การศึกษาเบื้องต้นในการหา Salmonella typhi "O" antibody โดยวิธี slide agglutination test

วรรณา พรรณรักษา*
สดใส เวชชาชีวะ*
ดิลก เย็นบุตร*

รายงานการตรวจหา Salmonella typhi "O" antibody โดยวิธี slight agglutination test การเตรียมแอนติเจนใช้วิธีของ Kolmer ผลการทดสอบแอนติบอดีในน้ำเหลืองโดยวิธี slide agglutination test เปรียบเทียบกับวิธี standard tube test มีความแตกต่างกันน้อยมาก วิธี slides agglutination test มีข้อดีที่รู้ผลการทดสอบรวดเร็วสามารถปฏิบัติได้เกือบทุกสถานที่ โดยบุคลากรทางการแพทย์ทุกแขนงโดยไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์การตรวจสอบที่ยุ่งยากมาก

โรคทัยฟอยด์เป็นโรคที่รู้จักมานาน และยังคงเป็นโรคที่แพร่หลายอยู่ในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก รวมทั้งสหรัฐอเมริกา[2, 5] และประเทศไทย[10] บ่อยครั้งที่ผู้ป่วยจะมาหาแพทย์ด้วยอาการไข้ที่หาสาเหตุไม่ได้ หรือในรายที่มีอาการเด่นชัดกว่านั้น การวินิจฉัยโรคที่ยังคงต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจแยกเชื้อจากตัวอย่างต่าง ๆ ของผู้ป่วย หรือตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อในน้ำเหลืองของผู้ป่วย โดยวิธี Widal agglutination test[4, 5] แบบ standard tube test ใช้เวลาในการตรวจไม่ต่ำกว่า 2—18 ชั่วโมง[1, 3, 6] และถ้ามีความขัดข้องในการติดต่อระหว่างแพทย์และผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการ จะทำให้เวลาที่ใช้ในการติดตามผลยืดยาวออกไปอีกมาก

การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อโดยวิธีลัดเปลืองเวลาน้อยที่สุด จึงเป็นสิ่งที่น่าคิดค้นและนำมาปฏิบัติ ได้มีรายงานต่าง ๆ ที่พยายามนำวิธีการทางห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิคใหม่[9, 11] ผู้รายงานจึงได้ทดลองผลิตแอนติเจน เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อ Salmonella typhi โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ระหว่าง particles ของเชื้อและแอนติบอดีของเชื้อซึ่งมีอยู่ในน้ำเหลืองของผู้ป่วย ทำให้เกิดตกตะกอนบนสไลด์ ปฏิกิริยานี้จะใช้เวลาสั้นมากเพียง 3—5

*แผนกจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

นาที และจะสามารถตรวจได้โดยบุคลากรทางการแพทย์ทุกประเภท ไม่จำเป็นจะต้องเป็นผู้ที่ทำงานเฉพาะในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

จากการทดลองทำแอนติเจนหลาย ๆ วิธี พบว่าเมื่อใช้วิธีของ Kolmer[6] ได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งจะได้รายงานต่อไป

วัสดุและวิธีการ

แอนติเจนเตรียมโดยใช้เชื้อ Salmonella typhi เพาะเลี้ยงใน Bromthymol blue media ได้ทำ subculture หลาย ๆ ครั้ง เพื่อทำให้ Vi antigen หมดไป แล้วทดสอบอีกครั้งว่าเป็นเชื้อที่ต้องการจริง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในวุ้นตะแคง Triple Supar Iron (TSI) ซึ่งเชื้อนี้จะให้ปฏิกริยาเฉพาะในวุ้นตะแคงชนิดนี้ การทดสอบว่าปราศจาก Vi antigen โดยให้ทำปฏิกริยา Vi antibody ของเชื้อ Salmonella typhi ซึ่งผลิตโดยบริษัท Difco จะให้ผลลบคือไม่มีการเกาะกลุ่มตกตะกอนเกิดขึ้น จากนั้นเลือกเชื้อจาก colony ที่กลมใสและเรียบลงเพาะเลี้ยงใน beef extract broth ปริมาณ 10 มล. ในอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงเทน้ำเลี้ยงเชื้อลงใน Blake bottle ที่มีวุ้นและอาหารอื่น ๆ สำหรับเลี้ยงเชื้อเก็บขวดไว้ใน 37 °ซ นาน 24—72 ชั่วโมง จึงล้างเชื้อด้วยน้ำเกลือ 12 % เชื้อที่ได้นำไปปั่นที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที

ตะกอนของเชื้อที่ได้นำมาละลายด้วย 95 % แอลกอฮอล์ เขย่าอย่างแรงนาน 10 นาทีแล้วเก็บไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที ละลายแอนติเจนที่ตกตะกอนด้วยน้ำเกลือ 12 % ในอัตราตะกอน 1 มล. ต่อน้ำเกลือ 5—7 มล. ก็จะได้ Salmanella typhi "O" antigen ที่นำมาใช้ปฏิบัติการได้

น้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีนำมาทำให้เจือจางเป็น 10 เท่าโดยใช้น้ำเกลือ 0.9% เป็นตัวทำให้เจือจาง ทั้งนี้เพื่อลดปฏิกริยา nonspecific agglutination ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นได้เนื่องจากมี cross-reaction กับเชื้อ Salmonella หมู่อื่นและพวก Enteric bacteria[4] น้ำเหลืองที่นำมาทดสอบ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มคนปกติ เป็นตัวอย่างน้ำเหลืองที่ได้จากนิสิตแพทย์ จำนวน 87 คน

2. กลุ่มผู้ป่วย ได้จากน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ถูกส่งมาตรวจหา Salmonella antibody โดยวิธีธรรมดา จำนวน 226 ราย

วิธีการทดสอบ

1. หยดน้ำเหลืองที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 0.05 มล. ลงบนสไลด์ที่แห้งสะอาด

2. หยดแอนติเจนที่เตรียมไว้ 1 หยด ซึ่งมีปริมาตรประมาณ 0.05 มล. ลงบนน้ำเหลืองให้เข้ากันดี เอียงสไลด์ไปมานาน 3—5 นาทีอ่านผล

3. สำหรับ control ใช้น้ำเกลือ 0.9 % ปริมาตร 0.05 มล. แทนน้ำเหลืองผสมกับแอนติเจนจำนวนเท่ากัน

4. การอ่านผล ในรายที่ให้ผลบวกจะเห็นตะกอนเล็ก ๆ สีขาวเกิดขึ้นชัดเจน เมื่อเทียบกับ

control ซึ่งจะยังขุ่นขาวเหมือนน้ำนมตามเดิม ในรายที่ให้ผลลบจะให้ลักษณะเหมือน control

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผล slide agglutination test และ standard tube test ของน้ำเหลืองกลุ่มลบ

Titer โดยวิธี standard tube test	จำนวนที่ตรวจ (ราย)	Slide agglutination test	
		ผลลบ (ราย)	ผลบวก (ราย)
< 1:20	62	62 (100 %)	0 (0%)
1:20	36	36 (100 %)	0 (0%)
1:40	28	23 (82.1%)	5 (17.9%)
	125	121 (96.0%)	5 (4.0%)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผล slide agglutination test และ standard tube test ของน้ำเหลืองกลุ่มบวก

Titer โดยวิธี standard tube test	จำนวนที่ตรวจ (ราย)	Slide agglutination test	
		ผลบวก (ราย)	ผลลบ (ราย)
<1:160	30	27 (90 %)	3 (10%)
1:320	13	13 (100%)	0 (0%)
1:640	6	6 (100%)	0 (0%)
1:1280	4	4 (100%)	0 (0%)
	53	50 (94.3%)	3 (5.7%)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผล slide agglutination test และ standard tube test ของน้ำเหลืองกลุ่ม borderline

Titer โดยวิธี standard tube test	จำนวนที่ตรวจ (ราย)	Slide aggluiination test	
		ผลบวก (ราย)	ผลลบ (ราย)
1:80	47	20 (43.2%)	27 (56.8%)

ผล

1. ในกลุ่มคนปกติ โดยวิธีสไลด์ได้ผลลบทั้ง 87 รายหรือ 100%

2. ในกลุ่มผู้ป่วย น้ำเหลืองที่นำมาทดสอบด้วยวิธีสไลด์ทุกรายได้ทำการทดสอบโดยไม่รู้ผลของวิธี standard tube test เพื่อเป็นการลดอคติ ผลของการศึกษาได้แจกแจงตามกลุ่มของน้ำเหลืองที่ตัดสินโดยวิธี standard tube test

น้ำเหลืองที่ส่งมาทำ Widal agglutination test โดยวิธี standard tube test ถ้าเป็นน้ำเหลืองตัวอย่างไม่ใช่ pair sera ทางห้องปฏิบัติการของแผนกจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จะแปลผลตามระดับ titer ของ Salmonella typhi "O" antibody

1. ผลลบ คือ น้ำเหลืองที่โดยวิธี standard tube test ได้ titer ของ "O" antibody น้อยกว่า 1:80

2. ผลบวกคือน้ำเหลืองที่โดยวิธี standard tube test ได้ titer ของ "O" antibody มากกว่า 1 : 80

3. ผลที่บอกไม่ได้ว่าบวกหรือลบเป็นน้ำเหลืองที่ได้ titer ต่อ "O" antibody เท่ากับ 1:80

วิจารณ์

จากผลการศึกษานี้ พบว่าแอนติเจนที่ผลิตขึ้นเองนี้มีความสามารถตรวจหา Salmonella typhi "O" antibody โดยสามารถแยกน้ำเหลืองกลุ่มบวกและกลุ่มลบได้ เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี

Chi Square พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติคือค่า $P < 0.005$

ผลของการทดสอบโดยวิธีสไลด์แตกต่างจาก tube method ในกลุ่มลบ 4% และในกลุ่มบวก 5.7% ความแตกต่างนี้มีค่าน้อยซึ่งอยู่ในระดับปกติ ซึ่งอาจจะเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความผิดทางเทคนิคเป็นต้น

ในการทดสอบโดยวิธีนี้ จะสามารถปฏิบัติได้ในเกือบทุกสถานที่ และโดยบุคลากรทางการแพทย์ทุกแขนง ไม่ต้องการอุปกรณ์เครื่องแก้วมากมาย และรู้ผลในเวลาอันรวดเร็ว การดูการเกาะกลุ่มของตัวแบคทีเรียนี้ นอกจากจะดูได้ด้วยตาเปล่า ก็จะสามารถดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ขนาดขยายธรรมดา ซึ่งจะเห็นการเกาะกลุ่มของเชื้อชัดเจนและไม่มีปัญหาสำหรับผู้ที่ไม่คุ้นกับการดูการตกตะกอนของแบคทีเรีย

สรุป

ผู้รายงานเสนอการเตรียมแอนติเจน เพื่อใช้ตรวจหา Salmonella typhi "O" antibody ให้ได้ผลในเวลารวดเร็ว โดยใช้วิธีสไลด์ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มตกตะกอน และได้ทำการทดสอบกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยและคนปกติ จำนวนหนึ่งได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจยิ่ง

สิ่งที่ควรจะค้นคว้าศึกษาต่อไป คือ การปรับปรุงแอนติเจนและศึกษาคุณสมบัติความคงทนของแอนติเจนต่อภาวะต่าง ๆ และอายุต่างกัน เพื่อจะสามารถนำแอนติเจนนี้ไปใช้ในหน่วยรักษาพยาบาลทั้งในส่วนกลางและชนบท และปรับปรุงวิธีการทดสอบให้รัดกุมยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. สดใส เวชชาชีวะ และคณะ คู่มือปฏิบัติการทางอิมมูนวิทยา แผนกจุลชีวะวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย 2520
2. Aserkoff, B. Schroeder, SA. Brackman, PS: Salmonellosis in the United States, a five-years review. Am J Epidem 92: 13-24, 70
3. Bennett, WC Clinical Serology. Springfield, Illinois: Charles C Thomas 1974
4. Cruickshank, R Medical Microbiology a guide to the Laboratory Diagnosis and Control of Infection. 12th ed Edinburgh: Livingstone, Ltd. 1968
5. Feizin, RD: Salmonella everywhere, epidemiologic, diagnostic, and therapeutic dilemmas. Clin Pediat (Phila) 9: 527-33, 70
6. Kolmer, JA, Boerner, F Approved Laboratory Technic, 4th ed New York: Appleton-Century-Crofts 1945
7. Mallory, A, Gangarosa, EJ: Salmonella surveillance 1968. J Infect Dis 121: 87-89, 70
8. Reynolds, DW, Carpenter, RL Simon, WH: Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever. JAMA 214: 2192-93, 71
9. Sato, H et al: A rapid quantitative microtitration of salmonella antibody. Am J Clin Pathol 55: 729-32, 71
10. Suwankrughasna, N, Panas-Ampol, K: Incidence of typhoid and paratyphoid fevers in Chiengmai Provincial Hospital. Far East Med J 7(2): 54-56, 71
11. Wilson, CR, Padron, AP, Dockstader, WB: Samonella screening procedure with tests for beta-galactosidase and flagellar antigens. Appl Microbiol 21: 346-49, 71