

# การเปรียบเทียบวิธีย้อมสีเชื้อ MYCOBACTERIUM LEPRAE

มันทนา ตีสุวรรณ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

เนตร สุวรรณคฤหาสน์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) Cert Imm.\*

## บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบวิธีย้อมเชื้อ *Mycobacterium leprae* โดยวิธี Kinyoun และ Ziehl Neelsen จาก skin smear ผู้ป่วยโรคเรื้อนชนิด lepromatous leprosy (L.L.) 68 ราย Borderline leprosy (B.L.) 8 ราย เวลาใช้ 3% และ 0.03% HCl ใน 95% ethyl alcohol เป็นน้ำยา decolorize และใช้เวลา de colorize นาน 3 และ 5 วินาที ปรากฏผลดังต่อไปนี้ ใช้ 3% acid alcohol decolorize นาน 5 วินาทีจะเกิด over decolorize ทั้งสองวิธี ในเวลาเท่ากัน เมื่อเปลี่ยนมาใช้ 0.03% acid alcohol พบว่าทั้งสองวิธีเกิด over decolorize น้อยกว่าใช้น้ำยา 3% acid alcohol และใช้น้ำยา 3% acid alcohol แต่ลดเวลาล้างเหลือ 3 วินาที ปรากฏว่าทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นการย้อมเชื้อ *Mycobacterium leprae* โดยวิธี Kinyoun และ Ziehl Neelsen จึงใช้ได้ทั้งสองวิธี

## บทนำ

เชื้อ *Mycobacterium leprae* เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน (leprosy) Hansen เป็นผู้ค้นพบในปี ค.ศ. 1874 ซึ่งแสดงให้เห็นตัวเชื้อโดยย้อมด้วยสี acid fast เนื่องจาก *Mycobacterium leprae* เป็น weakly acid fast organism ดังนั้นการย้อม acid fast จำเป็นจะต้องใช้วิธีที่เหมาะสม สำหรับห้องปฏิบัติการ เฉพาะโรคเรื้อนมักจะใช้วิธี Ziehl Neelsen สำหรับโรงพยาบาลทั่วไปใช้วิธี Kinyoun

สำหรับงานวิจัยนี้ ได้เปรียบเทียบวิธีย้อม Ziehl Neelsen กับ Kinyoun เพื่อจะศึกษาว่าวิธีใดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

\* ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและวิธีการ

สีที่ใช้เป็น basic fuchsin ที่มี absorption ระหว่าง 552-556 m $\mu$

1. Ziehl Neelsen

basic fuchsin 3 กรัม

ละลายใน ethyl alcohol 10 มล.

เติม 5% aqueous solution phenol 90 มล.

2. Kinyoun

basic fuchsin 4 กรัม

ละลายใน 95% ethyl alcohol 20 มล.

น้ำกลั่น 100 มล.

phenol 8 มล.

## 3. 3% HCl in 95% ethyl alcohol และ 0.03% HCl in 95% ethyl alcohol

การเตรียม Slide

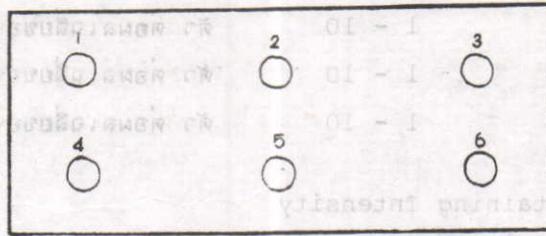
- ก. ทำความสะอาดบริเวณที่จะตรวจโดยผิวหนังของคนไข้ด้วย 70% alcohol ปล่อยให้แห้ง
- ข. บีบผิวหนังบริเวณที่ต้องการเก็บเชื้อให้แน่น เพื่อป้องกันเลือดออก
- ค. เอามีดกรีดลงบนผิวหนังที่บีบถึงชั้น dermis แล้วหมุนบิดมีดเพื่อให้น้ำออกจากepi-dermis และติดปลายมีด
- ง. smear ลงบน slide และแพร่กระจายเป็นจุดวงกลม ทั้ง slide ให้แห้งในบรรยากาศ คนไข้คนหนึ่ง เก็บ 5 หรือ 6 ที่ หู, หน้า, แขน, ขา หลัง (ดังรูป 1 และ 2) ที่มีลักษณะติดเชื้อโรคเรื้อน

วิธีย้อม

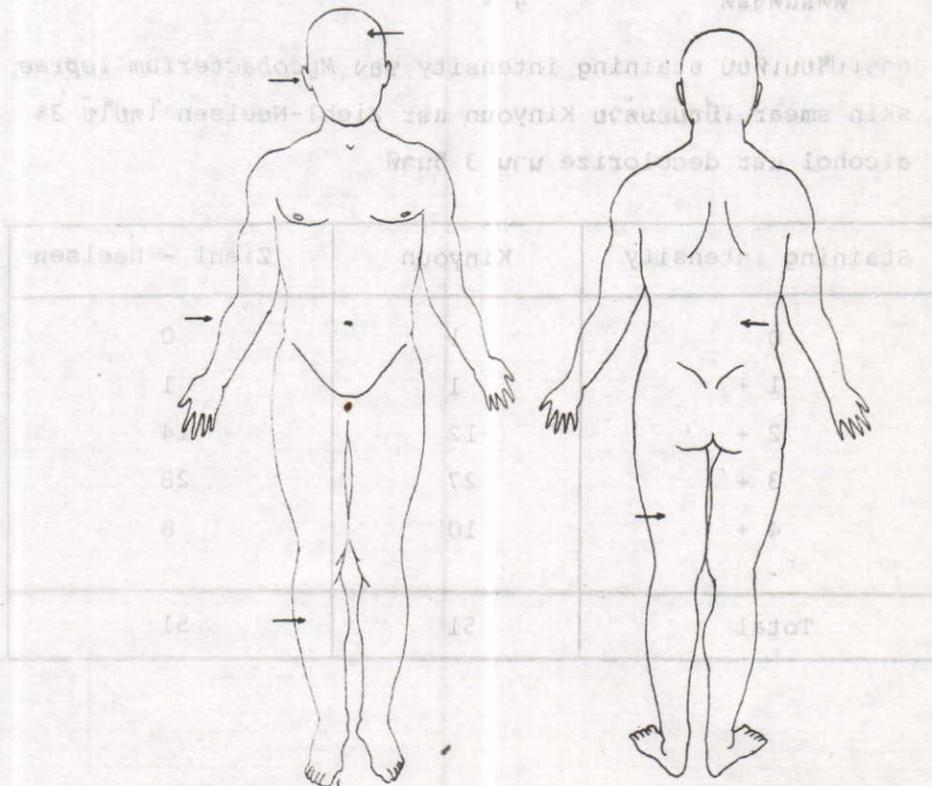
1. Fix smearโดยการลนไฟอ่อน ๆ
2. ราวด้วยสี basic fuchsin สำหรับวิธี Ziehl Neelsen จะต้องลนไฟอย่าให้สีเดือด วิธี Kinyoun ไม่ต้องลนไฟ ทั้งสองวิธีใช้เวลาประมาณ 5 นาที
3. ล้างด้วยน้ำให้สีออกให้มากที่สุด
4. ล้างด้วย acid alcohol 0.03% และ 3% ใช้เวลาในการล้างนาน 3 และ 5 วินาที (เนื่องจาก 'film' ที่ติดบน slide บางมาก)

5. ล้างด้วยน้ำ
6. ย้อมทับด้วย Methylene blue 1 - 2 นาที
7. ล้างด้วยน้ำและตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

รูปที่ 1 แสดงถึงการ smear slide และตำแหน่งของตัวอย่างตรวจ



รูปที่ 2 แสดงถึงตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างมาย้อมหาเชื้อ *Mycobacterium leprae* เพื่อจะให้ทราบว่า 6 จุดนั้นมาจากส่วนใดของร่างกาย



ผลการทดลอง

การอ่านดู Slide และนับเชื้อตามวิธีของ Modification of Cochrane's index

ดัชนี	จำนวนเชื้อที่พบ
6 +	มากกว่า 1,000 ตัว ต่อผลเฉลี่ยของ microscopy field
5 +	100 - 1,000 ตัว ต่อผลเฉลี่ยของ microscopy field
4 +	10 - 100 ตัว ต่อผลเฉลี่ยของ microscopy field
3 +	1 - 10 ตัว ต่อผลเฉลี่ยของ microscopy field
2 +	1 - 10 ตัว ต่อผลเฉลี่ยของ 10 microscopy field
1 +	1 - 10 ตัว ต่อผลเฉลี่ยของ 100 microscopy field

การอ่านเพื่อดู staining Intensity

ไม่ติดสีแดงเลย คือ	0
ติดสีแดงจาง ๆ	1 +
ติดสีแดงปานกลาง	2 +
ติดสีแดงเข้มขึ้น	3 +
ติดสีแดงสด	4 +

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบ staining intensity ของ *Mycobacterium leprae* จาก skin smear เมื่อย้อมด้วย Kinyoun และ Ziehl-Neelsen โดยใช้ 3% acid alcohol และ decolorize นาน 3 วินาที

Staining intensity	Kinyoun	Ziehl - Neelsen
0	1	0
1 +	1	1
2 +	12	14
3 +	27	28
4 +	10	8
Total	51	51

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบ staining intensity ของ *Mycobacterium leprae* จาก skin smear เมื่อย้อมด้วย Kinyoun และ Ziehl-Neelsen โดยใช้ 3% acid alcohol และใช้เวลา decolorize 5 วินาที

Staining intensity	Kinyoun	Ziehl-Neelsen
0	0	0
1 +	0	5
2 +	4	18
3 +	20	1
4 +	0	0
Total	24	24

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบ staining intensity ของ *Mycobacterium leprae* จาก skin smear เมื่อย้อมด้วย Kinyoun และ Ziehl-Neelsen โดยใช้ 0.03 % acid alcohol และ decolorize นาน 5 วินาที

Staining intensity	Kinyoun	Ziehl - Neelsen
0	0	-
1 +	1	1
2 +	0	0
3 +	0	4
4 +	8	4
Total	9	9

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบ Bacterial Index เมื่อย้อมด้วย Kinyoun และ Ziehl - Neelsen โดยใช้ความเข้มข้นของ acid alcohol ต่างกัน และเวลา decolorize ต่างกัน

Bacterial Index	3 % acid alc 3 sec		3 % acid alc 5 sec		0.03% acid alc 5 sec		Total	
	K	Z-N	K	Z-N	K	Z-N	K	Z-N
6 +	4	6	3	5	-	-	7	11
5 +	12	15	10	8	6	6	28	29
4 +	12	13	3	4	2	2	17	19
3 +	6	3	3	3	-	-	9	6
2 +	6	9	3	4	-	-	9	13
1 +	10	5	2	-	1	1	13	6
0	1	-	-	-	-	-	1	-
Total	51	51	24	24	9	9	84	84

alc = alcohol

K = Kinyoun

sec = second

Z-N = Ziehl-Neelsen

วิจารณ์

การอ่านสไลด์นั้น เป็นการกำหนดเองว่าความเข้มข้นเท่าไร จะให้เป็น 0, 1+, 2+, 3+ และ 4+ ซึ่งแต่ละคนคงจะอ่านผิดกัน จากความเป็นจริง ถ้าจะแบ่ง 1+ และ 2+ เป็นติดสีปานกลาง และ 3+, 4+ ติดสีที่ง่าย แก่การอ่าน แต่เมื่อคำนึงถึงความถี่ของความแตกต่างแล้วอ่าน 0, 1+ - 4+ เป็นการอ่านที่มีตัวอย่างตรวจได้จากคนไข้นิคมแมคเคน เกาะกลาง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นชนิด Lepromatous leprosy (L.L.) 68 ราย Borderline leprosy (B.L.) 8 ราย รวมคนไข้ทั้งหมด 76 ราย บางรายก็เก็บตัวอย่างตรวจซ้ำตามเวลาที่แพทย์สั่ง

จากการใช้ 3% acid alcohol decolorize นาน 3 วินาที และดูความเข้มข้นของสี (Staining intensity) ที่ติดตัวเชื้อ พบว่าการติดสีค่อนข้างสวยงาม (3+ และ 4+) จากตัวอย่างตรวจทั้งหมด 51 ราย ไม่มีความแตกต่างกันดังตารางที่ 1 และจากการใช้ 3% acid

alcohol และ decolorize นาน 5 วินาที จากตัวอย่างที่นำมาย้อม 24 ราย พบว่าความเข้มข้นของสี Kinyoun จะทนและยังติดสีดี สำหรับ Ziehl-Neelsen จะติดสีดีกว่าปกติดังตารางที่ 2 เมื่อใช้กรดเจือจางลงเหลือ 0.03% และใช้เวลา decolorize นาน 5 วินาที จากตัวอย่างตรวจ 9 ราย ปรากฏผลทั้งสองวิธีติดสีสวยงามเหมือนกันทั้งสองวิธี ดังตารางที่ 3

เมื่อเปรียบเทียบการนับตัวเชื้อ (bacterial index) ของสไลด์ทั้งหมดที่ decolorize ด้วย acid alcohol ในความเข้มข้น 3% และ 0.03% ใช้เวลานาน 3, 5 วินาที จากตัวอย่างตรวจที่นำมาศึกษา 34 ราย พบว่าเป็นตัวเลขที่ไม่แตกต่างกันในแง่สถิติ ดังตารางที่ 4

จากตารางที่ 1 พบ 1 สไลด์มี staining intensity เป็น 0 คือเชื้อติดสีน้ำเงินรายนี้ เป็นเพราะเจริญไม่เต็มที่จึงไม่ติดสี acid fast. Nyka, Harada จึงได้คิดวิธีย้อมสีวิธีใหม่ โดยการ oxidase เสียก่อน จะย้อม acid fast stain เพื่อจะให้พบ acid fast bacilli มากขึ้น

จากตารางที่ 2 หลังจากใช้ 3% acid alcohol นาน 5 วินาที พบว่าวิธี Kinyoun ติดสีดีกว่า Ziehl-Neelsen เล็กน้อย อาจเป็นเพราะ Kinyoun มีความเข้มข้นของสีมากกว่า Ziehl-Neelsen

จากตารางที่ 3 จะพบ 1 รายที่มี staining intensity 1+ ทั้งสองวิธีนี้ เนื่องจากสไลด์นี้มี cell น้อย ดังนั้นเมื่อ decolorize จึงทำให้สีจาง ผิดไปจากรายอื่น ๆ ได้

ดังนั้นการย้อมสีวิธี Kinyoun และ Ziehl-Neelsen ไม่ได้แตกต่างกัน แต่วิธีย้อมสำคัญกว่าคือ จะต้องระวังในการ decolorize ไม่ให้เกินหรือลดความเข้มข้นของ acid ลง จะทำให้การย้อมทั้งสองวิธีใช้ได้ ไม่มีความแตกต่างกันสามารถนำไปใช้ย้อมติดตามผลการรักษา และวิจัยคนไข้โรคเรื้อนได้เป็นอย่างดี

#### เอกสารอ้างอิง

1. Carpenter, C.M. and Miller, J.N. The Bacteriology of Leprosy. In Leprosy In Theory And Practice, 1969, 2<sup>nd</sup> edition, The Williams And Wilkins Co., Baltimore : 13 -23.
2. Cochrane, R.G. Techniques of Examination. In Leprosy In Theory And Practice, 1969, 2<sup>nd</sup> edition, The Williams And Wilkins Co., Baltimore 612 - 619.
3. Cowdry, E.V. (1979) Cytological Studies on Globin in Leprosy. Int. J. Lepr. 46(2) : 175 - 201.
4. Harada, K. (1973) Effect of Prior Oxidation on the Acid-fastness of Mycobacteria. Stain Technol. 48: 269 - 273.
5. Nyka, W. (1976) Method for staining both acid-fast and chromophobic bacilli with carbol fuchsin. J. Bact. 93 : 1458 - 1460.

## A B S T R A C T

COMPARISON OF STAINING OF *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

Montana Desuwan B.Sc. (Med.Tech)

Netr Suwankrughasn B.Sc (Med.Tech) Cert.Imm. \*

The comparison of staining *Mycobacterium lepre* by Ziehl-Neelsen and Kinyoun Method, from 68 cases leprosy and 8 borderline leprosy were stained by using 3% HCl in 95% ethyl alcohol as decolorizer for 3 and 5 seconds. The both methods bacilli were over decolorized by 3% acid alcohol, at 5 seconds. In the equal time of decolorization Ziehl-Neelsen method was over decolorized than Kinyoun method. When used 0.03% acid alcohol as decolorizing agent for 5 seconds the both methods were less, (over) decolorized than 3% acid alcohol. The both methods of staining were not difference, found the brilliant red slender rod of *Mycobacterium leprae* in solid, fragmented and beading form. Each of them can use in the laboratory for diagnosis and prognosis of leprosy.

---

\* Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.