นิพนธ์ต้นฉบับ

อัตตปรากฏการณ์การอักเสบจากเชื้อรา : การศึกษาย้อนหลัง

เสาวณีย์ เย็นฤดี*
พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์*

Yenrudi S, Wannakrairot P. Autofluorescence of fungi : retrospective study as supplementary diagnosis to tissue fungi. Chula Med J 1984 Oct; 28 (10) : 1099–1108

Twenty two cases of tissue fungi were studied by fluorescent microscopy in routine Hematoxylin and eosin section. These fungi were Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Histoplasma, fungi in order Mucorales, and fungus causing chromoblastomycosis and mycetoma. All cases were previously diagnosed to be fungal infection by routine H&E staining. As well as PAS, GMS, Mayer's mucicarmine, and culture in 2 cases were performed to support the tissue diagnosis of mycosis. Four kinds of bacterial infections and three kinds of normal tissue commonly infected by the fungi were also studied by the same procedure. Five out of 7 cases of candidiasis, 4 out of 5 cases of aspergillosis, cryptococcosis, and histoplasmosis were all fluorescent. On the other hand, degenerated Candida and Aspergillus, chromoblastomycosis, phycomycosis, and mycetoma were not fluorescent, as well as all bacterial infections in the group studied by identical method. Autofluorescent of the back ground tissue was a pitfall in differential diagnosis from the fungal cells. However, its simplicity and rapidity of study were useful in diagnostic adjunct to tissue mycosis in the proper section.

* ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื้อเยื่อบางอย่างเปล่งแสงเรืองออกมาได้เอง เมื่อผ่านแสงอุลตราไวโอเลทคุณสมบัติชนิดนี้ของเนื้อเยื่อเรียกว่า ออโตฟลูออเรสเซนต์ เนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ ได้แก่สมอง renal convoluted tubules เนื้อเยื่ออีลาสติค แกรนุลของ mast cell และ เม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อที่ผ่านน้ำยารักษารูปและเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว จะมีออโตฟลูออเรสเซนต์มากขึ้น[1] ในปี ค.ศ. 1983 Mann ได้พบว่าเนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ จำนวน 6 ชนิด นำมาย้อมสีฮีมาท๊อกซิลิน–อีโอซีน แล้วศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ เชื้อราหลายชนิดได้แก่ Blastomyces, Cryptococcus, Candida, Aspergillus, Coccidioides และ Histoplasma บางราย เมื่อผ่านแสงอุลตราไวโอเลทจะให้แสงเรืองออกมาได้เอง ส่วนใหญ่จะเริ่มเห็นได้เมื่อใช้กำลังขยายตั้งแต่ 100 เท่าขึ้นไปและบางกรณีเห็นได้เมื่อใช้กำลังขยาย 40 เท่า[2]

ผู้รายงานได้รวบรวมชิ้นเนื้อ ที่ได้จากการผ่าตัด และตรวจศพทุกรายได้รับการวินิจฉัยว่า มีการอักเสบจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ นำมาศึกษาย้อนหลังด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ เพื่อที่จะหาข้อมูลเพิ่มเติมว่า ในทางปฏิบัติแล้วการศึกษาเช่นนี้จะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยการอักเสบในเนื้อเยื่อ ที่เกิดจากเชื้อรามากเพียงใด

วัสดุและวิธีการ

ชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษา ประกอบด้วยเนื้อเยื่อกลุ่มต่าง ๆ 3 กลุ่ม กลุ่มแรกได้แก่เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบจากเชื้อราต่าง ๆ จำนวน 22 ราย และเป็นชิ้นเนื้อจากการผ่าตัด 18 ราย ชิ้นเนื้อจากการตรวจศพ 4 ราย รวบรวมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 จนถึง พ.ศ. 2526 กลุ่มที่สองประกอบด้วยเนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จำนวน 8 ราย และกลุ่มที่สามประกอบด้วยเนื้อเยื่อปกติจากสมอง ผิวหนังและปอด จำนวน 13 ราย อวัยวะทั้ง 3 ชนิด เป็นอวัยวะที่พบมีการอักเสบจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มแรก

เนื้อเยื่อทั้งหมด Fix ใน 10 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มาลิน ตัดและย้อมด้วยสีฮีมาท๊อกซิลิน-อีโอซีน เฉพาะเนื้อเยื่อกลุ่มแรกมีการย้อมพิเศษด้วยวิธี พิริออดิค เอซิดชิฟ โกเมอรี่ เมทินามีน ซิลเวอร์ และ มิวซิคาร์มีน เพื่อสนับสนุนการวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมีการเพาะเชื้อร่วมด้วย ในการอักเสบจากเชื้อ Aspergillus 2 ราย กลุ่มการอักเสบจากเชื้อรา ประกอบด้วย Candidiasis 7 ราย Aspergillosis 5 ราย Cryptococcosis 4 ราย Histoplasmosis 2 ราย Phycomycosis 2 ราย (Order Mucorales, unknown species) Chromoblastomycosis 1 ราย Mycetoma 1 ราย (unknown organism)

กลุ่มที่สอง การวินิจฉัยการอักเสบจากเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วยพยาธิสภาพการอักเสบ ที่พบโดยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ร่วมกับการเพาะเชื้อทุกราย เนื้อเยื่ออักเสบจากแบคทีเรียที่นำมาศึกษา ประกอบด้วยเนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อ Klebsiella spp. 2 ราย เนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อ Pseudomonas aeruginosa 2 ราย เนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อ E.coli 2 ราย และ เนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อ Staphylococcus aureus 2 ราย

กลุ่มที่สาม เป็นเนื้อเยื่อปกติ จากสมอง 5 ราย ผิวหนัง 4 ราย และปอด 4 ราย

ชิ้นเนื้อทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว นำมาศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้แผ่นกรองชนิดแรก (Exciting filter, B_2) ซึ่งให้แสงสีน้ำเงิน และแผ่นกรองชนิดหลัง สีเหลือง (Barrier filter, Y_{50}) การศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ใช้ศึกษาเฉพาะชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสีฮีมาท๊อก ซีลิน–อีโอซีน เนื่องจากการย้อม วิธีนี้เป็นการย้อมที่ทำเป็นประจำและเป็นหลักของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาอยู่แล้ว

ผลการศึกษา

Cryptococcus และ Histoplasma ทุกรายในการศึกษานี้ เปล่งแสงเรืองออกจากผนังเมื่อผ่านแสงอุลตราไวโอเลท (ดูรูปภาพประกอบ) Cryptococcus เห็นได้ตั้งแต่กำลังขยาย 100 เท่าขึ้นไป และเห็นได้ชัดเจนที่กำลังขยาย 200 และ 400 เท่า Histoplasma เห็นได้ชัดพอสมควรที่กำลังขยาย 400 เท่า สำหรับ Aspergillus มีการเรืองแสง 4 ราย จาก 5 ราย เห็นได้ที่กำลังขยาย 200 เท่า กำลังขยาย 400 เท่าเห็นได้ชัดเจนดี Candida พบมีการเรืองแสงจาก Organism 5 รายใน 7 ราย การเรืองแสงเห็นได้ดีพอสมควรที่กำลังขยาย 400 เท่า Mucorales ซึ่งไม่ทราบ species Chromoblastomycosis และ Mycetoma ไม่มีการเรืองแสง

สำหรับกลุ่มการอักเสบ จากเชื้อแบคทีเรียไม่พบมีการเรืองแสงจากแบคทีเรียชนิดใด ๆ ในกลุ่มที่นำมาศึกษา กลุ่มเนื้อเยื่อปกติ เนื้อเยื่อที่ให้แสงเรืองเมื่อศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ได้แก่ เนื้อเยื่อ Connective Tissue ใต้ผิวหนัง เยื่อหุ้มสมอง Alveolar Septae และเนื้อเยื่ออีลาสติคในผนังของเส้นเลือด โคนผมในชั้นใต้ผิวหนัง และ เม็ดเลือดแดง

วิจารณ์

โดยปกติ การวินิจฉัยเนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อรา จะวินิจฉัยโดยการพบเชื้อราในเนื้อเยื่อร่วมกับพยาธิสภาพ ที่เข้ากันได้กับการอักเสบจากเชื้อรา ขณะเดียวกันจะต้องมีการเพาะเชื้อ เพื่อสนับสนุนการวินิจฉัยที่แน่นอนในขั้นสุดท้าย

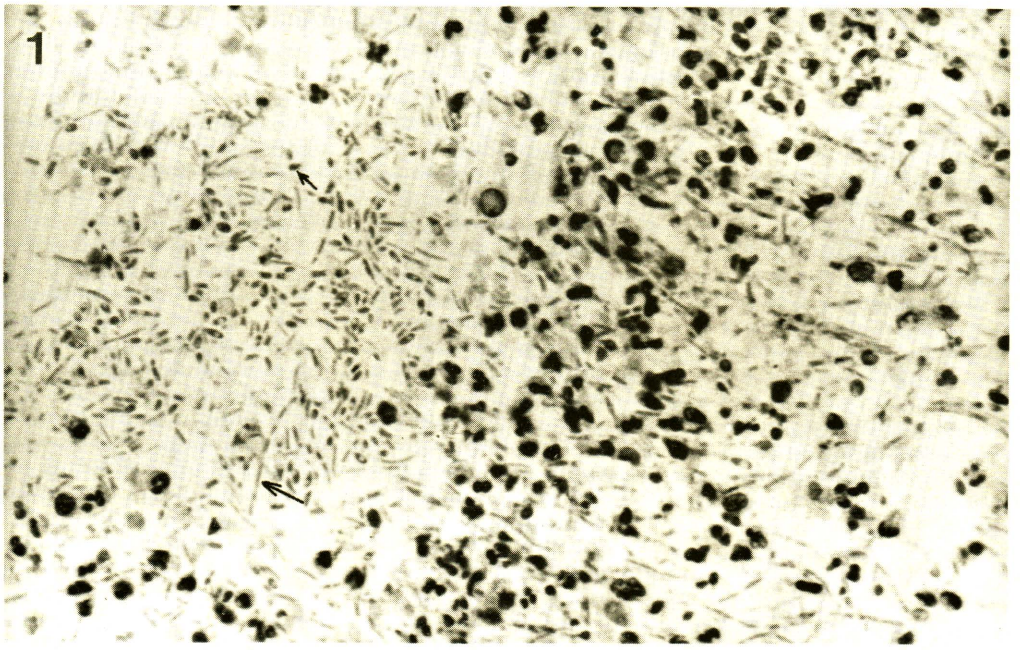
การเรืองแสงของเชื้อราชนิดต่าง ๆ ในการศึกษานี้ มีการเรืองแสงที่ให้ลักษณะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปกติบางชนิดดังเช่น Candida ซึ่งการเรืองแสงของ Hyphae และ Pseudohypuae คล้ายคลึงกับ Connective Tissue แต่เมื่อใช้กำลังขยายขนาด 400 เท่า พบว่ามีการเรืองแสงจากบริเวณผนังเท่านั้น และขณะเดียวกันมีการเรืองแสงของ Yeast Cells ร่วมด้วย Candida 2 รายที่ไม่มีการเรืองแสงเมื่อผ่านแสงอุลตราไวโอเลท จากการเปรียบเทียบการติดสีใน Section ที่ย้อมสีฮีมาท๊อกซิลิน–อีโอซีน พบว่า Organism เหล่านี้ติดสีชมพูทั้ง Yeast Cells, Hyphae และ Pseudohyphae ทั้งนี้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงไปในทางเสื่อมสลาย (Degeneration and necrosis) ของ Organism และเป็นผลให้คุณสมบัติในการเรืองแสงหมดไปด้วย สำหรับ Aspergillus และ Mucor การเรืองแสงพบใน Aspergillus เท่านั้น ลักษณะการเรืองแสงคล้ายคลึงกับ Hyphae และ Pseudohyphae ของ Candida แต่โดยทั่วไป Aspergillus มีขนาดใหญ่กว่า[3] พยาธิสภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของ Aspergillus และ Mucor บางครั้งไม่สามารถแยกจากกันได้ ดังเช่น Aspergillus 1 ราย ใน Section ที่ย้อมสีฮีมาท๊อกซิลิน–อีโอซีน ลักษณะผนังก็เห็นไม่ชัดเจนและ Brabching Hyphae ทำมุมกว้าง (รูปที่ 5) อันเป็นลักษณะค่อนไปทาง Mucor แต่ผลการเพาะเชื้อรายนี้สนับสนุนว่าเป็น Aspergillosis เช่นเดียวกับการศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ Aspergillus 1 ราย ที่ไม่มีการเรืองแสงนั้น การวินิจฉัยทำจากพยาธิสภาพที่พบในกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบ Broad Septate Hyphae และมี Branching Hyphae ซึ่งทำมุมแคบ และพุ่งไปในแนวเดียวกันอันเป็นลักษณะของ Aspergillus เชื้อราอักเสบรายนี้อาจเป็น Mucor แต่ก็ไม่สามารถจะสนับสนุนเหตุผลข้อนี้ได้ เนื่องจากไม่มีการเพาะเชื้อร่วมด้วย

Yeast Cells ของ Candida Histoplasma และ Cryptococci มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ซึ่งคล้ายคลึงกับการเรืองแสงของเม็ดเลือดแดง แต่ขนาดของ Yeast Cells ของ Candida ประมาณ 3–4 ไมครอนเล็กกว่าขนาดของเม็ดเลือดแดงมาก Histoplasma ก็เช่นเดียวกันมีขนาดเล็กมาก Cryptococci มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเม็ดเลือดแดง แต่จากลักษณะการกระจายตัวและตำแหน่งที่อยู่ในเนื้อเยื่อของ Cryptococci รวมทั้งขนาดซึ่งมีต่าง ๆ กันและมีการเรืองแสงที่พบเฉพาะขอบของเซลล์ของ Cryptococci ก็พอแยกจากลักษณะของเม็ด

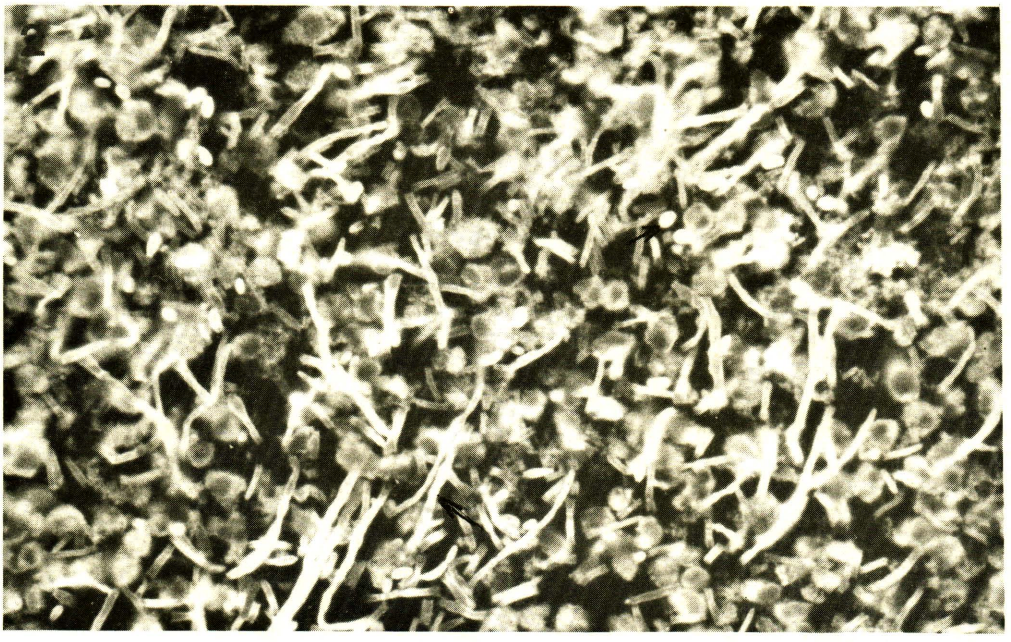
เลือดแดงได้ เชื้อราที่มีรูปไข่และขนาดเล็ก เช่น Yeast cells ของ Candida จะต้องแยกจากการเรืองแสงของแบคทีเรียบางชนิด เช่น Pseudomonas ในกลุ่ม Fluorescent ได้แก่ Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens และ Pseudomonas putida แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปล่งแสงเรืองเมื่อผ่านแสงอุลตราไวโอเลทที่ช่วงคลื่นสั้น ๆ (254 nm) เท่านั้น[4] โดยทั่วไปแล้วการเรืองแสงของเชื้อราชนิดที่มีออโตฟลูออเรสเซนต์ จะให้แสงเรืองออกจากบริเวณขอบของเซลล์เชื้อรา การสูญเสียคุณสมบัติข้อนี้จะเกิดขึ้นเมื่อ section เก็บไว้นาน และมีการเสื่อมสลายของเซลล์เชื้อรา และเมื่อชิ้นเนื้อ fix ไม่ได้พอเหมาะสำหรับ Histoplasma จะเรืองแสงเมื่ออยู่ในระยะ active เท่านั้น[2]

สรุป

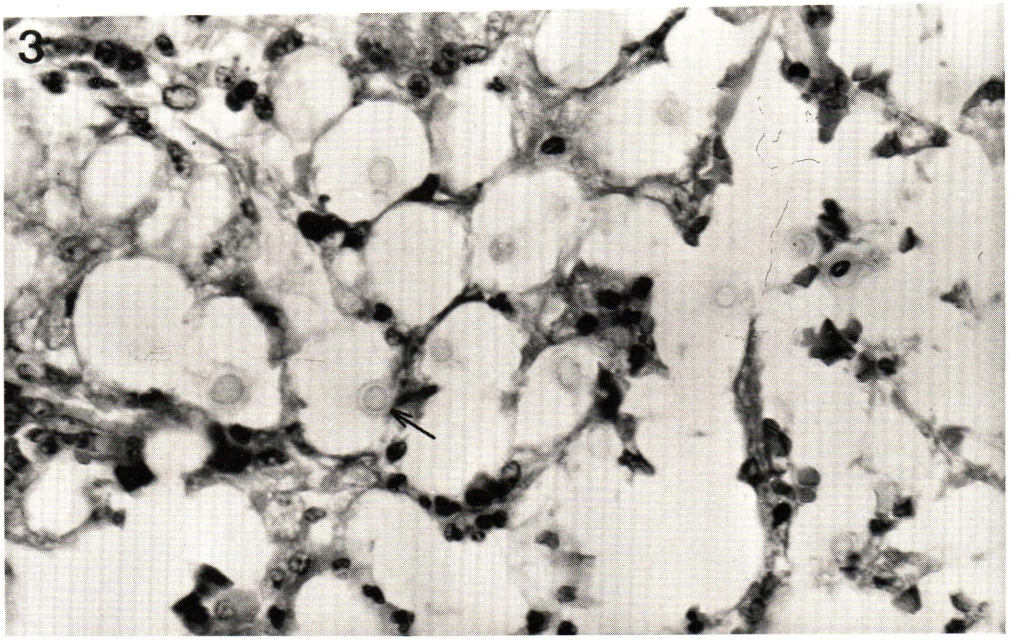
ผลการศึกษาย้อนหลัง ในเนื้อเยื่ออักเสบจากเชื้อรา 22 ราย จำนวน 7 ชนิด โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่ามีการเรืองแสงจากเชื้อราชนิด Candida 5 รายใน 7 ราย Aspergillus 4 ราย ใน 5 ราย Cryptococcus และ Histoplasma ทุกราย ในการศึกษาไม่พบมีการเรืองแสงจากเชื้อราชนิด Phycomycosis, Chromoblastomycosis และ mycetoma เนื้อเยื่อที่มีการเรืองแสงและให้ลักษณะคล้ายคลึงกับการเรืองแสงของเชื้อราบางชนิดได้แก่ เนื้อเยื่อ connective tissue และเม็ดเลือดแดง เชื้อราที่มีออโตฟลูออเรสเซนต์ จะเปล่งแสงเห็นได้ชัดเมื่อ section ที่นำมาศึกษาจะต้องใหม่พอ และไม่มีการเสื่อมสลายของเชื้อรา การศึกษานี้มีประโยชน์ในการสนับสนุนการวินิจฉัยเชื้อราได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องเสียเวลารอการย้อมพิเศษดังที่กล่าวมาแล้ว และเป็นประโยชน์ในการแยก Aspergillus ออกจาก Mucor ในกรณีที่ลักษณะจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์คล้ายคลึงกัน แต่วิธีการจะต้องมีอุปกรณ์ที่สำคัญคือกล้องฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาแพงมาก



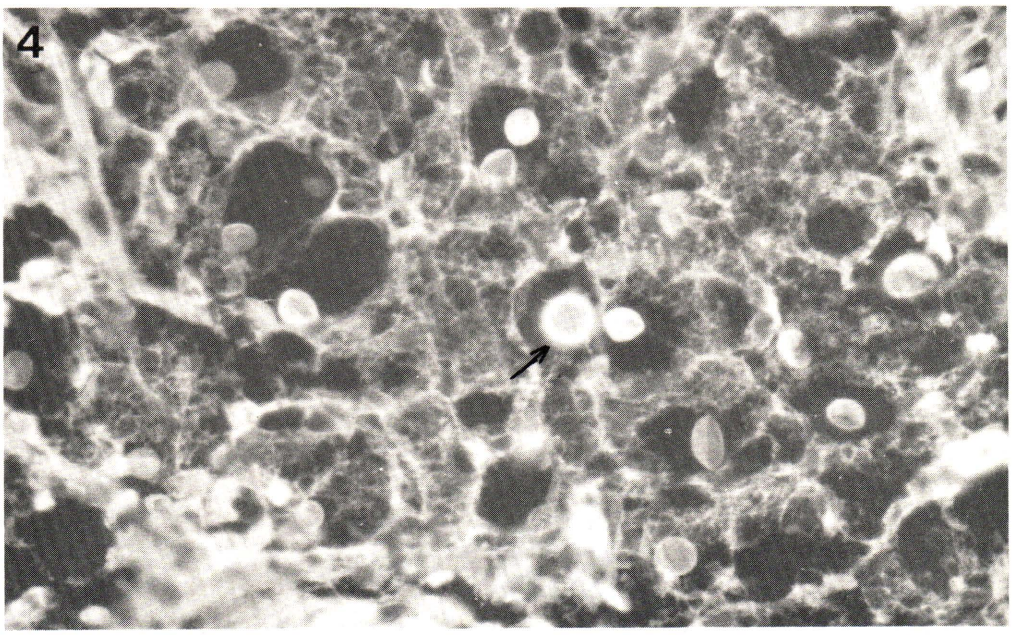
รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ Candida ประกอบด้วย Yeast (ลูกศรสั้น) และ Hyphae (ลูกศรยาว) H&E × 400



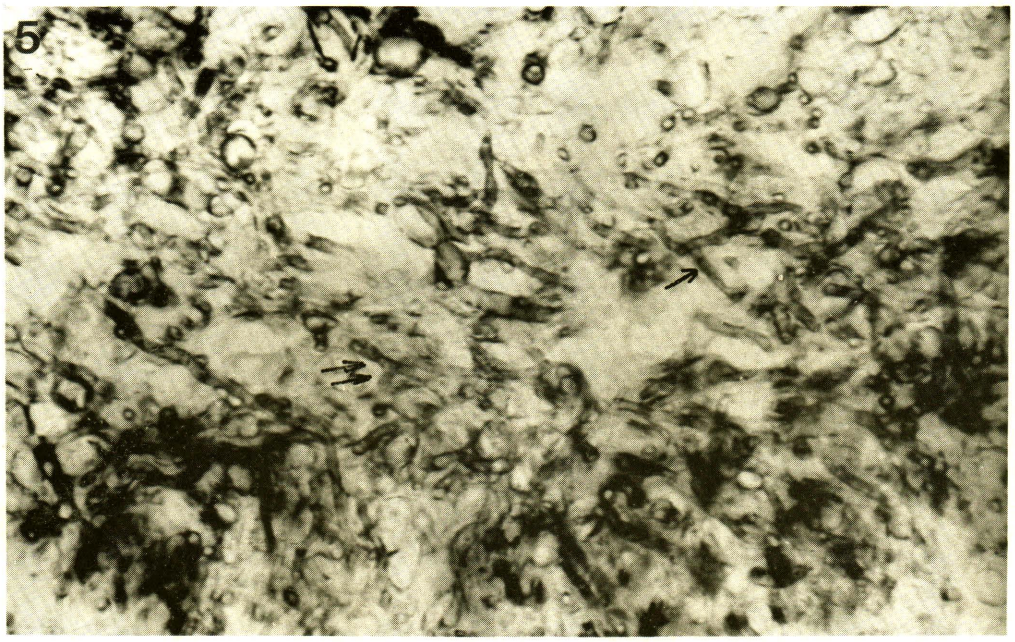
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ Candida ที่ศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ มีออโตฟลูออเรสเซนต์ จาก Yeast (ลูกศรสั้น) และ Pseudomycelia (ลูกศรยาว) × 400



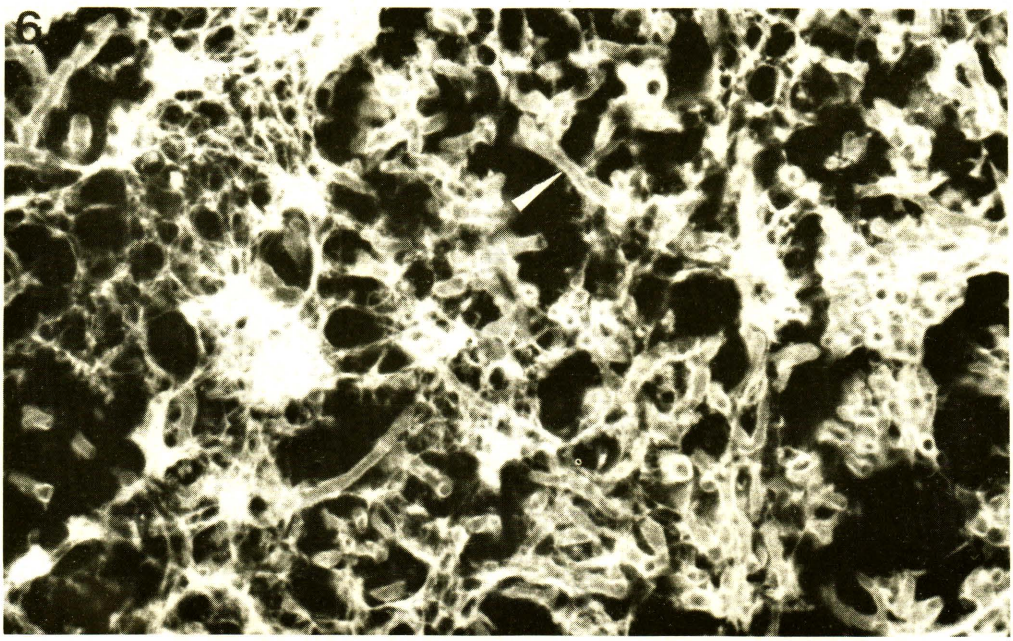
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ Cryptococci ในเนื้อเยื่อปอด (ลูกศร) H&E × 400



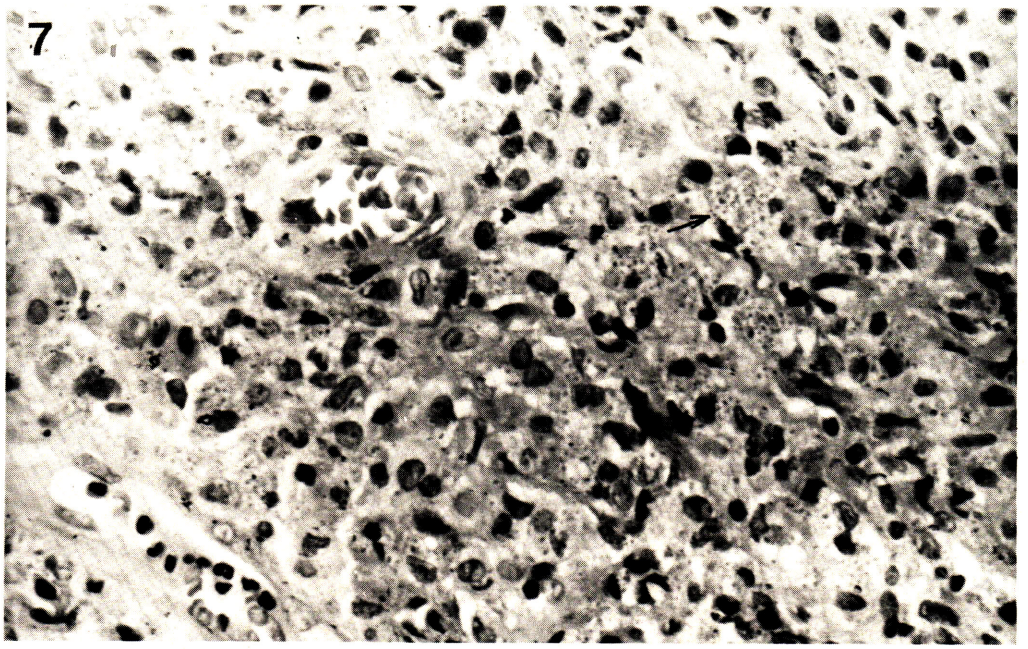
รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ Cryptococci เมื่อผ่านแสงอุลตราไวโอเลท เปล่งแสงเรืองออกจากบริเวณผนังของ Organisms (ลูกศร) × 400



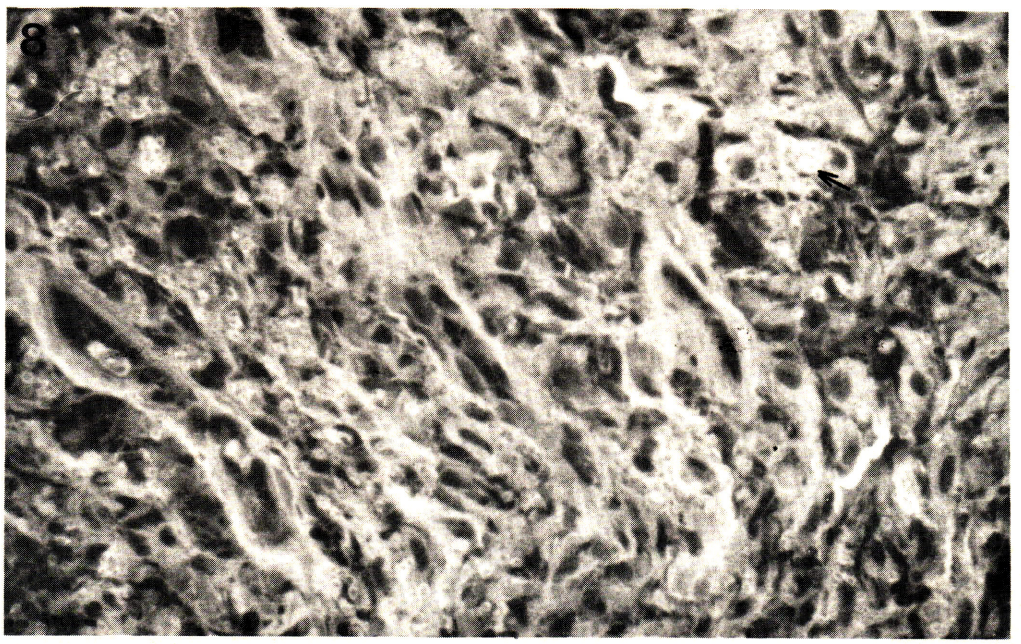
รูปที่ 5 แสดงลักษณะของ Aspergillus ประกอบด้วย septum ซึ่งเห็นไม่ชัดเจน และ branching hyphae ทำมุมกว้าง (ลูกศรคู่) × 400



รูปที่ 6 แสดงลักษณะของ Aspergillus ที่ศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ มีออโตฟลูออเรสเซนต์บริเวณผนังของ Hyphae (ลูกศร) × 400



รูปที่ 7 แสดงระยะ Active ของ Histoplasmosis พบมี Organisms จำนวนมากอยู่ในฮิสทิโอไซท์ (ลูกศร) × 400



รูปที่ 8 Histoplasma ในระยะ Active เปล่งแสงเรืองจากผนังของ Organisms เมื่อศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ (ลูกศร) × 400

อ้างอิง

1. สมเนตร บุญพรรคนาวิก. อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์เทคนิค. กรุงเทพมหานคร : พิฆเณศ, 2524. 20–28

2. Mann JL. Autofluorescent of fungi : an aid to detection in tissue sections. Am J Clin Pathol 1983 May; 79 (5) : 587–590

3. Binford CH. Connor DH. Pathology of Tropical and Extraordinary diseases : an atlas. Vol Two. Washington DC : Armed Forces Institute of Pathology, 1976. 562–569

4. Huge R, Gilardi GL. Pseudomonas fluorescent group. In : Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP, eds. Manual of Clinical Microbiology, 3 ed. Washington D.C. : American Society for Microbiology, 1980. 291–296

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 28 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2526