บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. สิ่งตรวจที่นำมาศึกษา

สิ่งตรวจได้จากผู้ป่วยจำนวน 100 ราย เก็บทุกรายที่แพทย์ได้ทำการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นว่าเป็นโรคหนองใน (Gonorrhea) หรือ ท่อปัสสาวะอักเสบ (Urethritis) หรือ โรคหนองในเทียม (Non-specific urethritis หรือ Non-gonococcal urethritis) ในผู้ป่วยชาย และในผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคหนองใน หรือ โรคกรวยไตอักเสบ (Pelvic Inflammatory disease หรือ PID) ผู้ป่วยทั้ง 100 รายนี้เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจและรักษาในคลินิคกามโรค (Venereal Disease Clinic) โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช กรมแพทย์ทหารอากาศ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ.2525 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2526

2. วิธีเก็บสิ่งตรวจ

ทำการเก็บสิ่งตรวจจากผู้ป่วยชายจากบริเวณท่อปัสสาวะ (Urethral) โดยใช้ลวด (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเผาไฟให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ ล้วงเข้าไปในท่อปัสสาวะให้ลึกประมาณ 1-2 เซ็นติเมตร แล้วนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อทันที พร้อมกับนำแผ่นกระจกที่สะอาดรองหนองจากปลายอวัยวะ ใช้ลวดละเลงหนองบนแผ่นสไลด์ให้เป็นรอยป้าย (smear) บาง ๆ ทิ้งไว้ให้แห้งเพื่อนำไปย้อมสีต่อไป[3]

ในผู้ป่วยหญิง บริเวณที่เก็บสิ่งตรวจได้แก่ บริเวณคอมดลูก (Cervix) และช่องคลอด (Vagina) โดยใช้สำลีพันปลายไม้คลุกผงถ่ายที่ปราศจากเชื้อ (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำแล้ว) ป้ายเอาหนองในบริเวณนี้มาใช้ใน Stuart's transport Medium ส่งมายังห้องปฏิบัติการทันที[3]

3. การวิเคราะห์สิ่งตรวจ (Examination of specimens)

นำสิ่งตรวจที่ได้จากผู้ป่วยทั้งชายและหญิง มาดำเนินวิธีการดังต่อไปนี้

3.1 การย้อมสี

ป้ายสิ่งตรวจลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด 2 แผ่น ละเลงหนองด้วยลวดให้เป็นบริเวณกว้างอย่างน้อย 1 ตารางเซ็นติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อนำไปทำการย้อมสีแกรม และ ฟลูออเรสเซนต์แอนตีบอดี้เทคนิค (Fluorescent antibody technique หรือ FA)

3.1.1 <u>การย้อมสีแบบแกรม</u> (Gram's stain)

นำแผ่นสไลด์ที่ป้ายหนองจากผู้ป่วย 1 แผ่น มาผ่านเปลวไฟเพื่อให้รอยป้ายติดกับแผ่นกระจก นำไปย้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ -

(1) หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยป้าย ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำ

(2) หยด iodine solution ให้ท่วม เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

(3) ล้างสีออกด้วย acetone alcohol เป็นเวลา 15 วินาที ล้างน้ำ

(4) หยดสี safranin ลงบนรอยป้าย ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างน้ำ

ใช้กระดาษกรองซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ โดยใช้กำลังขยาย 800-1,000 เท่า [4]

ถ้าผู้ป่วยเป็นโรคหนองใน จะพบลักษณะเฉพาะของเชื้อหนองในเป็น gram negative diplococci อยู่ภายในหรือภายนอกเม็ดเลือดขาว (intracellular หรือ extracellular) [9,12]

3.1.2 <u>การย้อมฟลูออเรสเซนต์</u> [8] (FA)

นำแผ่นกระจกที่ป้ายหนองอีกแผ่นหนึ่ง ทิ้งให้แห้งในอากาศ มาดำเนินขั้นตอนต่อไปนี้

(1) Fix รอย smear ใน acetone แช่เย็น เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ

(2) Rehydrate ใน Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.2 เป็นเวลา 10 วินาที ทิ้งไว้ให้แห้ง

(3) หยดคอนจูเกท (Difcolaboratories) ของ Antigonococcal dilution 1 : 8 ลงบนแผนสไลด์ให้ท่วมรอย smear วางแผ่นกระจกในกล่องที่มีความชื้น อบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

(4) ล้างคอนจูเกทออกด้วย PBS pH.7.2 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

(5) แช่ต่อใน PBS pH.7.2 เป็นเวลา 10 นาที

(6) ทิ้งให้แห้งบนกระดาษกรอง

(7) Mounted ด้วย phosphate buffer glycerol 1 : 9 (9 ส่วนของ glycerol ผสมกับ 1 ส่วนของ PBS pH.7.2 ปิดด้วย cover slip

นำไปดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ (ยี่ห้อ TI YODA) ถ้าผลเป็นบวก จะเห็นเซลของเชื้อโกโนเรียมีลักษณะเรืองแสงสีเขียวบนพื้นผิวที่เป็นสีดำ

3.2 <u>การเพาะเลี้ยงเชื้อ</u>

นำสิ่งตรวจจากผู้ป่วยป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective medium ได้แก่ Thayer-Martin medium ประกอบด้วย GC agar base,(Difco) haemoglobin (Difco), Isovitalex (BBL) และยาปฏิชีวนะพวก vancomycin, nystatin และ colistin สิ่งตรวจจากผู้หญิงนำมาเพาะบนจานอาหาร โดยหมุนปลายไม้ แล้วใช้ loop streak ให้ทั่ว ถ้าเป็นหนองจากผู้ป่วยชาย ใช้ลวดล้วงจากท่อปัสสาวะ นำมา streak เช่นเดียวกันบนจานเพาะเชื้อ นำไปอบทันทีภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5-10 % โดยใช้กระป๋องสังกะสี จุดเทียนไขสีขาวไว้ภายในกระป๋อง (candle jar) ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใส่สำลีชุบน้ำหมาด ๆ เพื่อให้มีความชื้นมาก

หลังจากอบเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูลักษณะโคโลนีที่เจริญ ถ้าไม่มีเชื้อขึ้น ให้เก็บจานเพาะเชื้อต่อภายใต้บรรยากาศ

คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะรายงานผลว่า ไม่มีเชื้อเจริญ (no growth) และได้ทดลองทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ GAB ซึ่งเป็นอาหารที่เตรียมสูตรใหม่

นำโคโลนีที่สงสัยมา streak ซ้ำบนจานเพาะเชื้อใหม่ เพื่อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) อบที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. ภายใต้ CO_2 5-10 % ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โคโลนีที่เป็นโคโลนีโดด ๆ ของ pure culture นำมาวิเคราะห์ดังนี้ -

(1) ทดสอบ oxidase reaction โดยหยด 1 % tetramethyl-paraphenylene diamine dihydrochloride ที่เตรียมใหม่ลงบนจานเพาะเชื้อ หรือ ใช้ลวดแพลตตินั่มป้ายเชื้อลงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารที่ใช้ทดสอบ ถ้าเป็นเชื้อหนองใน สารที่ใช้ทดสอบจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดง ภายในเวลา 10 วินาที

(2) ย้อมสีของแกรมและย้อม FA นำโคโลนีที่ให้ oxidase reaction (ผลเป็นบวก) มาป้ายบนแผ่นสไลด์ 2 แผ่น โดยหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ละเลงโคโลนีของเชื้อบนหยดน้ำให้ทั่ว จนได้รอยป้ายประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำไปย้อมสีแกรม และ ย้อม FA (ตามวิธีข้างต้น) เพื่อยืนยันว่า oxidase reaction ที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้เกิดจากเชื้ออื่น ๆ

พบเชื้อมีลักษณะเป็น gram negative diplococci และ FA จาก antigonococcal conjugate ให้ผลบวก แสดงว่าโคโลนีที่สงสัย เป็นโคโลนีของเชื้อ Neisseria gonorrhoeae

(3) ทดสอบทางชีวเคมี นำโคโลนีที่พบว่าเป็นเชื้อโกโนเรียมาทำการทดสอบทางชีวเคมี โดยดูการย่อยคาร์โบไฮเดรท โดยเลี้ยงเชื้อบน cystine trypticase agar (CTA) ซึ่งต้องเติม 1 % ของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมัลโตส และน้ำตาลซูโครส แต่ละอย่างลงไป เพื่อดูการใช้น้ำตาลเหล่านี้ของเชื้อโกโนเรีย

เตรียมเชื้อใน peptone water เล็กน้อย เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^6 cells/ml. หยดเชื้อลงบน CTA medium ใช้ลวดเผาไฟ

ทิ้งไว้สักพัก จิ้มเชื้อลงบนผิวหน้าของวุ้น ลึกประมาณ 1/3 ของอาหารในหลอด ปิดจุกให้แน่น อบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง อ่านผล ต้องเก็บไว้ถึง 48 ชั่วโมงก่อนที่จะรายงานเป็นผลลบ (negative) ถ้าเป็นเชื้อ N. gonorrhoeae จะเกิดปฏิกริยาเฟอร์เมนต์ในหลอดที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียงหลอดเดียว โดยดูจากการเปลี่ยนสีของมีเดีย

(4) coagglutination test ทำ confirmatory test โดยใช้วิธี slide agglutination โดยใช้น้ำยาที่เตรียมสำเร็จ มีชื่อว่า Phadebact Gonococcus Test (manufactured by Pharmacia Diagnostico AB Uppsala, Sweden) โดยหยด normal saline ที่ปราศจากเชื้อลงบนกระดาษที่ใช้ทดสอบ ใช้ลวดแพลตตินั่มป้ายเชื้อที่จะทำการทดสอบมาละเลงบน normal saline (ที่ต้มแล้ว) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยด Phadebact ที่เป็น gonococcal antiserum ลงบนเชื้อ ทำเปรียบเทียบโดยใช้ control ที่เป็น non-immunized antiserum แปรผลโดยดู agglutination ของเชื้อต่อ antiserum ถ้าเป็นเชื้อโกโนเรียจะเกิด agglutination ขึ้น

(5) ทดสอบการสร้าง เบต้า-แบคตาเมส ด้วยวิธี cephalosporin solution หยดสารละลาย cephalosporin 1 หยดลงบนกระดาษกรอง ใช้ลวดแพลตตินั่มแตะโคโลนีมา 1-2 โคโลนี ป้ายบนบริเวณที่หยด cephalosporin ไว้ ถ้าเชื้อสร้าง beta lactamase บริเวณที่ป้ายเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีแดง[13]

3.3 <u>การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาเพนนิซิลิน</u> (เปรียบเทียบกับการทดสอบเบต้า-แบคตาเมส)

นำเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อที่พิสูจน์แล้วว่าเป็น <u>Neisseria gonorrhoeae</u> มาทำการทดสอบความไวต่อยาเพนนิซิลิน โดยวิธี Disc diffusion (45) เปรียบเทียบกับปฏิกริยาของ beta-lactamase ในการหา penicillin-resistant strain

<u>อาหารที่ใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อโกโนเรีย คือ</u> chocolate agar เตรียมจาก GC agar base (Difco, 2% haemoglobin (Difco), 1% Isovitalex (BBL) และ supplement VX (Difco) ส่วน

ยาเพนนิซิลินที่จะใช้ทดสอบอยู่ในรูปของ sensitivity paper disc ขนาด 10 IU (6 mg) สำเร็จรูปของ BBL

<u>จำนวนของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ</u> (Inoculum size) นำโคโลนีจากการเพาะเชื้อครั้งแรก 5-10 โคโลนี มาป้ายบนจานเพาะเชื้อแผ่นใหม่เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้จาก subculture มาใส่ใน tryptic soy broth หรือ น้ำเกลือ ให้ความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard (10^8 cells/ml) ก่อนจะนำไปใช้ นำมาย้อมแกรมดูก่อนว่าเชื้อที่จะนำไปใช้นั้นเป็น pure culture แน่หรือไม่

<u>วิธีดำเนินการทดสอบ</u> ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอแล้ว จุ่มลงใน tryptic soy broth ป้ายลงบน chocolate agar ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ โดยทำเป็น 3 แนว ปล่อยให้ผิวของอาหารที่ป้ายเชื้อแล้วแห้งเป็นเวลา 3-5 นาที ก่อนที่จะวางแผ่นยา

<u>การวาง dise</u> ใช้ฟอร์เซ็ปที่ฆ่าเชื้อโดยผ่านเปลวไฟหนีบแผ่นยาวางลงบนผิวหน้าของอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว กดแผ่นยาให้ติดสนิทบนผิวหน้าของอาหาร อบจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ candle jar

อ่านผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (Inhibition zone) ที่เกิดจากการที่ยายับยั้งการเจริญของเชื้อ

<u>การแปลผล</u> เพนนิซิลิน (10 International unit = 6 mg.)

1. ถ้าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญน้อยกว่า หรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร แปลผลได้ว่า เชื้อนี้ดื้อยาเพนนิซิลิน โดยที่เชื้ออาจจะสร้าง Beta-lactamase หรือเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา (chromosomally resistance)

2. แต่ถ้าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญมากกว่า 20 มิลลิเมตร แปลผลได้ว่า เชื้อนี้ไวต่อยาเพนนิซิลิน โดยเชื้อจะไม่สร้างเบต้า-แลคตาเมส และไม่เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา