

การแยกเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 โดยใช้ ALKALINE PEPTONE WATER

ยุทธการ ชะนันโต
ศักดิ์จิต ชุตีพงษ์วิเวท
เกษร บุญยรักษ์โยธิน
วรางคณา เยี่ยมสกุล

บทคัดย่อ : งานวิจัยนี้ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 ในอาหาร Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar (TCBS) กับการเพาะเชื้อใน Alkaline peptone water (APW) ก่อน แล้วนำไปเพาะเชื้อต่อใน TCBS จากสิ่งส่งตรวจ (rectal swab) จำนวน 5,287 ราย ในช่วงเวลา 12 เดือน พบว่าการเพาะเชื้อใน TCBS อย่างเดียวพบเชื้อ 215 ราย (4.06%) ในขณะที่เพาะเชื้อใน APW ร่วมกับ TCBS พบเชื้อ 351 ราย (6.63%) ระยะเวลาที่พบเชื้อสูงสุด ได้แก่ เดือนมีนาคม ถึง กรกฎาคม 2533 จากสิ่งส่งตรวจ 3721 ราย ตรวจพบเชื้อรวมกันได้ 198 ราย (5.32%) และ 334 ราย (8.98%) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อใน APW ช่วยให้ตรวจพบเชื้อได้มากขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจึงควรเพาะเชื้อ *Vibrio cholerae* ใน APW ก่อนแล้วจึงเพาะเชื้อใน TCBS

คำรหัส : อหิวาตกโรค, การเพาะเชื้อจากอุจจาระ

Abstract : Isolation of *Vibrio cholerae* O1 by using Alkaline Peptone Water.

Yananto Y, Chutipongvivate S, Bunyarukyothin G and Aiumskul V.

The objective of this study is to compare culture systems of *Virio cholerae* O1 between a) directly to Thiosulfate Citrate Bilesalt Sucrose agar (TCBS) and b) first to Alkaline Peptone Water (APW) and then to TCBS. Out of 5287 rectal swab specimen, it was found that 215 (4.06%) were positive when cultured in TCBS alone. However, culturing in APW and then TCBS gave higher positive rate (351, 6.63%). Pandemic period was found to be during March and July (3721 specimen) positive rate was obtained during this time, 334 specimens (8.98%) for APW and TCBS, 198 (5.32%) for TCBS alone. The result indicated that the APW might be useful in bacterial routine culture of *Vibrio cholerae* O1 by enriching the microorganism before culturing in TCBS .

Keyword : *Vibrio cholerae*, stool culture.

ฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 เชียงใหม่

* Clinical Pathology Section. Regional Medical Sciences Center 5, Chiang Mai.

บทนำ

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ.2523-2532) จำนวนผู้ป่วยอุจจาระร่วงที่ กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุขได้รายงานไว้ มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี⁽¹⁾ จากอัตราการป่วย 483.2 ต่อประชากรแสนคน อัตราการตาย 0.2% ในปี 2523 และเพิ่มขึ้นเป็น 1252.7 ต่อประชากรแสนคน อัตราการตาย 0.1% ในปี 2532 ซึ่งพบว่าเพิ่มขึ้นในทุกภาคของประเทศเช่นกัน สำหรับภาคเหนือมีอัตราการป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วง 1409.5 ต่อประชากรแสนคน⁽¹⁾

ผู้ป่วยอหิวาตกโรคจะมีอาการถ่ายอุจจาระเป็นน้ำมากกว่า 2 ครั้งใน 1 วัน, สีของน้ำอุจจาระคล้ายกับน้ำขาวขำและมีเซลล์เยื่อเมือกปะปน, คลื่นไส้, อาเจียน, ปวดท้อง, ร่างกายสูญเสียน้ำหนัก และ กลืนแรม่ ถ้ารักษาไม่ทันท่วงทีอาจมีอาการช็อกและเสียชีวิตได้ เนื่องจากผู้ป่วยอหิวาตกโรคมักกว่า 90% มีอาการไม่รุนแรงหรือมีอาการไม่ชัดเจน⁽²⁾ การวินิจฉัยจึงต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการการเพาะเชื้อ ซึ่งห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงเชื้อในอาหาร Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) เพียงอย่างเดียว ส่วนน้อยใช้การเพาะเชื้อใน Alkaline peptone water (APW) ก่อน 8 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเพาะเชื้อต่อใน TCBS การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเพาะเชื้อ ในอาหาร TCBS อย่างเดียว กับการเพาะเชื้อใน APW ก่อน แล้วจึงเพาะเลี้ยงเชื้อต่อใน TCBS

วัสดุและวิธีการ

สิ่งส่งตรวจ : rectal swab ของผู้ป่วยป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วง จากสาธารณสุขจังหวัดและโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนบนที่ส่งมาตรวจยัง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 เชียงใหม่ ระหว่างเดือนมีนาคม 2533 ถึง กุมภาพันธ์ 2534 จำนวน 5287 ราย

วิธีการตรวจ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. การเพาะเชื้อ

1.1 *Direct plate process (TCBS)* : ป้ายและ streak rectal swab ลงบน TCBS agar plate (EIKEN lot No.39002) นำไปอบที่ 37°ซ 18-24 ชม. ตรวจหาโคโลนิกลม ขนาด 2-3 มม. สีเหลือง ขอบเรียบ

1.2 *Alkaline Peptone Water process (APW+TCBS)* : ใส่ rectal swab ลงในหลอด 0.1% NaCl Alkaline Peptone Water⁽³⁾ (BBL lot No. G1DUWK), อบที่ 37° ซ 8 ชม.จากนั้นป้ายและ streak ลงบน TCBS agar plate, อบ 37°ซ 18-24 ชม. ตรวจหาโคโลนิกลม ขนาด 2-3 มม. สีเหลือง ขอบเรียบ

2. การทดสอบทางชีวเคมี

นำเชื้อที่แยกได้จาก TCBS ในข้อ 1.1, 1.2 มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังต่อไปนี้ TSI, MIL, Indophenol oxidase, Manitol, 0% NaCl peptone water, 1% NaCl peptone water, Inosital, Arginine dehydrolase

3. การทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา⁽⁴⁾

นำเชื้อที่แยกได้เ็น TSI จากข้อ 2 มาใส่บนสไลด์ผสมกับน้ำเกลือปกติ แล้วเติม polyvalent *Vibrio cholerae* O1 antiserum และ monospecific El Tor Ogawa และ Inaba antiserum ผสมให้เข้ากัน สังเกตการจับกลุ่มของเชื้อ

ผลการทดลอง

จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 ในผู้ที่สงสัยจำนวน 5,287 ราย ในช่วงเดือน มีค.33-กพ.34 โดยวิธี TCBS ตรวจพบเชื้อ 215 ราย (4.06%) ในขณะที่วิธี APW ร่วมกับ TCBS พบเชื้อ 351 ราย (6.63%) ช่วงเวลาที่พบเชื้อได้มากที่สุดได้แก่เดือน มีค.33-กค.33 จากในผู้ที่สงสัยจำนวน 3,721 ราย พบเชื้อรวมกันได้ 198 รายโดยวิธี TCBS และ 344 ราย โดยวิธี APW ร่วมกับ TCBS และการทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาในรอบ 12 เดือนพบเชื้อ 351 ราย (6.63%) และพบสูงในเดือน มีค.33-กค.33 ซึ่งตรวจพบเชื้อได้สูงถึง 334 ราย (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 1) เมื่อพิจารณาการตรวจพบเชื้อในแต่ละเดือนของช่วงเดือน มีค.33-กค.33 โดยวิธี TCBS อย่างเดียวพบเชื้อเพียง 38 ราย (4.53%), 19 ราย (2.87%), 25 ราย (3.67%), 70 ราย และ 46 ราย (5.57%) ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อนำมาเพาะเชื้อใน APW + TCBS ตรวจพบเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 102 ราย (12.17%), 29 ราย (4.37%), 35 ราย (5.14%), 99 ราย (13.83%) และ 69 ราย (8.36%) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นั่นคือเมื่อเพาะเชื้อใน APW ก่อนแล้วนำมาเพาะเชื้อใน TCBS พบว่าตรวจพบเชื้อเพิ่มขึ้นอีก 64

ราย (62.75%), 10 ราย (34.48%), 10 ราย (28.57%), 29 ราย (29.29%) และ 23 ราย (33.33%) ตามลำดับ ในช่วงเดือน สค.33-กพ.34 ตรวจพบเชื้อ ทั้ง 2 วิธีได้เท่ากัน (ตารางที่ 1)

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในรอบ 12 เดือน (ระหว่างเดือนมีค.33-กพ.34) ตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 ในผู้สงสัยว่าป่วยจำนวน 351 ราย (6.63%) โดยวิธี APW + TCBS ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของกองระบาดวิทยาว่าโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจาก *Vibrio cholerae* O1 จะพบได้ประมาณ 5% ของโรคอุจจาระร่วงทั้งหมด⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าในเดือนที่มีการระบาดสูงสุดของเชื้อคือเดือน มีค.-กค. ตรวจพบเชื้อได้สูงถึง 334 ราย (8.98%) ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) เป็นระยะเดียวกันกับรายงานของกองระบาดวิทยา ที่รายงานว่ามีการระบาดของโรคอุจจาระร่วงสูง⁽¹⁾ จากผลการศึกษาถึงการใช้ Alkaline Peptone Water enrichment media ในการเพาะเชื้อ *Vibrio cholerae* พบว่าในระยะที่มีการระบาดสูงคือเดือน มีค.33-กค.33 ตรวจพบเชื้อมากกว่า Direct plate process เป็น 64 ราย (62.75%), 10 ราย (28.57%), 29 ราย (29.29%), 23 ราย (33.33%) ตามลำดับ ในขณะที่เดือน สค.33-กพ.34 ตรวจพบเชื้อเพียง 17 ราย (0.95%) และไม่พบความแตกต่างกันของทั้ง 2 วิธี แสดงให้เห็นว่า Alkaline Peptone Water ช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่มีปริมาณน้อย ๆ ให้สามารถตรวจพบเชื้อได้ ซึ่งโดยปกติแล้วการควบคุมการระบาดระยะแรก

มักจะมุ่งเฉพาะสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเท่านั้นจึงทำให้การระบาดยังคงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้การควบคุมการระบาดเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ การเก็บตัวอย่างควรต้องเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่มีอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดเช่นน้ำ อาหารและ rectal swab มาทำการเพาะเชื้อ เพื่อให้ครอบคลุมทุกกลุ่มประชากร⁽⁵⁾ และจากการศึกษาครั้งนี้พบ

ว่า Alkaline Peptone Water เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประโยชน์อย่างมากในการเพาะเชื้อ เพราะจะช่วยให้ตรวจพบเชื้อได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Vibrio cholerae* O1 มีการระบาดได้ตลอดปี ดังนั้นห้องปฏิบัติการที่ตรวจเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 ควรจะใช้ Alkaline Peptone Water ในการเพาะเชื้อทุกครั้ง

ตารางที่ 1 การตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 ในผู้สงสัยว่าป่วย

Date	No.	TCBS		APW + TCBS	
		Antiserum	typing	Antiserum	typing
		Positive	%	Positive	%
MAR	838	38	4.53	102	12.17
APR	661	19	2.87	29	4.39
MAY	681	25	3.67	35	5.14
JUN	716	70	9.77	99	13.83
JUL	825	46	5.57	69	8.36
AUG	230	3	1.30	3	1.30
SEP	216	2	0.93	2	0.93
OCT	227	8	3.53	8	3.53
NOV	222	3	1.35	3	1.35
DEC	119	0	0.00	0	0.00
JAN	336	0	0.00	0	0.00
FEB	216	1	0.46	1	0.46
Total	5287	215	4.06	351	6.63

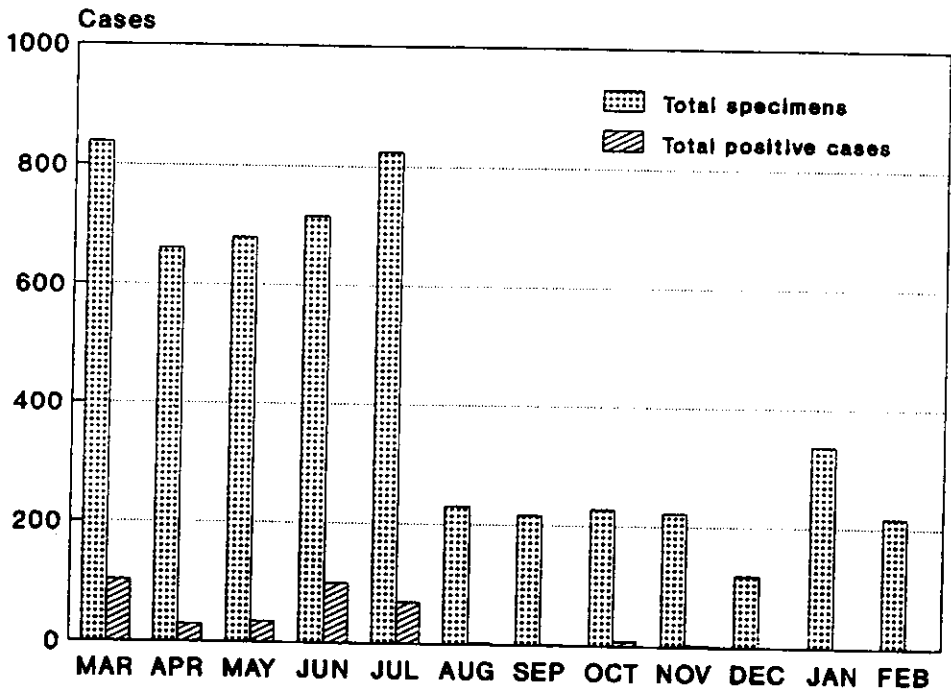


Fig 1 Positive V.cholerae O1 Isolation

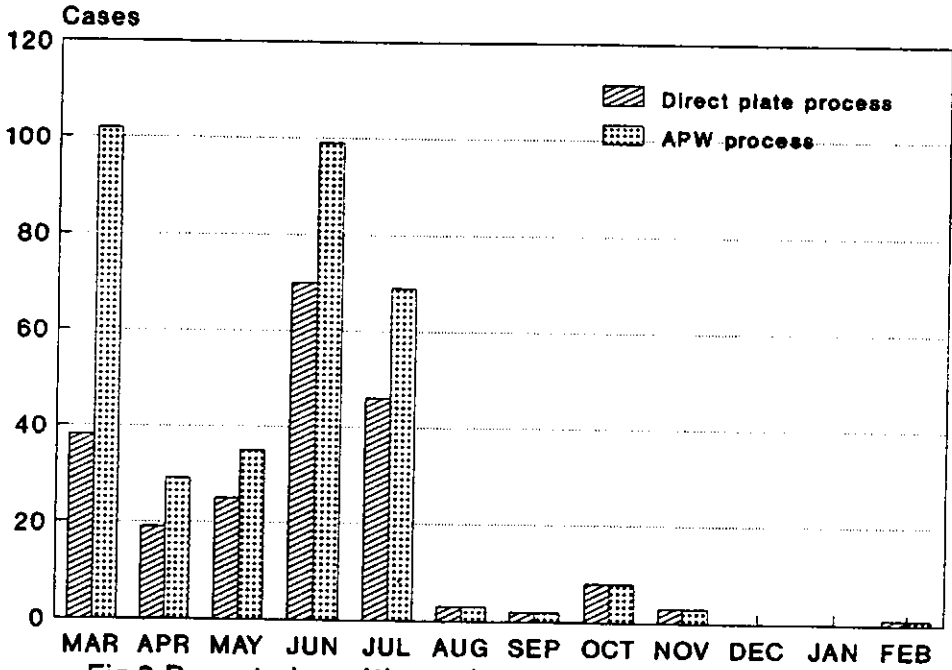


Fig.2 Reported positive culture of carrier/contact cases Mar 90 - Feb 91

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง, ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 เชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้จนกระทั่งสำเร็จจุดสว่างไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กองระบาดวิทยา. รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์ : 2533;21(50) : 610-611.
2. นริกุล สุระพัฒน์, จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, ปรีชา พุทธาวุฒิไกร, และคณะ. จุดชีววิทยาทางการแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 5 สำนัก

พิมพ์กรุงเทพเวชสาร. 2526: หน้า 9-10, 96-99.

3. WHO, Control of Diarrheal diseases : 1987, 83(3) : 23,84.
4. กองมาตรฐานชั้นสูงตรสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือการตรวจทางจุลชีววิทยาคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์การศาสนา : 2529 : 91-9.
5. Viranuvatti V., Chongsuphajaisiddhi T. : Third Asian Conference on Diarrheal Disease. "Epidemiology and Pathophysiology of Diarrheal Disease": 1985.