิ่งกลมกิ่งท่อน, coccobacilli) และลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ (กลุ่ม, cluster; สาย, chain; คู่, pair; ตัวอักษรจีน, Chinese letter) การตรวจผลให้ดูทั้งเซลล์เชื้อจุลชีพและเซลล์ร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยแยกชนิดเป็น polymorphonuclear cell และ mononuclear cell ซึ่งช่วยบ่งชี้ถึงการติดเชื้อในผู้ป่วย รวมทั้งปริมาณของเซลล์ที่ตรวจพบจะช่วยในการพยากรณ์โรคและติดตามผลการรักษาของผู้ป่วยได้ Gram stain เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ให้ข้อมูลเชื้อก่อโรคที่รวดเร็ว ทำให้เลือกยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาได้ทันที ลดความรุนแรงของโรคและอัตราการเสียชีวิต และมีประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยเชื้อที่เพาะเลี้ยงยุ่งยากในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น *Campylobacter* ซึ่งเป็น Gram negative curved rod, gull wing appearance ที่ก่อโรคอุจจาระร่วงอย่างเฉียบพลันในผู้ป่วยเด็ก แต่ต้องใช้สี 0.3% carbol fuchsin เป็น counterstain แทน safranin O จึงจะทำให้เห็นรูปร่าง

เซลล์ชัดเจนขึ้น [2] อย่างไรก็ตาม Gram stain อาจทำให้เกิดการแปลผลผิดพลาดจากเทคนิคการเตรียมสเมียร์ โดยการเตรียมสเมียร์ที่หนาหรือบางเกินไปจะส่งผลถึงการย้อมสีผิดพลาดได้ โดยเฉพาะขั้นตอนการล้างสี เทคนิคการย้อมสี สเมียร์ที่หนาเกินไปแล้วล้างสีด้วยเวลาที่เท่ากับสเมียร์บาง อาจทำให้อ่านผลผิดพลาด เช่น แบคทีเรียแกรมลบที่เตรียม สเมียร์หนาเกินไป อาจอ่านผลได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นต้น นอกจากนี้การที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพมาก่อน การใช้เทคนิคนี้อาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ หรืออาจทำให้เห็นรูปร่างและการติดสีของเซลล์ที่ผิดปกติไป เช่น แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งอาจพบแบบ filamentous หรือมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) หรือการใช้ยากลุ่มที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น β -lactams หรือ glycopeptides โดยเฉพาะในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอาจทำให้ย้อมแล้วได้ผลเป็น Gram negative ได้ [3]

3. Acid fast stain และ Modified-acid fast stain

เชื้อก่อโรคบางชนิด ได้แก่ *Mycobacterium*, *Nocardia* และ *Rhodococcus* มีผนังเซลล์ที่มีปริมาณไขมันสูง โดยเฉพาะ mycolic acid ทำให้ย้อม Gram stain ไม่ติดสี หรือติดสีไม่สม่ำเสมอ จึงต้องอาศัยเทคนิคการย้อมสีซึ่งต้องอาศัยความร้อนและการเติมสาร phenol ในสีย้อมที่เป็น primary stain เพื่อช่วยให้สีย้อมแทรกผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น และเชื้อมีผนังเมื่อย้อมสีติดแล้วจะล้างสีออกยากเช่นกัน จึงต้องล้างสีด้วยกรดแอลกอฮอล์ (3% HCl in 95% ethyl alcohol หรือ 25% H_2SO_4 in distilled water) จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า acid fast stain ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป จะมีการย้อมสีในขั้นตอนแรก

ที่แตกต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ Ziehl-Neelsen technique (hot staining) หรือ Kinyoun technique (cold staining) โดย Ziehl-Neelsen technique ขั้นตอนการย้อมด้วยสี carbol fuchsin (primary stain) ซึ่งมีความเข้มข้นของสีและ phenol น้อย จึงต้องใช้ความร้อน โดยนำไปอังบนเปลวไฟให้พออุ่นแต่ห้ามเดือดและแห้ง แต่ Kinyoun technique ไม่จำเป็นต้องใช้ความร้อนเนื่องจากใช้สีย้อมที่มีความเข้มข้นของสีและ phenol มากขึ้น ขั้นตอนนี้เซลล์ทุกชนิดจะติดสีแดง จากนั้นรอให้สเมียร์เย็นลงแล้วจึงทำการล้างสีด้วยกรดแอลกอฮอล์จนแทบไม่มีสีแดงเหลือติดอยู่ ซึ่งจะล้างสีในเซลล์ชนิดอื่นๆ ออกจนหมด ยกเว้น *Mycobacterium* เมื่อย้อมทับด้วยสี methylene blue (counterstain) เซลล์อื่นๆ ที่ไม่มีสีจะติดสีน้ำเงิน ขณะที่ *Mycobacterium* ยังคงติดสีแดง เรียกว่า acid-fast bacilli (AFB) ส่วน *Nocardia* และ *Rhodococcus* นั้นไม่ทนต่อการล้างสีด้วยกรดความเข้มข้นสูง แต่จะทนต่อการล้างสีด้วยกรดแอลกอฮอล์ชนิดเจือจางแทน (1% H_2SO_4 in 95% ethyl alcohol) จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า modified acid fast stain ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของโครงสร้าง mycolic acid โดย *Mycobacterium* เป็นกรดไขมันชนิดที่มีสายข้างยาว (branched chain-fatty acid) ประกอบด้วยคาร์บอน 60-90 อะตอม ขณะที่ *Nocardia* และ *Rhodococcus* นั้นเป็นกรดไขมันที่มีสายข้างสั้นกว่า ประกอบด้วยคาร์บอน 44-60 และ 30-66 อะตอม ตามลำดับ [4,5] ผลของการตรวจด้วย modified acid fast stain เชื้อ *Nocardia* จะพบลักษณะ branching filamentous ส่วน *Rhodococcus* จะพบลักษณะทั้งแบบ intracellular หรือ extracellular coccobacilli หรืออาจพบลักษณะแบบ pleomorphic การตรวจผล AFB หรือ modified AFB ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ด้วย

กำลังขยาย 1,000 เท่า ให้เลื่อนตรวจแต่ละวงกลิ้งวนไปตามแนวนอนไม่ให้ทับซ้อนแนวเดิมจนทั่วสเมียร์ให้ได้ประมาณ 100-150 วงกลิ้งวน การตรวจพบเชื้อ AFB หรือ modified AFB นี้สามารถบ่งถึงเชื้อก่อโรคที่ค่อนข้างจำเพาะ ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และให้ผลเร็วเมื่อเทียบกับการเพาะเชื้อหรือการตรวจด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล มีประโยชน์ช่วยในการตรวจคัดกรองเบื้องต้นผู้ที่สงสัยว่าติดเชื้อ เพื่อเริ่มต้นให้การรักษารักษาการติดตามและประเมินผลการรักษา รวมทั้งการควบคุมโรคเพื่อป้องกันการแพร่ไปสู่บุคคลอื่นด้วย อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดของความไวในการตรวจด้วยเทคนิคนี้ ซึ่งขึ้นกับคุณภาพของตัวอย่างตรวจ การเตรียมตัวอย่างตรวจ การเตรียมสเมียร์ สีย้อม และเทคนิคการย้อมสี รวมทั้งจำนวนเชื้อในผู้ป่วย ตัวอย่างตรวจส่วนใหญ่เป็นเสมหะซึ่งใช้ Gram stain ช่วยประเมินคุณภาพได้ โดยต้องมีอัตราส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อเซลล์เชื้อ $\geq 10:1$ การเตรียมตัวอย่างตรวจโดยเติมสารเคมีบางชนิดลงไป ในเสมหะก่อนนำไปเตรียมสเมียร์ เช่น N-acetyl-L-cysteine (NALC) หรือ chitin เพื่อย่อยสลายเสมหะ (liquefaction) และทำให้เชื้อกระจายตัวไม่ถูกหุ้มอยู่ในเยื่อเมือก หรือใช้ 5.25% sodium hypochlorite (Clorox) ซึ่งหาได้ทั่วไป ราคาถูก แต่ให้ความไวของการตรวจด้วย Ziehl-Neelsen technique ใกล้เคียงกับการใช้ NALC และ chitin ซึ่งสูงกว่าการเตรียมสเมียร์จากเสมหะโดยตรง [6] การเตรียมสเมียร์ที่เหมาะสมด้วยการใช้ปลายแท่งไม้ที่หักแล้วป้ายเนื้อเสมหะที่มีลักษณะเป็นมูกเหนียว สีขุ่นเข้มคล้ายหนองหรือมีเลือดปน สเมียร์ตรงกลางสไลด์แบบวนสุมออกเป็นรูปก้นหอยเล็กซ้ำหลายๆ อัน (repeated coil pattern) ขนาด 2×3 เซนติเมตร เพื่อให้เซลล์ต่างๆ กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วสเมียร์ จะทำให้มีโอกาสในการ

ตรวจพบเชื้อมากขึ้น [7] การปรับความเข้มข้นของสี carbol fuchsin ให้มากขึ้น จาก 0.3% เป็น 1.0% ช่วยให้ความไวในการตรวจด้วย Ziehl-Neelsen technique สูงขึ้นด้วย [8] การล้างสีมากหรือน้อยเกินไปอาจทำให้แปลผลผิดพลาด รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการตรวจผลของแต่ละตัวอย่าง ควรใช้เวลาอย่างน้อย 5 นาที หากไม่พบเชื้อต้องตรวจจนทั่วสเมียร์เพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอม (false negative) การตรวจด้วยเทคนิคนี้มักมีข้อจำกัดในผู้ป่วยที่มีปริมาณเชื้อก่อโรคน้อย (scanty) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการย้อมโดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์ ที่นิยมใช้ได้แก่ auramine O-rhodamine B โดยทำการย้อมสีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยการนำสีย้อมไปอุ่นก่อน เรียกเทคนิคนี้ว่า modified fluorescent method และย้อมทับด้วย potassium permanganate (counterstain) ผลการย้อมด้วยเทคนิคนี้เชื้อ AFB จะติดสีส้มบนพื้นหลังสีดำ ทำให้ตรวจพบเชื้อได้ง่าย และมีความไวสูงกว่า Ziehl-Neelsen techniques [9] อย่างไรก็ตามต้องระวังการเกิดผลบวกปลอม (false positive) และต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent microscope ในการตรวจผล ซึ่งใช้ต้นทุนสูง จึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีสเมียร์จำนวนมากต่อวัน และเนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อก่อโรคอันตราย การเตรียมสเมียร์และการย้อมสีควรทำด้วยความระมัดระวังและปฏิบัติใน biosafety cabinet class II

4. Wright stain

ใช้ศึกษาเชื้อราโดยเฉพาะ opportunistic fungi ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำ (HIV-infected patients) ที่สำคัญได้แก่ *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffei* ซึ่งเป็น dimorphic fungi ที่เมื่ออยู่ใน

ตัวอย่างตรวจจะอยู่ในรูป yeast form และ *Pneumocystis jiroveci* รวมทั้งการตรวจหาเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น Herpes simplex ด้วย Wright stain ถือเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ช่วยในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคเบื้องต้น และช่วยสนับสนุนผลการยืนยันด้วยวิธีข้างต้น ซึ่งอาจพบติดสีได้ไม่ดี ทำให้เห็นเซลล์ไม่ชัดเจนและอาจเกิดผลลบปลอมได้ รวมทั้งสามารถย้อมติดโครงสร้างที่จำเพาะของเชื้อได้ เช่น intracystic bodies จำนวน 1-8 เซลล์ ในระยะ cyst ของ *P. jiroveci* ส่วน *H. capsulatum* จะพบลักษณะ intracellular budding yeast cell ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เชื้อ *P. marneffei* จะพบลักษณะ binary fission yeast รูปร่างกลมหรือรี รวมเป็นกลุ่มอยู่ในเซลล์ histiocyte หรือพบกระจายตามเนื้อเยื่อ อาจพบลักษณะที่เป็น binary fission ได้ ถ้าติดเชื้อไวรัส Herpes simplex จะพบเซลล์ที่มีลักษณะ multinucleated giant cell เทคนิค Wright stain นี้สามารถใช้ย้อมในตัวอย่างตรวจที่หลากหลาย ขึ้นกับพยาธิสภาพของโรค เช่น หนองที่เก็บจากผิวหนัง tissue biopsy เสมหะ bronchoalveolar lavage และเลือด เป็นต้น แต่ความไวในการตรวจนั้นขึ้นกับคุณภาพของตัวอย่างตรวจและตำแหน่งที่เก็บ เช่น การตรวจหาเชื้อ *H. capsulatum* ในไขกระดูกมักมีโอกาพบเชื้อสูง [10] รวมทั้งขึ้นกับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ความรู้ การสังเกต และประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานด้วย

5. India ink preparation

เพื่อตรวจหาเซลล์ยีสต์รูปกลมที่สร้างแคปซูล (encapsulated yeast cells) โดยเฉพาะจากน้ำไขสันหลัง ซึ่งเป็น presumptive diagnosis ของ Cryptococcal meningitis หลักการอาศัยคุณสมบัติ

ของโครงสร้างแคปซูล ซึ่งเป็นชั้นของโพลีแซคคาไรด์ที่เรียงตัวกันอย่างหนาแน่นและไม่มีประจุ และเป็นโมเลกุลที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง (>95%) จึงต้องหลีกเลี่ยงการใช้ความร้อน เนื่องจากจะทำลายโครงสร้างของแคปซูล ดังนั้นจึงใช้การย้อมสีแบบ negative staining ด้วยสี India ink ซึ่งจะย้อมติดพื้นหลังโดยที่แคปซูลไม่ถูกย้อม จึงเห็นลักษณะเป็นช่องว่างใสๆ (clear zone) ล้อมรอบตัวเซลล์ของเชื้อ โดยใช้ตะกอนที่ได้จากการปั่นที่ 1,500 x g นาน 15 นาที ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความไวในการตรวจ หยดลงบนสไลด์แก้วข้างหยดสี India ink ปิดทับด้วย cover slip นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จะเห็นเซลล์ยีสต์รูปร่างกลม ผิวเซลล์หนา และมีสองชั้น มีแคปซูลล้อมรอบเซลล์โดยจะเห็นเป็นช่องว่างและไม่ติดสี ขนาดของแคปซูลอาจแตกต่างกันหรือไม่สร้างเลยก็ได้ อาจพบลักษณะ budding round yeast หรือ pseudohyphae ให้รายงานผลตามลักษณะที่ตรวจพบ เช่น encapsulated budding yeast with pseudohyphae เป็นต้น การวินิจฉัย Cryptococcal meningitis โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ จำเป็นต้องอาศัยการตรวจแบบ rapid test ด้วยวิธี India ink preparation ซึ่งมีความจำเพาะค่อนข้างสูง ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ ให้ผลเร็ว และสามารถบ่งชี้เชื้อก่อโรคในเบื้องต้นได้ แต่ความไวค่อนข้างต่ำ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจหา capsular antigen ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป agglutination test ซึ่งอาจเกิดผลลบปลอมที่เกิดจากมีระดับของแอนติเจนในตัวอย่างตรวจต่ำได้ [11] การยืนยันผลการวินิจฉัยต้องอาศัยการเพาะเชื้อบน Sabouraud dextrose agar และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อซึ่งต้องอาศัยระยะเวลา 3-7 วัน แม้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง และบอกชนิดของเชื้อ

ก่อโรคที่แน่นอนได้ แต่มีความยุ่งยากและใช้เวลานาน ทำให้มีผลต่อการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย

6. KOH preparation

เพื่อตรวจหาเชื้อราในตัวอย่างตรวจ เนื่องจากน้ำยา KOH (potassium hydroxide) มีฤทธิ์เป็นเบสแก่ และสามารถย่อยสลายเคอราติน และเศษเซลล์ร่างกายต่างๆ ในตัวอย่างตรวจ แต่ไม่ย่อยสลายเชื้อรา เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์มีส่วนประกอบที่สำคัญเป็นโพลิเมอร์ของ chitin และ glucan ซึ่งประสานกันอยู่ในรูปตาข่ายที่มีความแข็งแรง น้ำยา KOH จะทำให้ตัวอย่างตรวจที่เตรียมใสขึ้น ทำให้เห็นตัวเชื้อชัดเจนและง่ายขึ้นโดยที่โครงสร้างของเชื้อราไม่มีการเปลี่ยนแปลง วิธีการตรวจหยดน้ำยา 10% KOH ลงผสมกับตัวอย่างตรวจ ปิดทับด้วย cover slip ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาทีหรือจนกระทั่งตัวอย่างที่เตรียมใส อาจเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงในน้ำยา KOH หรือนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ หรือปรับความเข้มข้น KOH ให้สูงขึ้น (30%) เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลล์ร่างกายให้เร็วขึ้น [12] หากตัวอย่างตรวจใสแล้ว ควรนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทันที ไม่ควรทิ้งนานจนเกินไป เพราะจะทำให้เชื้อในตัวอย่างถูกย่อยสลายได้เช่นกัน ทำให้เห็นโครงสร้างเชื้อไม่ชัดเจนส่งผลให้วินิจฉัยเชื้อก่อโรคผิดพลาด

การตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ควรลดความเข้มของแสงลงเพื่อให้เกิด contrast ระหว่างโครงสร้างของเชื้อและสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ ในตัวอย่างมากขึ้น ทำให้เห็นโครงสร้างของเชื้อชัดเจนยิ่งขึ้น โดยเริ่มตรวจหาอย่างคร่าวๆ ด้วยกำลังขยาย 100 เท่าก่อน เมื่อพบบริเวณที่เชื้อมีโครงสร้างที่

สมบูรณ์หรือจำเพาะแล้วค่อยใช้กำลังขยาย 400 เท่า ตรวจดูลักษณะ ขนาด และสีของสายรา รูปร่าง สี และลักษณะของ macroconidia และ microconidia ซึ่งเชื้อบางชนิดจะมีลักษณะค่อนข้างจำเพาะ สามารถวินิจฉัยชนิดของเชื้อก่อโรคได้ โดยไม่จำเป็นต้องรอผลจากการเพาะเชื้อ ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 3-7 วัน เนื่องจากน้ำยา KOH มีลักษณะใสและโครงสร้างของเชื้อก็ใส ทำให้ดูลักษณะเชื้อราค่อนข้างยาก จึงมีการหยดสีลงไปเพื่อช่วยย้อมโครงสร้างของเชื้อให้เห็นชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่ง Cohen ได้รายงานเทคนิคนี้เป็นครั้งแรก โดยใช้ 10% Parker Blue Black Super Quink ink หรือ Parker Permanent Black Super Quink ink [13] การตรวจหาเชื้อด้วย KOH preparation เป็นวิธีที่ง่าย ต้นทุนต่ำ ให้ผลเร็ว และสามารถระบุชนิดของเชื้อก่อโรคในเบื้องต้นได้เพื่อให้การรักษาได้ถูกต้อง โดยไม่ต้องรอผลการเพาะเชื้อและการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อ

7. สรุป

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั้งด้วยการตรวจดูสดและการย้อมสี เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ ให้ผลที่รวดเร็วและค่อนข้างจำเพาะ ให้ข้อมูลของเชื้อก่อโรคเบื้องต้นแก่แพทย์เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาที่เหมาะสมและอย่างทันทั่วถึงก่อนที่จะทราบชนิดของเชื้อที่แน่นอน อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้เทคนิคต่างๆ นั้นขึ้นกับชนิดของเชื้อก่อโรคที่ต้องการตรวจและตัวอย่างตรวจ และเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เหล่านี้ยังมีความสำคัญและมีคุณค่าอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องมีความรู้และเข้าใจในหลักการเบื้องต้น วิธีการ และข้อ

ควรระวังต่างๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการทำงานต่อไป

7. เอกสารอ้างอิง

- [1] กัทรชัย กิริติสิน, 2549, ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์, หจก. วี.เจ.พรินติ้ง, กรุงเทพฯ, 703 น.
- [2] Mshana, E.S, Joloba, L.M, Kakooza A. and Kaddu-Mulindwa, D., 2010, Role of microscopic examination of stool specimens in the diagnosis of *Campylobacter* infection from children with acute diarrhea in Kampala, Uganda, *Tanzan. J. Health Res.* 12: 100-103.
- [3] Nagata, K., Mino, H. and Yoshida, S., 2010, Usefulness and limit of Gram staining smear examination, *Rinsho Byori.* 58: 490-497.
- [4] Minnikin, E.D., Minnikin, M.S., Parlett, H.J., Goodfellow, M. and Magnusson, M., 1984, Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*, *Arch. Microbiol.* 139: 225-231.
- [5] Tsukamura, M. and Yano, I., 1985, *Rhodococcus sputi* sp. nov., norn. rev., and *Rhodococcus aurantiacus* sp. nov., norn. rev., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 364-368.
- [6] Farnia, P., Mohammadi, F., Zarifi, Z., Tabatabaei, D.J., Ganavi, J., Ghazisaeedi, K., Farnia, P.K., Gheydi, M., Bahadori, M., Masjedi, M.R. and Velayati, A.A., 2002, Improving sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum: Use of chitin in mucus digestion, *J. Clin. Microbiol.* 50: 508-511.
- [7] Training manual for fluorescence-based AFB microscopy, Module 7 Smear preparation and fluorescence-based staining method. WHO-CDCRIT-IUATLD-APHL in 2004, Available Source: URL:http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/programs/tb/documents/LED_training_manual.pdf.
- [8] Selvakumar, N., Rahman, F., Narayanan, R.P., Rajasekaran, S. and Frieden, R.T., 2002, Inefficiency of 0.3% carbol fuchsin in Ziehl-Neelsen staining for detecting acid-fast bacilli, *J. Clin. Microbiol.* 40: 3041-3043.
- [9] Annam, V., Kulkarni, H.M. and Puranik, B.R., 2009, Comparison of the modified fluorescent method and conventional Ziehl-Neelsen method in the detection of acid fast bacilli in lymph node aspirates, *CytoJournal* 6: 13.
- [10] บุญช่วย เอี่ยมโกศลภ, สว่าง ไชยศักดิ์, อัญญา ถาวรวัน, ปวีณา ก้องสนั่น, เลิศพงษ์ นวลสนิทชัชนาม และชาญ กองวิสัยสุข, 2549, การวินิจฉัยจุลชีพด้วยโอกาสทางห้องปฏิบัติการ, สถาบันบำราศนราดูร, กรุงเทพฯ, 128 น.
- [11] Dominic, S.M.R., Prashanth, V.H., Shenoy, S. and Baliga S., 2009, Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis, *J. Lab. Physicians* 1(2): 67-68.

-
- [12] Ellis, H.D., 1999, Diagnosis of onychomycosis made simple, J. Am. Acad. Dermatol. 40: S3-8.
- [13] Cohen, M.M., 1954, Simple procedure for staining tinea versicolor (*M. furfur*) with fountain ink, J. Invest. Dermatol. 22: 9-10.