



SEROLOGICAL SURVEY OF AMOEBIASIS BY LATEX AGGLUTINATION TEST

อารีย์ เอี่ยมดิงามเลิศ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*

จิรศักดิ์ คำบุญเรือง พ.บ., Ph.D.**

โรคบิดมีตัว (Amoebiasis) เป็นโรคที่รู้จักแพร่หลายและ เชื่อว่าเกิดขึ้นทุกแห่งในโลก องค์การอนามัยโลก(11)เชื่อว่าประชาชนในโลกจะเป็นโรคนี้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ อุบัติการณ์และความรุนแรงของแต่ละแห่งจะแตกต่างกัน ซึ่งเชื่อว่าในเขตร้อนของโรคอุบัติการณ์และอาการของโรคจะมีมากกว่าในเขตอื่น ๆ

โรคบิดมีตัวสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพซึ่งโดยทั่วไปได้แบ่งออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ Intestinal amoebiasis และ Extraintestinal amoebiasis การวินิจฉัยโรคที่แน่นอนสำหรับ Amoebiasis นั้นกระทำได้โดยการตรวจอุจจาระเพื่อหา Trophozoite หรือ Cysts ของ Entamoeba histolytica และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจแยกชนิดของอมีบา สำหรับการวินิจฉัยที่แน่นอนของ Extraintestinal amoebiasis นั้นก็คือการตรวจพบเฉพาะ Trophozoite ในอวัยวะที่ E. histolytica ทำตัวให้เกิดพยาธิสภาพขึ้น โดยทางปฏิบัติการ

ตรวจดังกล่าวกระทำโดยยากทั้งนี้เชื่อกันว่า E. histolytica trophozoite มักจะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อที่เกิดพยาธิสภาพ ฉะนั้นจึงได้มีผู้ศึกษาและคิดค้นหาวิธีอื่นเพื่อนำมาประกอบกับการวินิจฉัยโรค วิธีดังกล่าวก็คือการตรวจโดยทางน้ำเหลือง (Serological tests) การตรวจทางน้ำเหลืองที่มีผู้ศึกษากันมาแล้วเช่น

- Gel diffusion (5)
- Complement fixation (3)
- Immunoelectrophoresis (4)
- Indirect hemagglutination test (3)
- Indirect fluorescent antibody (1)

การทดสอบน้ำเหลืองโดยวิธีดังกล่าวข้างต้นให้ผลในแง่ของ Sensitivity และ Specificity ก็ แต่มิข้อเสียคือการทดสอบกระทำยาก, ใช้เวลานานและต้องมีอุปกรณ์ต่าง ๆ ครบไม่ สามารถที่จะทำการทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ บางแห่งได้ จึงได้มีผู้คิดค้นหาวิธีการทดสอบน้ำเหลืองด้วยวิธีที่ง่าย, รวดเร็ว ราคาถูกและ

* คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สามารถทำการทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ ทุกแห่ง วิธีดังกล่าวคือ Latex agglutination test ผู้เริ่มนำ Latex agglutination มาใช้คนแรกคือ Morris et al (8) ซึ่งผู้รายงานได้ศึกษาวิธีดังกล่าวกับวิธี Gel diffusion และได้สรุปไว้ว่าวิธี Latex agglutination มี sensitivity และ specificity เท่าเทียมกับวิธี Gel diffusion และสามารถใช่วิธีแทนวิธี Gel diffusion ได้ ต่อมา Monroe และคณะ (7) ได้ศึกษาวิธี Gel diffusion จาก Commercial Kits Seramoebea, Ames Company ผู้รายงานได้สรุปว่าการทดสอบด้วยวิธี Latex agglutination ให้ผลดีกว่าวิธี Gel diffusion และในปีเดียวกัน Mahajan และคณะ ได้รายงานว่าวิธี Latex agglutination มี sensitivity น้อยกว่าเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี Indirect hemagglutination และ Indirect fluorescent antibody ซึ่งผลการศึกษาของ Mahajan และคณะได้มีผู้ทำการศึกษาขึ้นอีกครั้งโดย Stamm และคณะในปี 1973 Heiblum และ Cordero (2) ก็ได้ศึกษาถึงการนำ Latex agglutination test มาใช้ในการช่วยวิเคราะห์โรคบิดมีตัวเช่นเดียวกัน นอกจากจะศึกษาถึง sensitivity และ Specificity แล้วเขายังได้ศึกษาว่าภูมิคุ้มกัน (Antibody response) จะอยู่ได้นานเท่าใดเมื่อทดสอบโดยวิธีดังกล่าว Savanat Thara Tharavani et al, (10) ก็ได้ศึกษาในทำนองเดียวกับของ Heiblum และ Cordero.

วัตถุประสงค์

จากการค้นคว้าเอกสารดังกล่าวในบทนำ ผู้เขียนมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเพื่อตรวจหาภูมิคุ้มกัน (Antibody response) ต่อโรคบิดมีตัว (invasive amoebiasis) ในน้ำเลือดจากการนำเลือดและน้ำเหลืองที่ส่งมาตรวจ VDRL ในโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเพื่อนำผลการศึกษาไปเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ได้มีผู้รายงานไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์กับผู้ที่จะนำวิธีการทดสอบดังกล่าวใช้ประกอบการพิจารณาวินิจฉัยโรคบิดมีตัวในภายหลัง

วัสดุและวิธีการ

Sera

น้ำเหลืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มาจาก blood donors ของหน่วยธนาคารเลือด และน้ำเหลืองของผู้ป่วยซึ่งส่งมาตรวจที่หน่วยภูมิคุ้มกัน วิทยาลัยการแพทย์ของหน่วยปฏิบัติการกลาง คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 887 ราย น้ำเหลืองทั้งหมดได้จากคนอายุต่ำสุด 17 ปี และสูงสุดจากผู้ใหญ่อายุ 77 ปี

Antigen

Entamoeba histolytica antigen ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็น E. histolytica strain train HK 9 เลี้ยงใน Diamond's medium

or TPS-1 medium (ดู appendix) และเป็น Axenic culture สำหรับมีบันทึภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับมาจากภาควิชา Microbiology and Immunology คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งภาควิชาดังกล่าวได้รับทอดต่อมาจาก Dr. Louise S. Diamond, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland

วิธีเตรียม Antigen

เพื่อให้ได้อิมบิเป็นจำนวนมาก ผู้เขียนได้เลี้ยงอิมบิใน Erhlenmayer Flask ซึ่งมีฝาเกลียวพลาสติกขนาด 125 มิลลิตรและมี Dimond's หรือ TP-S-1 medium ประมาณ 15 มิลลิตร เมื่อเลี้ยงอิมบิครบ 72 ชั่วโมงจึงนำ culture flask มาแช่ในน้ำเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อที่จะให้อิมบิที่เกาะอยู่ตามข้างๆ ของขวดแก้วหลุดแล้วถ่ายอิมบิซึ่งอยู่ใน medium ใส่หลอดแก้วสำหรับปั่นขนาด 50 มิลลิตร นำไปปั่นด้วย IEC International Centrifuge ด้วยความเร็ว 200 g เป็นเวลา 5 นาที อิมบิจะรวมตัวตกตะกอนอยู่ที่ก้นของหลอดแก้ว ส่วน Medium ที่อยู่ข้างบนจะถูกทิ้งไป อิมบิที่ตกตะกอนอยู่นั้นจะถูกล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.2 ประมาณ 50 มิลลิตรอีก 3 ครั้ง ด้วยวิธี Centrifugation and Sedimentation เมื่อล้างอิมบิครบ 3 ครั้ง แล้วจึงเติม PBS pH 7.2

ลงไปพอสมควรเพื่อที่สามารถที่จะให้นับจำนวนของอิมบิได้โดยใช้ haemocytometer และปรับจำนวนอิมบิให้มีจำนวน 10 ล้านตัวต่อมิลลิตร หลังจากนั้นจึงนำอิมบิไป sonicate ประมาณ 10 นาที ด้วยเครื่อง Branwill BIOSONIK III Sonicator เพื่อให้อิมบิแตก โดยขณะที่กำลัง sonicate นั้นได้แช่อิมบิในน้ำแข็งอยู่ตลอดเวลา เพื่อป้องกันความร้อนจากเครื่อง sonicator การตรวจสอบว่าอิมบิแตกหมดหรือไม่สามารถตรวจสอบได้ โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงนำ antigen ไป lyophilized จนแห้งและนำมาเก็บตู้เย็นลบ 70 องศาเซลเซียสเมื่อต้องการ จะใช้ก็ละลาย antigen ด้วย PBS pH 7.2 อีกครั้งหนึ่งให้มีปริมาตรเท่าเดิมแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเย็บ (Refrigerated Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ที่ 39900 g เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนออกไป ส่วนที่เป็นสารละลายใส่นำมาใช้เป็น antigen และนำสารละลายไปหาปริมาณของ โปรตีน โดยคิดเป็น ปริมาณของ โปรตีนโดยคิดเป็นปริมาณของ nitrogen content ต่อสารละลาย antigen 1 มิลลิตร สำหรับการหา nitrogen content ได้ใช้วิธีของ Lowry (Folin-Ciocalteu Method) สำหรับสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการหา nitrogen content ดูจาก appendix สารละลาย Antigen ก่อนที่จะนำไป sensitize จะต้องนำไปเจือจางเพื่อหา Optimal concentration ของ antigen เสียก่อน

วิธีเตรียม Stock Latex suspension

การเตรียม Stock latex suspension เอา Commercial latex suspension (Difco 0.81) มาเจือจางด้วย Glycine Buffer Saline (GBS) pH 8.3 และ Latex suspension ที่เจือจางแล้วถ้าหากนำไปเจือจางอีกด้วย GBS ในอัตราส่วน 1:100 จะต้องมีความ Optical density 0.28 ± 0.02 เมื่อวัดด้วยเครื่อง coleman Junior Spectrophotometer ที่ wavelength 650 mμ โดยใช้ Cuvette ขนาด 10 x 75 มม.

สำหรับปริมาตรของ GBS ที่จะต้องเติมลงไป ใน Commercial latex suspension (Difco 0.81) จำนวนเท่าใดนั้นอาศัยจากการคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$OD_1 \times V_1 = OD_2 \times V_2$$

เมื่อ OD_1 = Optical density ของ Stock latex suspension เมื่อเจือจางด้วย GBS ในอัตราส่วน 1:100
Optical density จะต้องเป็น 0.28 ± 0.02

V_1 = ปริมาตรทั้งหมดของ Stock latex suspension เมื่อเจือจางด้วย GBS ในอัตราส่วน 1:100

OD_2 = Optical density ของ Commercial latex suspension เมื่อเจือจางด้วย GBS 1:100

V_2 = ปริมาตรของ Commercial latex suspension เมื่อเจือจางด้วย GBS ในอัตราส่วน 1:100

เมื่อกำหนดหา V_1 ได้แล้วก็สามารถทราบได้ว่า Commercial latex suspension จะต้องนำมาเจือจางด้วย GBS อีกจำนวนเท่าใด แล้วจึงนำ Commercial latex suspension ทั้งหมดมาเจือจางด้วย GBS ตามจำนวนที่กำหนดหาได้ และเก็บเป็น Stock latex suspension ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสเพื่อเพื่อเตรียมสำหรับ sensitize ด้วย antigen ต่อไป

Sensitization

วิธี sensitization ทำโดยนำ Stock latex suspension และสารละลาย antigen ที่เจือจางและมี Optimal concentration ในปริมาตรที่เท่ากันมาผสมกันในหลอดแก้ว ขนาด 12 x 75 มม. แล้วนำลงแช่ใน water bath 37 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยผสมให้เข้ากันเป็นครั้งคราวโดยการใช้ pasteur pipette ทุกครั้งลงเมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว sensitized latex suspension นั้นสามารถนำไปทำการทดสอบกับน้ำเหลืองได้เลย sensitized latex suspension สามารถเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสได้แต่จะต้องนำมาใช้ทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง

สำหรับ sensitization นั้นได้ทำเป็น 2 ระยะด้วยกันคือ

ระยะแรกเป็นการ sensitization เพื่อหา Optimal concentration ของ antigen ซึ่งทำโดยเอา antigen ซึ่งไม่เจือจางเลยและ antigen ซึ่งเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85% ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ผสมกับ stock latex suspension ในปริมาณเท่ากัน เมื่อ sensitize เสร็จแล้วได้นำ sensitized latex suspension ทั้งหมดไปทดสอบน้ำเหลืองซึ่งเป็น Positive control สำหรับ latex agglutination for amoebiasis โดยเฉพาะ (Serabema ของ Ames Company) และดูการตกตะกอนที่ได้ผลดีที่สุด

ระยะที่สองเป็นการ sensitize เพื่อนำไปทดสอบกับน้ำเหลืองที่จะต้องตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อออบีบา *E. histolytica* การ sensitized ครั้งนี้จะกระทำโดยเอา Stock latex suspension และ Antigen ซึ่งหา Optimal dilution ได้แล้วจากระยะแรกมาผสมกันในปริมาณที่เท่ากันและปริมาณของ sensitized latex suspension ที่เตรียมขึ้นในระยะนี้จะคิดคำนวณให้มีปริมาณเพียงพอที่จะกระทำการทดสอบ ในแต่ละครั้งเท่านั้นหรืออีกนัยหนึ่งผู้เขียนไม่พยายามที่จะเก็บ sensitized latex suspension ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสและนำมาทดสอบกับ

น้ำเหลืองภายใน 24 ชั่วโมง นั่นคือผู้เขียนพยายามใช้ Fresh sensitized latex suspension เสมอ

การทดสอบ

นำน้ำเหลืองที่ต้องการทดสอบหยดลงบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด (ซึ่งได้ต้มกับน้ำสบู่และแช่ในแอลกอฮอล์) 1 หยด แล้วจึงหยด sensitize latex suspension ลงไปประมาณ 1 หยด ผสมให้เข้ากันให้ดีโดยใช้ไม้จิ้มฟันและโดยการยกสไลด์เอียงไปมา แล้วจึงนำสไลด์ไปวางในกล่องพลาสติกซึ่งมีความชื้น โดยมีน้ำอยู่พอประมาณ ทั้งนี้เพื่อกันส่วนผสมของน้ำเหลืองและ sensitized latex suspension แห้ง เมื่อครบ 15 นาที จึงอ่านผลโดยการดูการตกตะกอน (agglutination) สำหรับการแปลผลนั้นอาศัยดูการตกตะกอนว่ามีหรือไม่มีเท่านั้น ไม่ได้นับที่ผลการตกตะกอนว่ามีมากหรือน้อย หรือแม้แต่การ Titration ของน้ำเหลืองที่มีปฏิกิริยา ซึ่งมีการตกตะกอนอย่างมาก

การทดลองทุกครั้งจะกระทำรวมไปกับน้ำเหลืองซึ่งเป็น Positive และ Negative Control

ผลการทดสอบ

Sera: จำนวนน้ำเหลืองทั้งหมด 887 ราย ได้จากเพศชายในช่วงอายุ 20-30 ปี มาก

ที่สุดเป็นจำนวน 310 ราย รองลงมาเป็นน้ำเหลืองจากเพศหญิงช่วงอายุ 20-30 ปี เช่นเดียวกันจำนวน 173 ราย ที่เหลือกระจายตามช่วงอายุต่าง ๆ (ดูจากตารางที่ 1)

Antigen : เมื่อนำสารละลาย Antigen ไปหาปริมาณของ โปรตีน โดยคิดเทียบเป็น Nitrogen content พบว่า Antigen ที่เตรียมขึ้นใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณของ Nitrogen content ประมาณ 9300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบหา Optimal dilution ของ Antigen ที่จะนำมาใช้พบว่าการเจือจาง Antigen 1:8 ให้ผลบวกหรือมีปฏิกิริยาที่ดีที่สุด เมื่อนำ Sensitize latex suspension นั้นไปทดสอบกับน้ำเหลืองที่ให้เป็น control positive จาก Commercial Kit (Serabema ของ Ames Company)

Stock latex suspension : ในการเตรียม Stock latex suspension จาก Commercial latex suspension (Difco 0.81) ในการคำนวณพบว่าทุก ๆ 1 มิลลิลิตร ของ Commercial latex suspension (Difco 0.81) จะต้องเติม GBS pH 8.3 ลงไป 0.82 มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อนำ Stock latex suspension นี้ไปเจือจางด้วย GBS pH 8.3 ในอัตราส่วน 1:100 แล้วนำไปวัด Optical density ด้วยเครื่อง Coleman Junior Spectropho-

tometer ซึ่งใช้ Cuvette ขนาด 10 x 75 มม. จะมี Optical density 0.28 ± 0.02

จากการทดสอบ น้ำเหลือง ทั้งหมด 887 ราย พบว่ามีน้ำเหลืองที่ให้ผลบวก ทั้งหมด 91 ราย หรือคิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 10.3 ทั้งนี้พบว่าน้ำเหลืองจากเพศชายให้ผลบวก ร้อยละ 8.3 (หรือ 47 รายจากน้ำเหลือง 565 ราย) และ น้ำเหลืองจากเพศหญิง ให้ผลบวก ร้อยละ 13.7 (หรือ 44 รายจากน้ำเหลือง 322 ราย)

ถ้าหากจำแนกผลการทดสอบตามช่วงอายุ จะพบว่าในช่วงอายุ 10-20 ปี น้ำเหลืองของเพศชาย 173 ราย ให้ผลบวก 19 ราย หรือ ร้อยละ 10.9 น้ำเหลืองของเพศหญิง 94 ราย ให้ผลบวก 21 ราย หรือร้อยละ 22.3

ในช่วงอายุ 20-30 ปี น้ำเหลืองเพศชาย 310 ราย ให้ผลบวก 23 ราย หรือร้อยละ 7.4 น้ำเหลืองของเพศหญิง 173 ราย ให้ผลบวก 21 ราย หรือร้อยละ 12.1

ในช่วงอายุ 30-40 ปี น้ำเหลืองของเพศชาย 48 ราย ให้ผลบวก 3 ราย หรือร้อยละ 6.2 น้ำเหลืองของเพศหญิง 42 ราย ให้ผลบวก 1 ราย หรือร้อยละ 2.4

ในช่วงอายุ 40-50 ปี น้ำเหลืองของเพศชาย 26 ราย ให้ผลบวก 2 ราย หรือร้อยละ 7.7 น้ำเหลืองของเพศหญิง 6 ราย ไม่ให้ผลบวกเลย

ในช่วงอายุ 50-60 ปี น้ำเหลืองของเพศชาย 5 ราย ไม่ให้ผลบวกเลย น้ำเหลืองของเพศหญิง 5 ราย ให้ผลบวก 1 ราย หรือร้อยละ 20

ในช่วงอายุ 60-80 ปี น้ำเหลืองของเพศชาย 3 รายและของเพศหญิง 2 ราย รวมเป็นทั้งหมด 5 รายจะไม่ให้ผลบวกทั้งหมด

วิจารณ์

การทดสอบทางน้ำเหลืองเพื่อตรวจหาภูมิคุ้มกัน (Antibody response) ต่อเชื้อบีคิตัว *Entamoeba histolytica* ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งนี้เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะนำวิธีการทดสอบต่างๆ เหล่านี้มาเป็นเครื่องมือช่วยวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ การทดสอบต่างๆ อาทิเช่น Gel diffusion, Immunoelectrophoresis, Indirect, hemagglutination, Indirect fluorescent antibody และ Complement fixation test เหล่านี้ปรากฏว่าให้ผลดีในแง่ของ Sensitivity และ Specificity ในผู้ป่วยซึ่งเป็น Invasive amoebiasis แต่มีข้อเสียในแง่ที่ว่า การทดสอบดังกล่าวกระทำลำบากในห้องปฏิบัติการบางแห่งซึ่งไม่มีอุปกรณ์ที่ครบ นอกจากนั้นการทดสอบต้องใช้เวลานานวันจึงจะทราบผลเป็นงานซึ่งต้องการความละเอียดละออและอาศัยประสบการณ์เกี่ยวกับวิธีทำพอสมควร จึงได้มีผู้ที่พยายามคิดค้นหาวิธีทดสอบที่ง่ายกว่า, รวดเร็วกว่า, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยากและข้อสำคัญที่สุดก็คือต้องให้ผลดีทั้งในแง่ของ Sensitivity และ Specificity วิธีดังกล่าวที่นิยมใช้กันมากที่สุดก็คือวิธี Latex agglutination

ในปีคริสต์ศักราช 1970 Morris และ Powell (8) ได้ศึกษาเปรียบเทียบเป็นครั้งแรก โดยทำการทดสอบน้ำเหลืองของผู้ป่วย ซึ่งเป็น Invasive amoebiasis จำนวน 250 ราย โดยวิธี Latex agglutination และ Gel diffusion ผู้รายงานพบว่าน้ำเหลือง 242 ราย ให้ผลบวก โดยการทดสอบทั้ง 2 วิธี และได้แนะนำให้ใช้วิธี Latex agglutination ซึ่งง่ายและสะดวกเพื่อการทดสอบและช่วยในการวิเคราะห์โรคในแหล่งที่บีคิตัวยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขและการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างอื่น ๆ ยังกระทำไม่ได้ ต่อมา Monroe และคณะ (7) ได้ศึกษาเปรียบเทียบ เพื่อประเมินผลการใช้ Latex agglutination test ในผู้ป่วยซึ่งเป็น Invasive amoebiasis ในบุคคลทั่วไปและบุคคลซึ่งกลับมาจากเวียตนาม เขาพบว่า การทดสอบน้ำเหลืองของบุคคลในกลุ่มแรก ให้ผลถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 2 ให้ผล 18 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ Antigen E. histolytica strain HK 9 และ 9.5 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ Antigen ซึ่งได้รับมาจาก Amoebiasis Research Institute จาก South Africa และในกลุ่มที่ 3 เขาพบว่าผู้ที่กลับจากเวียตนาม 63 คน จะมีเชื้อบีคิตัวถึง 26 คน และในจำนวน 26 คนนี้เมื่อทำการทดสอบทางน้ำเหลืองให้ผลบวกถึง 39 เปอร์เซ็นต์ ผู้รายงานได้สรุปว่าการทดสอบด้วยวิธี Latex agglutination ให้ผลดีกว่า Gel diffusion และถ้าหากใช้

Antigen strain ต่างกันอาจจะให้ผลบวกต่างกันด้วย ส่วนข้อเสียของการทดสอบนั้นคือถ้าหากนำวิธีทดสอบนี้ไปทดสอบกับน้ำเหลืองของกลุ่มคนที่เคยเป็น โรคบิดมีตัวมาก่อน จะทำให้อัตราการพบผลบวกสูงขึ้นและนอกจากนั้น อาจจะมี False positive ร่วมด้วย

ในปีเดียวกันนี้ Mahajan และคณะ (6) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการทดสอบ น้ำเหลือง ของผู้ป่วยซึ่งเป็นฝัปกินดิบโดยวิธี Latex agglutination, Indirect fluorescent antibody และ Indirect hemagglutination เขาพบว่า Latex agglutination test ก่อนข้างจะ Sensitive น้อยกว่าทั้ง 2 วิธีดังกล่าว แต่ Specificity ของการทดสอบทั้ง 3 วิธีได้ผลเท่าเทียมกัน ผู้รายงานได้แนะนำให้ใช้วิธี Latex agglutination เป็น screening test สำหรับ Invasive amoebiasis ในการศึกษาครั้งนี้เขาพบว่าในผู้ป่วยซึ่งเป็นฝัปกินดิบ, เป็นฝักล้างได้และในบุคคลธรรมดาจะได้ผลบวก ในการ ทดสอบ โดยวิธี Latex agglutination คิดเป็นร้อยละ 84.2, 75 และ 16.7 ตามลำดับต่อมา Stamm และคณะ (9) ได้ศึกษาการทดสอบน้ำเหลือง โดยวิธี Latex agglutination โดยใช้ Commercial Kit (Seramoeba) ในคนที่เคยเป็น โรคบิดมีตัวมาแล้ว, ในผู้ป่วยซึ่งกำลังเป็น Invasive amoebiasis เขาพบว่าในกลุ่มที่หนึ่ง จะให้ผลบวก 42 ใน 102 คน (41.2 เปอร์เซ็นต์) ในกลุ่มที่สองจะให้ผลบวก 11 ใน 14 คน

(78.6 เปอร์เซ็นต์) และในกลุ่มที่สามไม่ให้ผลบวกกับการทดสอบเลยในจำนวนทั้งหมด 22 คน การศึกษาครั้งนี้ผู้รายงานได้สรุปผลคล้ายกับการศึกษา Latex agglutination ของ Mahajan และคณะ (6) คือ Latex agglutination test มี sensitivity น้อยกว่าวิธีอื่นเล็กน้อย Heiblum และ Cordero ในปีคริสต์ศักราช 1973 พบว่าในผู้ป่วยซึ่งเป็น Invasive amoebiasis 100 คน เมื่อทำการทดสอบน้ำเหลืองด้วยวิธี Latex agglutination จะให้บวกถึง 96 เปอร์เซ็นต์ และภูมิคุ้มกัน (Antibody response) นี้จะพบว่าเริ่มลดลงและหมดไปภายใน 3 ถึง 6 เดือน ประมาณ 57 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนที่ให้ผลบวกทั้งหมด แต่ที่เหลืออีก 43 เปอร์เซ็นต์ยังพบว่ามีภูมิคุ้มกัน ยังคงมีอยู่หลัง 6 เดือน สำหรับการทดสอบน้ำเหลืองในคนปกติ 200 คน พบว่าให้ผลบวก 13 เปอร์เซ็นต์ แต่ในจำนวน 8 เปอร์เซ็นต์เคยเป็นโรคบิดมีตัวมาก่อน แต่ที่เหลืออีก 5 เปอร์เซ็นต์ให้ผลเป็น False positive ที่แท้จริง S. Tharavanij (10) ได้ทำการทดสอบน้ำเหลืองจากธนาคารเลือดของสภากาชาดไทย จำนวนทั้งสิ้น 100 คน พบว่าให้ผลบวก 2 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับผู้ป่วยซึ่งป่วยด้วยโรคอื่นจะให้ผลบวก 4.7 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนั้นผู้รายงานได้พบว่าภูมิคุ้มกัน (Antibody response) ในผู้ป่วยซึ่งเป็นโรคฝัปกินดิบไม่สามารรถที่จะตรวจพบ 4 เดือนภายหลังจากที่ได้รับการรักษา

สำหรับการศึกษาค้นคว้า รายงาน ได้ ทำการทดสอบน้ำเหลืองที่ได้จากธนาคารเลือดและน้ำเหลืองที่ใส่ส่งมาทำการตรวจ VDRL ของโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 887 รายและพบว่าได้ผลบวก 91 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 10.3 ถ้าหากจำแนกผลตามอายุและเพศแล้วพบว่าเพศหญิงให้ผลบวกร้อยละ 13.7 (44/322) มากกว่าในเพศชายซึ่งพบเพียงร้อยละ 8.3 (47/565) และในช่วงอายุ 10-30 ปี ปรากฏว่าให้ผลบวกในการทดสอบมาก ถ้าหากจะเปรียบเทียบผลการศึกษาค้นคว้าจากรายงานที่ได้สรุปไว้เบื้องต้นแล้วจะ เห็น ว่าผลบวกในการทดสอบมีจำนวนใกล้เคียงกัน จะมีแตกต่างที่ค่อนข้างจะเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Savanat Tharavanij (10) ที่ตรวจพบว่าได้ผลบวกเพียง 2 เปอร์เซนต์ ซึ่งผู้รายงานมิได้บอกว่าได้ทำการตรวจอุจจาระเพื่อหาเชื้อบิคมิตัวหรือไม่ ถ้าหากพิจารณาถึงสิ่งแวดล้อมแล้วอัตราการตรวจซึ่งให้ผลบวกน่าจะสูงสำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนและเชื่อกันว่าโรคมิตีตัวจะระบาด ได้มากกว่า ในเขตอื่นของโลก เช่นเดียวกันในการศึกษาค้นคว้าผู้เขียนมิได้ ทำการตรวจอุจจาระของบุคคลซึ่งการทดสอบน้ำเหลืองให้ผลบวกโดยวิธี Latex agglutination และมีได้ตามประวัติของบุคคลดังกล่าวว่าเคยเป็น โรคมิตีตัวมาก่อนหรือไม่ ฉะนั้นผู้เขียนคิดว่าอัตราการตรวจพบครั้งนี้จึง

ค่อนข้างสูงซึ่งสอดคล้องกับผู้ที่ได้ศึกษาเรื่องนี้มาก่อน สำหรับการทดสอบน้ำเหลืองของผู้ที่ให้ผลบวกถ้าหากจะสรุปโดยอ้างถึงผลซึ่งผู้ศึกษา มาก่อนดังกล่าวข้างต้น จะเน้นถึงการตรวจพบที่ให้ผลบวกว่าอาจเป็นไปได้ 3 ประการด้วยกัน คือบุคคลดังกล่าวได้เคยเป็นโรคมิตีตัวมาก่อนหรือกำลังเป็นโรคมิตีตัว (Invasive amoebiasis) หรือมิได้เป็นอย่างหนึ่งอย่างใดดังกล่าวแต่ การ ทด สอบ นั้น ให้ผล เป็น แต่เพียง False positive

ประยุทธ์ วิฑิตะสกล และคณะ (12) ได้ทำการสำรวจโรคพยาธิที่ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าอุบัติการณ์ของผู้ที่มี *E. histolytica* มีอัตรา ร้อยละ 1.2 ฉะนั้นจะเห็นว่าจำนวน False positive และจำนวนของผู้ที่เคยเป็นโรคมิตีตัว (Invasive amoebiasis) ก็ยังคงมีอัตราค่อนข้างสูงและจากการที่ผู้เขียน มิได้ถาม ประวัติเจ้าของน้ำเหลืองว่าเคยเป็นโรคมิตีตัวหรือไม่ ฉะนั้นผู้เขียนจึงไม่สามารถที่จะบอกจำนวนที่ให้ผลการทดสอบเป็น False positive ที่แน่นอนได้ การศึกษาค้นคว้าผู้เขียนพบว่าการทดสอบน้ำเหลืองด้วยวิธี Latex agglutination เป็นวิธีที่ง่ายทดสอบได้รวดเร็วจึงคิดว่า จะเป็นวิธีการทดสอบ ทางห้องปฏิบัติการ อันหนึ่งที่สามารถจะทำได้ในโรงพยาบาลต่างๆ ได้ ผู้เขียนเกรงจะเน้นถึงการแปรผลดังที่ได้สรุปมาข้างต้นแล้ว ฉะนั้นเมื่อแพทย์ทำการทดสอบน้ำ

เหลืองให้ผลบวกวิธีนี้แพทย์มักจะตกใจสนใจ
ไปอย่างแน่นนอนว่าบุคคลผู้นั้นกำลังเป็นโรคบิด
มีตัว แพทย์ควรจะตั้งอาการอาหาร, อาการ
แสดงและสิ่งตรวจพบ รวมทั้งการถาม ประวัติ
ประกอบกับการพิจารณาการวิเคราะห์โรคเพราะ

Heiblum และ Cordero (2) และ Savanat
Tharavanij (10) พบว่าภูมิคุ้มกัน (Antibody
response) ของโรคนี้เริ่มลดและไม่สามารถ
ตรวจพบได้โดยวิธี Latex agglutination ใน
เวลา 6 เดือน หลังจากรักษาหายแล้ว.

ตาราง

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบของน้ำเหลืองจำแนกตามอายุและเพศ

ช่วงอายุ (ปี)	ชาย	ผลบวก ในชาย	คิดเป็น %	หญิง	ผลบวก ในหญิง	คิดเป็น %	รวมเพศ หญิงและชาย	ผลบวก	คิดเป็น %รวม
10-20	173	19	10.9	94	21	22.2	267	40	14.9
20-30	310	23	7.4	173	21	12.3	483	44	9.1
30-40	48	3	6.3	42	1	2.4	90	4	4.4
40-50	26	2	7.7	6	0	0	32	2	6.2
50-60	5	0	0	5	1	20	10	1	10
60-70	1	0	0	1	0	0	2	0	0
70-80	2	0	0	1	0	0	3	0	0
	565	47	8.3	322	44	13.7	887	91	10.3

Appendix

ส่วนประกอบของ Diamond's or TPS-1-monophasic medium

Trypticase (BBL)	1.00 g
Panmede, liver digest (P&B)	2.00 g
Glucose	0.50 g
L-cysteine monohydrochloride	0.10 g
Ascorbic acid	0.02 g
Sodium chloride	0.50 g
Potassium phosphate, monobasic	0.06 g
Potassium phosphate, dibasic, anhydrous	0.10 g

Water, glass distilled, to make

87.50 ml

pH adjusted to 7.0 with 1 N.NaOH

สารละลายข้างบนเข้า autoclave 10 นาทีที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส)
 ทั้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำเกลือของม้า 10 มิลลิกรัมและ Vitamin mixture 107,2.5 มิลลิกรัม
 โดยวิธี aseptic technique จากนั้นกรองด้วย Sietz filtration อีกครั้ง

วิธีเตรียม Glycine buffer saline (GBS) pH 8.3

Sodium chloride 9 g

Calcium chloride 1 g

Glycine 7.51 g

Water q.s. 1000.0 g

แล้วปรับให้ได้ pH 8.3 โดยใช้ 1 N. NaOH

Abstract

It is generally belived that the incidence of amoebiasis in Thailand is rather high simply because the country itself is located in the tropic region of the global world. In the present study attempt had been made to find out the incidence of amoebiasis by latex agglutination test Serum samples were obtained from the donors of the Blood Bank and from the subjects whose sera were tested for VDRL at Chiang Mai Hospital. *Entamoeba histolytica* strain HK 9 was used as the antigen. The amoebae were grown axenically in Diamond's or TPS-1 medium. After harvesting, the amoebae were washed in PBS pH 7.2, sonicated in ice-bath, and then lyophilized and stored in -20°C . For sensitization of the standard stock latex suspension (Difco 0.81) lyophilized amoebae were resuspended

in PBS pH 7.2 and the optimal dilution of the antigen was tested. It was found that the dilution was 1:8 and the protein content was approximately about 1 mg/ml. An equal volume of the standard stock latex solution and optimal dilution of antigen were incubated in a water bath for 30 minutes. This sensitized latex suspension was used immediately or within 24 hours if the solution was kept in a refrigerator (4°C)

When the test was performed and equal volume of one drop of sensitized latex suspension and serum were thoroughly mixed on a clean glass slide and stood in a moisture chamber for 15 minutes. For each batch of the test, a positive and a negative control sera were also tested. The agglutination was used as an indicator for the positive reactivity

The results revealed that of 887 serum samples tested, there were 91 cases or 10.3 percent showed the positive reaction, it was interpreted that these subjects had the antibody response against *E. histolytica* for either a recent or a previous infection. However a false positive reaction could not be ruled out.

เอกสารอ้างอิง

1. Goldman M., and Gloason, N.N. Antigenic analysis of *E. histolytica* by means of fluorescent antibody IV. Relationships of two strains of *E. histolytica* and one of *E. hartmanni* demonstrated by cross-absorption techniques. *Journal of Parasitology*, 48:778, 1962 cited by Halpern 1967.
2. Heiblum, M., Borges, C.C.: Evaluation of the latex-agglutination for the diagnosis of invasive amoebiasis. *Disease Colon Rectum*, 16:368-370, 1973.
3. Kossel J.P., William P. Lewis, C. Molina Pasquel and Jerrold A. Turner. July. Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 14:540-50, 1965.
4. Krupp IM. Immunoelectrophoretic analysis of several strains of *E. histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 15 : 849-854, 1966 cited by Savanat 1969.
5. Maddison S.E. Characterization of *Entamoeba histolytica* Antigen Antibody Reaction by Gel Diffusion. *Experimental Parasitology*, 16 : 224-235, 1965 cited by Halpern 1967.
6. Mahajan RC, Ganguly N.K. and Chitkara N. L. Comparative evaluation of Latex agglutination test in Serodiagnosis of amoebiasis. *Indian Journal Medical Research*, 60:372-376, 1972.
7. Monroe L.S., Korn E.R. and S.J. Fitzwilliam. A comparative study of the latex agglutination and gel diffusion precipitin test in the diagnosis of amoebic liver abscess. *American Journal Gastroenterology* 58:52-57, 1972.
8. Morris M.N, and S.J. Powell. A rapid latex-agglutination test for amoebiasis. *South Africa Medical Journal* 44:594-595, 1970.
9. Stamm W.P., M.J. Ashley and S.N. Parelker Evaluation of Latex agglutination test for amoebiasis. *Trans. R. Soc Trop Med Hyg* 67:211-3, 1973.
10. Tharavanij S., Tantivanich S. and Klongkamnuakarn Latex agglutination test for amoebiasis. *Journal Medical Associated Thai* 57 : 294-300, 1974.
11. World Health Organization Technical Report Series. No 421 Amoebiasis Report of a WHO Expert Committee. pp. 1-52, 1969.
12. ประยุทธ์ วัชรสุต และคณะ: การสำรวจพยาธิลำไส้ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงใหม่ เวชสาร 12 : 99-223 พ.ศ. 2516.