

การตรวจการติดเชื้อราในเล็บด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ การเพาะเชื้อ และการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

Detection of Fungal Infection in Nail by Potassium Hydroxide Preperation, Culture and Ribosomal DNA Sequence Analysis

กัญญานุช ครองบุญ, ถวัลย์ ฤกษ์งาม และเอนก ภูทอง*

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสีต ด้าบลคลองหนึ่ง อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

จีระภา ดำรงโกภรณ์, สมคิด อุบลวัฒน์, จิรัฐธิกาญจน์ สุรินทร์,

ธีระนา บุนนาค และประไพพิศ ชาวลิต

สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Kunyarnut Krongboon, Thaval Rerkngam and Anek Pootong*

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Jeerapa Dumrongpokpun, Somkid Ubonwat, Jiruttigarn Surin,

Teerana Bunnak and Prapaipit Chaowalit

Instituted of Dermatology, Department of Medical Services, Ministry of Public Health,

Rajvithi Road, Thung Phaya Thai, Rajthevee, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

โรคเชื้อราที่เล็บเป็นโรคที่มีอาการไม่รุนแรง แต่ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ การตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการรักษาโรคดังกล่าว แต่การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ และการเพาะเชื้อจากขุยเล็บที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดหลายประการ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตรวจการติดเชื้อราในเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยตรวจหาเชื้อราในตัวอย่างเล็บเท้า จำนวน 168 ตัวอย่าง ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอและเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีดั้งเดิม ผลการศึกษาพบว่าวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ การเพาะเชื้อ และการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมี

อัตราผลบวกเท่ากับ 32.1, 24.4 และ 32.7 % ตามลำดับ การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมีผลตรวจที่สอดคล้องกับการเพาะเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐานเท่ากับ 75.0 % โดยมีความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก และค่าการทำนายผลลบเท่ากับ 65.9, 78.0, 49.1 และ 87.6 % ตามลำดับ เมื่อใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอรวมกับการเพาะเชื้อพบว่าให้อัตราผลบวกเท่ากับ 41.1 % ผลการศึกษานี้สนับสนุนการใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอร่วมกับวิธีดั้งเดิม เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์ราในตัวอย่างเล็บมีความถูกต้อง

คำสำคัญ : โรคเชื้อราที่เล็บ; วิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์; การเพาะเชื้อ; การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

Abstract

Onychomycosis is fungal infection of nail and usually mild disease. However, the onychomycosis can impact quality of life of patient. Accurate diagnosis is crucial for successful treatment of onychomycosis. Unfortunately, the diagnostic preciseness of conventional diagnosis by using potassium hydroxide (KOH) preparation and fungal culture is not ideal. The aim of this study was to evaluate the detection of fungal infection in nail by ribosomal DNA (rDNA) sequence analysis. One-hundred and sixty-eight nail samples were subjected for fungal detection by rDNA sequence analysis. The result obtained by rDNA sequence analysis was compared to conventional methods. The study found that positive rates of KOH preparation, culture and rDNA sequence analysis were 32.1, 24.4 and 32.7 %, respectively. There was concordance between rDNA sequence analysis and culture as a standard method in 75.0 %. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of rDNA sequence analysis were 65.9, 78.0, 49.1 and 87.6 %, respectively. The positive rate of conventional culture method in combination with rDNA sequence analysis increased to 41.1 %. The results support the use of the rDNA sequence analysis in combination with conventional laboratory tests for accurate identification of fungi in nail sample.

Keywords: onychomycosis; potassium hydroxide preparation; culture; rDNA sequence analysis

1. บทนำ

เล็บ (nail) เป็นอวัยวะปกคลุมร่างกายที่พบอยู่บริเวณปลายนิ้วมือและนิ้วเท้า มีหน้าที่ป้องกันอันตรายที่เกิดกับนิ้วส่วนปลาย ความผิดปกติของเล็บสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ ส่วนใหญ่เกิดจากโรคเชื้อราที่เล็บ (fungal nail infection) หรือเรียกว่า onychomycosis [1] โรคเชื้อราที่เล็บมักมีอาการไม่รุนแรง แต่หากเล็บมีการหนาตัวมากขึ้นและผิดรูปร่าง อาจมี

อาการปวดในขณะที่ยกจับสิ่งของหรือในขณะเดิน และเป็นที่น่าอัศจรรย์ ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย [2,3] นอกจากนี้เล็บที่ติดเชื้อยังเป็นแหล่งรังโรคที่เชื้อราลุกลามไปยังผิวหนังบริเวณต่าง ๆ ได้อีกด้วย [4] ราที่เป็นสาเหตุของโรคเชื้อราที่เล็บสามารถแบ่งเป็นกลุ่ม dermatophytes (DMP) ใน genus *Trichophyton*, *Microsporum* และ *Epidermophyton* และกลุ่ม non-dermatophytes (NDM) ที่พบ

บ่อย ได้แก่ *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp. และ *Neoscytalidium dimidiatum* รวมถึง Yeast เช่น *Candida* sp. [5,6] ความชุกของโรคเชื้อราที่เล็บมีแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค จากการศึกษาในประเทศไทยพบความชุกของโรคเชื้อราที่เล็บประมาณ 6.0 % โดยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อราในกลุ่ม NDM (> 50 %) รองลงมาเป็นเชื้อ DMP และ *Candida* sp. ซึ่งพบเป็น *N. dimidiatum* มากที่สุด [7]

ปัจจุบันยาต้านราที่นิยมใช้ในการรักษาโรคเชื้อราที่เล็บประกอบด้วยเทอร์บินาฟีน (Terbinafine) ไอทราโคนาโซล (Itraconazole) และฟลูโคนาโซล (Fluconazole) อย่างไรก็ตาม การรักษาโรคเชื้อราที่เล็บด้วยยาด้านรามีใช้เวลานาน ตั้งแต่ 3 เดือน ถึง 1 ปี โดยมีอัตราการรักษาหาย (clinical cure rate) ประมาณ 80 % [8] นอกจากนี้เชื้อ NDM ส่วนใหญ่มีความไวต่อยาต่ำกว่าเชื้อในกลุ่ม DMP [9] ความสำเร็จของการรักษาโรคเชื้อราที่เล็บส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการตรวจหาราที่เป็นสาเหตุของโรค ดังนั้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องแม่นยำ จึงมีความสำคัญต่อการรักษาโรคเชื้อราที่เล็บเป็นอย่างมาก [10]

ปัจจุบันการตรวจทางห้องปฏิบัติที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเชื้อราที่เล็บประกอบด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH preparation) และการเพาะเชื้อ (culture) จากขุยเล็บ มีความถูกต้องประมาณ 50-70 % ขึ้นอยู่กับกระบวนการเก็บส่งตรวจและประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงาน [10] แม้ว่าการตรวจหาราในขุยเล็บด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นวิธีการที่ทราบผลได้รวดเร็ว มีต้นทุนต่ำ และความไวสูง แต่วิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์มีความจำเพาะต่ำและสามารถให้ผลลบปลอม (false-negative) ได้ประมาณ 5-15 % เนื่องจากข้อจำกัดที่เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของรา

ในขุยเล็บ ความสามารถในการมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และประสบการณ์ของผู้ทดสอบ [10,11] การเพาะราจากขุยเล็บเป็นวิธีมาตรฐาน (standard method) ที่มีความจำเพาะสูงกว่าวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ อย่างไรก็ตาม การเพาะเชื้อก็สามารถให้ผลลบปลอม (false-negative) ได้ค่อนข้างสูง โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เก็บมาจากส่วนปลายของเล็บซึ่งเป็นบริเวณที่ราตายและ/หรือขุยเล็บมีปริมาณน้อย [12] อีกทั้งการเพาะเชื้อสามารถให้ผลบวกปลอมได้จากการปนเปื้อน (contamination) ของอาหารเพาะเลี้ยงหรือจากเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนัง (normal skin flora) ในตัวอย่าง หรือแม้แต่วิธีการเพาะจากตัวอย่างอื่น ๆ ที่ทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การเพาะราจากตัวอย่างเล็บยังใช้เวลาที่ค่อนข้างนาน ไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์ อีกทั้งการระบุชนิดของราจากลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์สูง และบางกรณีนั้น ราบางสายพันธุ์ไม่มีการสร้างลักษณะที่จำเพาะ จึงไม่สามารถระบุถึงชนิดของราที่เป็นสาเหตุของโรค

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล (molecular technique) โดยเฉพาะการตรวจดีเอ็นเอ (DNA based method) ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น การวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA sequence analysis) เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อที่อาศัยกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ที่อยู่ในโรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ของราด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction, PCR) ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence analysis) และระบุชนิดของเชื้อได้จากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสพื้นฐานข้อมูล (DNA database) ปัจจุบันการวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในการ

ตรวจหาราทางห้องปฏิบัติการในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ [13,14] เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลากหลายชนิด มีความไวและความจำเพาะ (analytical sensitivity and specificity) สูง และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ประมาณ 48 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าการเพาะเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐานค่อนข้างมาก

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตรวจหาราในเส้นด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์และการเพาะเชื้อ ซึ่งนำไปสู่การสร้างแนวทางในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเชื้อราที่เส้นทางห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งส่งผลทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เหมาะสมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างขุยเส้นเท้าจากผู้ป่วยที่มีเส้นเท้าผิดปกติ จำนวน 168 ตัวอย่าง ที่เก็บตัวอย่างในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 ณ งานรพช. สถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ชุดที่ 3 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รหัสโครงการ 032/2560 และจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข รหัสโครงการ 008/2558

2.2 การเก็บตัวอย่าง

แช่เส้นเท้าบริเวณที่มีความผิดปกติด้วย 70 % แอลกอฮอล์ จากนั้นขูดเส้นด้วยใบมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อเบอร์ 15 ผสมขุยเส้นให้เข้ากันก่อนแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้สำหรับการทดสอบด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนที่ 2 ใช้สำหรับการเพาะเชื้อ และส่วนที่ 3 ใช้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส

ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

2.3 การตรวจหาราในขุยเส้นด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์

ตรวจหาองค์ประกอบของสายราด้วยวิธีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยนำขุยเส้นใส่ลงบนสไลด์แล้วหยดน้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 30 % ลงบนขุยเส้นจำนวน 2 หยด ผสมขุยเส้นกับน้ำยาแล้ว ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ดังกล่าวผ่านเปลวไฟ 2-3 วินาที ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จากนั้นสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 และ 400 เท่า

2.4 การเพาะเชื้อ

นำขุยเส้นวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabourauds dextrose agar (SDA) ที่มีคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร จำนวน 3 หลอด และอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่มีคลอแรมฟินิคอลและไซโคลเฮกซอไมด์ ความเข้มข้น 0.05 และ 0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวน 1 หลอด จากนั้นบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส และสังเกตการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 4 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ Colorex™ Candida agar (E&O Laboratories, Scotland) สำหรับราสาย (mold) จำแนกชนิดโดยสังเกตลักษณะของโคโลนี (macroscopic examination) และเตรียมตัวอย่างสไลด์ด้วยวิธี tease slide technique และย้อมด้วยแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (lactophenol cotton blue) (Himedia Laboratories, India) ก่อนนำไปสังเกตลักษณะของสายราและโคนิเดีย (conidia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) เพื่อระบุชนิดของราสาย [15]

2.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

2.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic

DNA) จากตัวอย่างขุยเส้น สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเส้นด้วย GenUp gDNA extraction kit (Biotech rabbit, Germany) จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1 ด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ดัดแปลงวิธีการบางส่วนจาก Lau และคณะ [13] ไพรมเมอร์ (primer) ที่ใช้ประกอบด้วย ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS-2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') โดยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้มีปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล ไดออกซินิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleoside triphosphate, dNTP) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิดทนความร้อน (*Taq* DNA polymerase) 5 ยูนิต ไพรมเมอร์ชนิดละ 10 มิลลิโมล และจีโนมดีเอ็นเอ 12 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ (1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ (3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, USA) หลังจากวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (DNA product) จากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 2 % แล้ว นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequence) (3500 Genetic analyzer, Applied Biosystems™, USA) จากนั้นจึงเปรียบเทียบลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอกับ

ฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และระบุชนิดราจากฐานข้อมูลที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกัน (similarity) ไม่น้อยกว่า 95 % [14]

2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์อัตราผลบวก (positive rate) ในการตรวจหาในตัวอย่างเส้นด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ วิธีโปสต์เซียมไฮดรอกไซด์ และการเพาะเชื้อ และวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าการทำนายผลบวกและลบ (positive and negative predictive value) ในตรวจหาในตัวอย่างเส้นด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการตรวจหาจากขุยเส้นด้วยวิธีโปสต์เซียมไฮดรอกไซด์และการเพาะเชื้อ

การตรวจหาในตัวอย่างเส้นจำนวน 168 ตัวอย่าง ด้วยวิธีโปสต์เซียมไฮดรอกไซด์ ไม่พบสายราและคอนนิตีเดียของรา (negative) ในตัวอย่าง 114 ตัวอย่าง (67.9 %) และอีก 54 ตัวอย่าง (32.1 %) ตรวจพบองค์ประกอบของรา (positive) ขณะที่การเพาะเชื้อตรวจพบการเจริญของราในตัวอย่าง 41 ตัวอย่าง (24.4 %) โดยเป็นเชื้อในกลุ่ม DMP จำนวน 17 ตัวอย่าง (41.5 %) ประกอบด้วย *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *T. tonsurans* จำนวน 12, 4 และ 1 ตัวอย่าง (29.3, 9.8 และ 2.4 %) ตามลำดับ ขณะที่อีก 24 ตัวอย่าง (58.3 %) พบเป็นเชื้อกลุ่ม NDM ประกอบด้วย *N. dimidiatum*, *C. albicans* และ non-*albicans Candida* sp. จำนวน 16, 3 และ 5 ตัวอย่าง (39.0, 7.3 และ 12.2 %) ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการเพาะราจากตัวอย่างเล็บ จำนวน 168 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบ	จำนวน (%) (n=168)
Negative	127 (75.6)
Positive	41 (24.4)
Dermatophytes	17 (41.5)
<i>T. rubrum</i>	12 (29.3)
<i>T. mentagrophytes</i>	4 (9.8)
<i>T. tonsurans</i>	1 (2.4)
Non-dermatophytes	24 (58.3)
<i>N. dimidiatum</i>	16 (39.0)
<i>C. albicans</i>	3 (7.3)
Non-albicans <i>Candida</i> sp.	5 (12.2)

3.2 ผลการตรวจหาราจากขุยเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

การตรวจหาราในตัวอย่างขุยเล็บ จำนวน 168 ตัวอย่าง ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าตัวอย่างขุยเล็บจำนวน 113 ตัวอย่าง (67.3 %) มีผลการทดสอบเป็นลบ ในจำนวนดังกล่าว มี 77 ตัวอย่าง ที่ไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส และมี 29 ตัวอย่าง พบแถบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ แต่ไม่ชัดเจน (faint band) โดยมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 200-300 คู่เบส อีก 3 ตัวอย่าง พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอไรส์ แต่ลำดับเบสไม่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อราในฐานข้อมูล นอกจากนี้ยังมีอีก 4 ตัวอย่าง ที่ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสมีความคล้ายคลึงเพียง 75 % กับราที่พบในสิ่งแวดล้อม (*Corioloopsis caperata*, *Basidiomycota* sp., *Lyomyces mas-carensis* และ *Waitea circinata* ชนิดละ 1 ตัวอย่าง) ขณะที่การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอสามารถตรวจพบราในตัวอย่างขุยเล็บ จำนวน 55 ตัวอย่าง (32.7 %) โดยลำดับเบสมีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลมากกว่า 95 % พบเป็นเชื้อในกลุ่ม DMP และ NDM กลุ่มละ 27 ตัวอย่าง (16.1 %) โดยเชื้อในกลุ่ม DMP พบเป็น *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *T. Interdigitale* จำนวน 22, 4 และ 1 ตัวอย่าง (40.0, 7.3 และ 1.8 %) และส่วน NDM พบเป็น *N. dimidiatum* มากที่สุด จำนวน 15 ตัวอย่าง (27.3 %) รองลงมาเป็น *F. nubica* จำนวน 5 ตัวอย่าง (9.1 %) นอกจากนี้ยังตรวจพบการติดเชื้อร่วม (mixed infection) ของ *T. rubrum* และ *C. parapsilosis* จำนวน 1 ตัวอย่าง (1.8 %) (ตารางที่ 2)

3.3 การเปรียบเทียบผลการตรวจหาราในตัวอย่างเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอกับการเพาะเชื้อ

เนื่องจากการเพาะเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบผลการตรวจหาราในตัวอย่างเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอกับการเพาะเชื้อ โดยสามารถแบ่งผลการทดสอบออกได้เป็นกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

3.3.1 ตัวอย่างที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ราในตัวอย่างเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอสอดคล้องกับการเพาะเชื้อ โดย 99 ตัวอย่าง มีผลการทดสอบเป็นลบและอีก 27 ตัวอย่าง มีการทดสอบเป็นบวกจากทั้ง 2 วิธี และมีผลการจำแนกชนิดราที่สอดคล้องกัน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมีผลการทดสอบที่สอดคล้องกับการเพาะเชื้อ คิดเป็น 75.0 % (126/168 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 3)

3.3.2 ตัวอย่างที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ราในตัวอย่างเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอเป็นบวก แต่การเพาะเชื้อเป็นลบ มีจำนวน

ทั้งสิ้น จำนวน 28 ตัวอย่าง (16.6 %) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอพบเป็นรา 11 ชนิด (ตารางที่ 3) โดย 12 ตัวอย่าง ตรวจพบเป็นราในกลุ่ม DMP ที่จัดเป็นเชื้อก่อโรคแท้ (true pathogen) และ 1 ตัวอย่าง เป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *T. rubrum* และ *C. parapsilosis* อีก 7 ตัวอย่าง ตรวจพบเป็น *Neoscytalidium* sp. โดยมีตัวอย่างจากผู้ป่วย 2 ราย ที่มีผลการตรวจที่สอดคล้องกับผลการเพาะเชื้อของตัวอย่างเล็บอีกตัวอย่างหนึ่ง ที่เก็บในตำแหน่งเดียวกัน

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาราในตัวอย่างเล็บ จำนวน 168 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ผลการทดสอบ	จำนวน (%) (n=168)
Negative	113 (67.3)
No band	77 (45.8)
Faint band	29 (17.3)
Contamination	4 (2.4)
DNA not match	3 (1.8)
Positive	55 (32.7)
Dermatophytes	27 (49.1)
<i>Trichophyton rubrum</i>	22 (40.0)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	4 (7.3)
<i>Trichophyton mentagrophyte</i>	1 (1.8)
Non-dermatophytes	27 (49.1)
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	15 (27.3)
<i>Fonsecaea nubica</i>	5 (9.1)
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	2 (3.6)
<i>Aspergillus tamarii</i>	1 (1.8)
<i>Aspergillus terreus</i>	1 (1.8)
<i>Candida orthopsilosis</i>	1 (1.8)
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	1 (1.8)
<i>Trichosporon asahii</i>	1 (1.8)
Mix infection	1 (1.8)
<i>Trichophyton rubrum</i> and <i>C. parapsilosis</i>	1 (1.8)

จากผู้ป่วยรายดังกล่าว ในขณะที่ *Fonsecaea* และ *Aspergillus* พบใน 5 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ

3.3.3 ตัวอย่างที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ราในตัวอย่างเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอเป็นลบ แต่การเพาะเชื้อเป็นบวก ตัวอย่างเล็บจำนวน 14 ตัวอย่าง (8.6 %) (ตารางที่ 3) โดยพบการเจริญของ *Trichophyton* species ใน 4 ตัวอย่าง และ 6 ตัวอย่าง ตรวจพบการเจริญของ *N. dimidiatum* นอกจากนี้อีก 4 ตัวอย่าง พบเป็น *Candida* sp.

3.3.4 ตัวอย่างที่มีผลการจำแนกชนิดราในตัวอย่างเล็บด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอกับการเพาะเชื้อไม่สอดคล้องกัน มีจำนวน 7 ตัวอย่าง โดยมี 4 ตัวอย่าง ที่มีผลการจำแนกชนิดแตกต่างกันในระดับจีนัส (genus) (*non albicans Candida* sp. กับ *Fonsecaea nubica*, *N. Dimidiatum* กับ *T. rubrum*, *Non albicans Candida* sp. กับ *N. dimidiatum* และ *non albicans Candida* sp. กับ *T. rubrum*) และมีอีก 3 ตัวอย่าง ที่มีผลการจำแนกชนิดแตกต่างกันในระดับสปีชีส์ (species) ประกอบด้วย *T. mentagrophyte* กับ *T. Interdigitale* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ *C. albicans* กับ *C. orthopsilosis* จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาพบว่าวิธีปัสเตียซึมไฮดรอกไซด์ การเพาะเชื้อ และวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมีอัตราผลบวกเท่ากับ 32.1, 24.4 และ 32.7 % ตามลำดับ การเปรียบเทียบผลกับการเพาะเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมีความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวกและลบในการตรวจหาราในตัวอย่างเล็บเท่ากับ 65.9, 78.0, 49.1 และ 87.6 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4) หากใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอร่วมกับการเพาะเชื้อ พบว่ามีอัตราผลบวกเพิ่มขึ้นเป็น 41.1 % (69/168 ตัวอย่าง)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการตรวจหาสารในตัวอย่างเส้นด้วยวิธีโพลีเมอร์เชนไฮดรอกไซด์ การเพาะเชื้อ และการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

วิธีการ			จำนวน (%) (n=168)	ชนิดของรา
KOH	Culture	rDNA sequence		
negative	negative	negative	87 (51.7)	-
positive	negative	negative	12 (7.1)	-
negative	positive	negative	8 (4.8)	<i>T. rubrum</i> (1), <i>T. mentagophyte</i> (1), non <i>albicans Candida</i> sp. (2), <i>N. dimidiatum</i> (3) and <i>C. albicans</i> (1) identified by culture
positive	positive	negative	6 (3.8)	<i>C. albicans</i> (1), <i>T. tonsurans</i> (1), <i>T. rubrum</i> (1) and <i>N. dimidiatum</i> (3) identified by culture
negative	negative	positive	15 (8.9)	<i>Fonsecaea nubica</i> (4), <i>T. rubrum</i> (3), <i>N. Dimidiatum</i> (3), <i>T. interdigitale</i> (1), <i>N. hyalinum</i> (1), <i>F. pedrosoi</i> (1), <i>Trichosporon asahii</i> (1), <i>A. terreus</i> (1) by rDNA sequence analysis
positive	negative	positive	13 (7.7)	<i>T. rubrum</i> (7), <i>N. dimidiatum</i> (2), <i>T. Interdigitale</i> (1), <i>N. hyalinum</i> (1), <i>T. rubrum</i> with <i>C. parapsilosis</i> (1), <i>Aspergillus tamarii</i> (1) identified by rDNA sequence analysis
negative	positive	positive	4 (2.4)	<i>T. rubrum</i> / <i>T. rubrum</i> (1), <i>T. mentagophyte</i> / <i>T. interdigitale</i> (1), non <i>albicans Candida</i> sp./ <i>T. rubrum</i> (1), non <i>albicans Candida</i> sp./ <i>Fonsecaea nubica</i> (1) identified by culture and rDNA sequence analysis
positive	positive	positive	23 (13.7)	<i>N. dimidiatum</i> / <i>N. dimidiatum</i> (9), <i>T. rubrum</i> / <i>T. rubrum</i> (9), <i>T. mentagophyte</i> / <i>T. Mentagophyte</i> (1), <i>T. mentagophyte</i> / <i>T. interdigitale</i> (1), <i>N. dimidiatum</i> / <i>T. rubrum</i> (1), <i>C. albicans</i> / <i>C. orthopsilosis</i> (1), non <i>albicans Candida</i> sp./ <i>N. dimidiatum</i> (1), identified by culture and rDNA sequence analysis

ตารางที่ 4 ความไว ความจำเพาะ และค่าการทำนายผลบวกและลบในตรวจหาราในตัวอย่างเส้นด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

rDNA sequence analysis	Culture (n=168)	
	Positive	Negative
Positive	27 (16.1 %)	28 (16.7 %)
Negative	14 (8.3 %)	99 (58.9 %)
Sensitivity	$= (27 \times 100) \div (27 + 14) = 65.9 \%$	
Specificity	$= (99 \times 100) \div (99 + 28) = 78.0 \%$	
Positive predictive value	$= (27 \times 100) \div (27 + 28) = 49.1 \%$	
Negative predictive value	$= (99 \times 100) \div (99 + 14) = 87.6 \%$	

Sensitivity = (True positive $\times$ 100) $\div$ (True positive + False negative); Specificity = (True negative $\times$ 100) $\div$ (True negative + False positive); Positive predictive value = (True positive $\times$ 100) $\div$ (True positive + False positive); Negative predictive value = (True negative $\times$ 100) $\div$ (True negative + False negative)

4. อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอในการตรวจหาราในตัวอย่างขุยเส้นเท้าที่เก็บจากผู้ป่วยที่เส้นมีลักษณะผิดปกติเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคเชื้อราที่เส้น โดยเลือกใช้ดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1 ที่อยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S rDNA เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เนื่องจาก (1) ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวมีมากกว่า 100 ชุด (copy) ในจีโนมของรา (2) มี universal primer ที่จำเพาะกับรา และ (3) ลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าวมีความแปรผัน (variable) ที่สูงพอที่ใช้ในการจำแนกชนิดของราในระดับสปีชีส์ได้ [16-18]

การศึกษานี้ได้ตรวจหาราด้วยวิธีปัสเตชันไฮโดรอกไซด์ การเพาะเชื้อและการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอในตัวอย่างขุยเส้น จำนวน 168 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอสามารถยืนยันผลการเพาะเชื้อและ

การจำแนกชนิดของราที่พบในตัวอย่างเส้น สำหรับตัวอย่างที่มีผลการจำแนกชนิดของราด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอแตกต่างจากการเพาะเชื้อในระดับสปีชีส์ (*T. mentagrophyte* กับ *T. interdigitale* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ *C. albicans* กับ *C. orthopsilosis* จำนวน 1 ตัวอย่าง) อาจเกิดจากความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงวิธีการจำแนกชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเพียงการตรวจจำแนกเบื้องต้น จึงทำให้ผลการจำแนกชนิดมีความผิดพลาดได้ และสำหรับตัวอย่างเส้นจำนวน 4 ตัวอย่าง มีผลการจำแนกชนิดของราแตกต่างกันในระดับจีโนส ผู้วิจัยคาดว่าอาจมีสาเหตุจากการปนเปื้อนของราทั้งจากการเก็บตัวอย่างหรือระหว่างการวิเคราะห์ ทำให้ผลการตรวจไม่สอดคล้องกัน

การศึกษานี้มีตัวอย่างขุยเส้นที่มีผลการเพาะเชื้อเป็นลบ แต่การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอเป็นบวก จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง (วิธี

โปกัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นบวก 14 ตัวอย่าง และเป็นลบ 16 ตัวอย่าง) ส่วนใหญ่ตรวจพบดีเอ็นเอของ *Trichophyton* sp. (13 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคแท้ รองลงมาตรวจพบเป็น *Neoscytalidium* sp. (7 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีแนวโน้มก่อโรค ในกรณีนี้ผู้วิจัยคาดว่า การเพาะเชื้อแล้วไม่พบการเจริญของรานั้นอาจเป็นผลลบปลอม (false-negative) ที่สามารถเกิดได้ค่อนข้างบ่อยในการเพาะจากตัวอย่างเล็บ โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เก็บมาจากส่วนปลายของเล็บ ซึ่งเป็นบริเวณที่ราดาย และ/หรือ ขุยเล็บที่ใช้ในการเพาะเชื้อมีปริมาณน้อย [12] ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอสามารถช่วยจำแนกชนิดของรา โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่สามารถเพาะเชื้อ

เนื่องจากการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้ universal primer ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มรา ทำให้ตรวจพบดีเอ็นเอของเห็ดราในตัวอย่างเล็บที่วิธีโปกัสเซียมไฮดรอกไซด์และการเพาะเชื้อเป็นลบ รวมถึงดีเอ็นเอของราที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่นบนร่างกายของมนุษย์ (normal flora) และปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม (contaminant fungi) นอกจากนี้มีตัวอย่างเล็บจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีผลการเพาะเชื้อเป็นลบ ตรวจพบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แต่ไม่สามารถระบุชนิดของรา เนื่องจากลำดับเบสไม่มีความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1 ที่อยู่ในฐานข้อมูล จาก fluorescence chromatograms ของการวิเคราะห์ลำดับเบสในตัวอย่างดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงลักษณะการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กใกล้เคียงใกล้เคียงมากกว่า 1 ชนิด ผลการศึกษานี้เน้นย้ำข้อจำกัดของการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดในตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อร่วม

(mixed infection) [19] ดังนั้นการตรวจหาในตัวอย่างที่ไม่ปลอดเชื้อ (non sterile sample) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอจึงต้องพิจารณาอาการของผู้ป่วยร่วมกับผลการตรวจวิเคราะห์เสมอ [13]

ผลการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมีผลตรวจเป็นลบในตัวอย่างที่มีผลการตรวจด้วยวิธีโปกัสเซียมไฮดรอกไซด์ และ/หรือ การเพาะเชื้อเป็นบวก ได้แก่ ตัวอย่างเล็บที่มีผลการตรวจด้วยวิธีโปกัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นบวก แต่การเพาะเชื้อเป็นลบ โปกัสเซียมไฮดรอกไซด์และการเพาะเชื้อเป็นบวก และตัวอย่างที่วิธีโปกัสเซียมไฮดรอกไซด์ให้ผลลบ แต่การเพาะเชื้อเป็นบวก จำนวน 12, 6, และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในจำนวนดังกล่าวมี 15 ตัวอย่าง ที่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสที่ไม่ชัดเจน (faint band) ในกรณีนี้อาจเกิดจากตัวอย่างขุยเล็บที่ใช้มีปริมาณน้อย และ/หรือ ราในตัวอย่างมีปริมาณน้อย (scant) ซึ่งสังเกตได้จากการตรวจด้วยวิธีโปกัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ส่วนใหญ่พบเชื้อเพียงเล็กน้อย (few) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) หรืออาจเกิดการกระจายตัวของสายราในตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละการทดสอบไม่เท่ากัน [10, 11, 20] นอกจากนี้อาจมีการปนเปื้อนของตัวขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR inhibitor) ในตัวอย่าง [20] รวมถึงยังอาจเกิดจากวิธีการสกัดจีโนมดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษานี้มีประสิทธิภาพไม่เต็มที่ ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การตรวจการติดเชื้อราในตัวอย่างเล็บด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลเกิดผลลบปลอมได้ [21]

การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ได้ประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1 ในการตรวจหาในตัวอย่างเล็บ จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสไรโบโซมอลดีเอ็นเอมีอัตราผลบวก (positive rate) สูงที่สุดที่ 32.7 % รองลงมา คือ วิธีโปกัสเซียมไฮดรอกไซด์ (32.1 %) และ

การเพาะเชื้อมีอัตราผลบวกต่ำที่สุด (25.0 %) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเชื้อพบว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอมีผลการทดสอบที่สอดคล้องกับการเพาะเชื้อ คิดเป็น 75.0 % (126/168) และมีความไวเท่ากับ 65.9 % จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอในการตรวจหาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อชนิดต่าง ๆ พบว่ามีความไวประมาณ 65.0 ถึง 90.0 % โดยความไวที่แตกต่างกันนี้ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับประเภทของสิ่งส่งตรวจที่นำไปใช้ [13] เมื่อพิจารณาผลการตรวจด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอรวมกับการเพาะเชื้อพบว่ามีอัตราผลบวกในการตรวจพบราเพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอสามารถช่วยระบุชนิดของราที่เป็นสาเหตุของโรคเชื้อราที่เล็บในกรณีที่มีวิธีดั้งเดิม conventional method ไม่สามารถตรวจพบรา ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาในตัวอย่างเล็บ

5. สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยราในตัวอย่างเล็บและใช้เวลาสั้น แต่ด้วยวิธีการดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะทางการประยุกต์วิธีการดังกล่าวในการตรวจวินิจฉัยราในตัวอย่างเล็บทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้ (1) ใช้เป็นการตรวจเบื้องต้น (first line test) คู่ขนานไปกับวิธีการเดิม แต่อาจมีข้อจำกัดที่การวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอยังมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง (2) ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เฉพาะในตัวอย่างเล็บที่มีผลการตรวจด้วยวิธีไปดัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นบวก เพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ราที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่เล็บได้รวดเร็วและเพาะเชื้อใน

ตัวอย่างที่มีผลการตรวจด้วยวิธีไปดัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นลบ หรือ (3) ประยุกต์ใช้ในตัวอย่างที่ไม่พบการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากเพาะเชื้อไปได้ระยะหนึ่งแล้ว เพื่อให้ทราบชนิดของราก่อโรค ซึ่งมีผลให้การรักษาคัดเชื้อราที่เล็บเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อนึ่งเพื่อให้การตรวจหาในตัวอย่างเล็บด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสโรโบโซมอลดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงควรมีการปรับปรุงกระบวนการในการเก็บตัวอย่างและการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างขูดเล็บก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำ

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาสาสมัครทุกท่านที่ยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัย การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข รหัสโครงการ 008/2558 และทุนสนับสนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี พ.ศ. 2560 รหัสโครงการ 068/2560

7. รายการอ้างอิง

- [1] Welsh, O., Vera-Cabrera, L. and Welsh, E., 2010, Onychomycosis, Clin. Dermatol. 28: 151-159.
- [2] Szepletowski, J. C., Reich, A., Pacan, P., Garlowska, E. and Baran, E., 2007, On behalf of the Polish Onychomycosis Study Group: Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis by Polish version of an international onychomycosis- specific questionnaire, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 21: 491-496.
- [3] Chacon, A., Franca, K., Fernandez, A. and Nouri, K., 2013, Psychosocial impact of

- onychomycosis: a review, *Int. J. Dermatol.* 52: 1300-13007.
- [4] Szepletowski, J.C., Reich, A., Garlowska, E., Kulig, M. and Baran, E. , 2006, Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with tinea pedis and other dermatomycoses: A survey of 2761 patients, *Arch. Dermatol.* 142: 1279-1284.
- [5] Ghannoum, M.A., Hajjeh, R.A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A.K. and Summerbell, R. , 2000, A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns, *J. Am. Acad. Dermatol.* 43: 641-648.
- [6] Gupta, A.K., Drummond-Main, C., Cooper, EA., Brintnell, W., Piraccini, B.M. and Tosti, A., 2012, Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: Diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment, *J. Am. Acad. Dermatol.* 66: 494-502.
- [7] Ungpakorn, R. , Lohaprathan, S. and Reangchainam, S. , 2004, Prevalence of foot diseases in outpatients attending the Institute of Dermatology Bangkok Thailand, *Clin. Exp. Dermatol.* 29: 87-90.
- [8] Cribier, B.J. and Paul, C., 2001, Long-term efficacy of antifungals in toenail onychomycosis: A critical review, *Br. J. Dermatol.* 145: 446-452.
- [9] Bueno, J.G., Martinez, C., Zapata, B., Sanclemente, G., Gallego, M. and Mesa, A.C., 2010, *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis, *Clin. Exp. Dermatol.* 35: 658-663.
- [10] Weinberg, J.M., Koestenblatt, E.K., Tutrone, W.D., Tishler, H.R. and Najarian, L., 2003, Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 49: 193-197.
- [11] Panasiti, V., Borroni, R.G., Devirgiliis, V., Rossi, M., Fabbrizio, L. and Masciangelo, R. , 2006, Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses, *Mycoses* 49: 26-29.
- [12] Mehregan, D.C. and Gee, S.L., 1999, The cost effectiveness of testing for onychomycosis versus empiric treatment of onychodystrophies with oral antifungal agents, *Cutis* 64: 407-410.
- [13] Lau, A., Chen, S., Sorrell, T., Carter, D., Malik, R., Martin, P. and Halliday, C., 2007, Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens, *J. Clin. Microbiol.* 45: 380-385.
- [14] Ciardo, D.E., Schar, G., Altwegg, M. and Bottger, E. C. , Bosshard P. P. , 2007, Identification of moulds in the diagnostic laboratory – an algorithm implementing molecular and phenotypic methods, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59: 49-60.

- [15] McGinnis, M.R., 1980, Laboratory Handbook of Medical Mycology, Academic Press, New York, 661 p.
- [16] Hendolin, P.H., Lars, P., Koukila-Kahkola, P., Anttila V.J., Malmberg, H., Richardson, M., and Ylikoski, J., 2000, Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens, J. Clin. Microbiol. 38: 4186-4192.
- [17] Chen, Y.C., Eisner, J. D., Kattar, M.M., Rassoulia-Barrett, S.L., Lefe, K., Bui, U., Limaye, A.P., and Cookson, B.T., 2001, Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts, J. Clin. Microbiol. 39: 4042-4051
- [18] Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P. and Chang, T.C., 2006. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions, J. Clin. Microbiol. 44: 693-699.
- [19] Sontakke, S., Cadenas, M.B., Maggi, R.G., Diniz, P.P. and Breitschwerdt, E.B., 2009, Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology, J. Microbiol. Methods. 76: 217-225.
- [20] Paugam, A., L'Ollivier, C., Viguié, C., Anaya, L., Mary, C., de Ponfily, G. and Ranque, S., 2013, Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis, J. Microbiol. Methods 95: 218-222.
- [21] Winter, I., Uhrlaß, S., Krüger, C., Herrmann, J., Bezold, G., Winter, A., Barth, S., Simon, J.C., Gräser, Y. and Nenoff, P., 2013, Molecular biological detection of dermatophytes in clinical samples when onychomycosis or tinea pedis is suspected: A prospective study comparing conventional dermatomycological diagnostics and polymerase chain reaction, Hautarzt 64: 283-289.