

วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่



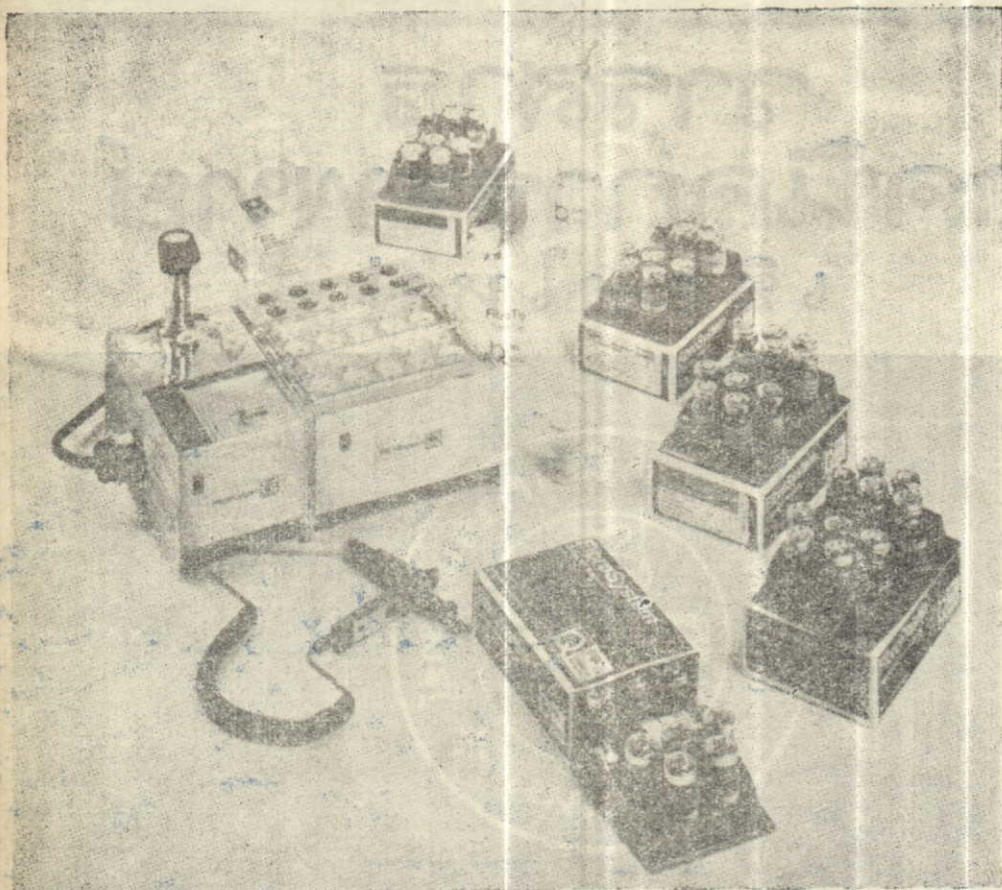
**BULLETIN OF
CHIANG MAI
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES**

VOLUME 10

MAY 1977

NUMBER 2

FibroSystem—The Total System for Coagulation Testing



FibroSystem represents a major advance in coagulation testing. It is a total coagulation system that combines a complete line of proven reagents with the unmatched performance of the **Fibrometer** precision coagulation timer. **FibroSystem** is the most consistent, accurate and reproducible system for coagulation testing available today.



SIAM MEDICO SUPPLY CO., LTD.

26/3 MAHAESAK ROAD. BANGKOK THAILAND

Tel. 234-9445, 233-6797, 233-7433 EXT. 191

Cable Address. MEDICO BANGKOK



Comparative Study of Enteric Media in the Isolation of Salmonella And Shigella from Stool Specimens.

Prasit Tharavichitkul M. Sc. (Micro)

Kampol Panas-ampol. M.D.*

Various media have been developed for isolation of gram-negative enteric pathogens from stool specimens. The isolation traditionally uses the combination of MacConkey agar as a differential plating medium, SS agar as a selective plating medium, and Selenite-F broth as an enrichment broth. Recent evidence has shown that MacConkey agar lacks selectivity for Salmonella and Shigella so lactose fermenters can overgrow or inhibit these organisms (1), whereas SS agar and Selenites-F broth have been to inhibitory for fastidious pathogens such as some species of Shigella (2,3,4). Furthermore, many of these media offer little in the way of colonial morphologic differentiation other than the ability of some organisms to ferment lactose.

In 1965, Taylor (5) introduced XLD agar of which the latter studies shown better rate of isolation of enteric pathogens which fewer false-positive organisms (3,4,6,7,8). On this medium the differentiation of Salmonella and Shigella from other enteric bacilli is based on not only the fermentation of lactose, saccharose, or xylose, but also on lysine decarboxylation and H_2S production.

More recent study of GN broth (3,4,6) have clearly demonstrated in the enhancement of isolation of enteric pathogens. In this paper routine stool specimens have been used to compare Direct Streaking : MacConkey, SS and XLD agar with Enrichment Broths : Selenite-F and GN broths for the isolation of Salmonella and Shigella.

* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

Materials and Methods

Between 11 March and 5 June 1975, a total of 252 stool specimens from patients seen at Chiang Mai Hospital was examined for *Salmonella* and *Shigella*. Each stool specimen was streaked directly onto the three plates: MacConkey Agar (MC, Eiken), *Salmonella Shigella* Agar (SS, Eiken) and Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, Eiken) and also placed into the enrichment broths: Selenite Broth (SF, Eiken) and Gram Negative Broth (GN, BBL). After 18-24 hr. of incubation, the broths were streaked on MC and XLD plates. Colonies suspected of being *Salmonella* and *Shigella* were picked and inoculated onto Triple sugar iron agar (TSI) slants. Following overnight incubation, TSI slants showed the reaction: alkaline slants, acid butt with or without H₂S were inoculated into motility-indole, Simmon's citrate, urea, lysine decarboxylase and phenylalanine medium. Cultures showing biochemical reactions for *Salmonella* and *Shigella* were tested agglutinably with specific antisera for *Salmonella* and *Shigella* (Difco) respectively.

Results

Of the 252 stool specimens examined, 59 (23.4%) were positive for the enteric pathogens; 37 (14.7%) were *Shigella* and 22 (8.7%) were *Salmonella* (Table 1). Although all three media used for isolation of *Shigella* by direct streaking were approximately equal, no one medium grew all of them. Of the 37 isolates of *Shigella*, all three media used in parallel accounted for 36 (97.3%), whereas one kind of media detected no more than 28 (75.7%).

Comparisons between direct streaking and enrichment methods for isolation of enteric pathogens are shown in Table 2. Selenite enrichment streaked to XLD plate was observed to be greatly superior to both direct streaking and other enrichment methods for detection of *Salmonella*. Of all *Salmonella* isolated only 9 (40.9%) isolates were obtained from direct streaking, whereas SF broth streaked to XLD recovered 19 (86.5%). However, all of them were isolated by the use of both direct streaking and SF enrichment streaked to XLD agar. In contrast, direct streaking

Table 1. Isolation of Salmonella and Shigella from 252 Stool Specimens.

Organisms	Direct Streaking				Enrichment Broths						Total	
	MC	SS	XLD	Sub- total	GN		SF		Sub- total	No.	Percent	
					MC	XLD	MC	XLD				
No.	1	7	5	9	1	3	6	19	19	22	8.7	
Salmonella percent	4.5	31.8	22.7	40.9	4.5	13.6	27.3	86.4	86.4	100		
No.	28	26	25	36	5	8	2	2	9	37	14.7	
Shigella percent	75.7	70.3	67.6	97.3	13.5	21.6	5.4	5.4	24.3	100		
Total	29	33	30	45	6	11	8	21	28	59	23.4	

was seen to be clearly superior to enrichment for isolation of *Shigella*. Of the total *Shigella* isolated, direct streaking accounted for 36/37 (97.3%) whereas enrichment broth detected only 9/37 (24.5%).

The distribution of 22 isolates of *Salmonella* was shown in Table 3. Of

these, 14 (63.6%) were *Salmonella* serogroup B of which 11 isolates were recovered from XLD inoculated from SF broth. The species of *Shigella* are shown in Table 4. *Shigella flexneri* was the most frequently isolated species: 78.4% of the total *Shigella* isolated and all of them can be found by direct streaking.

Table 2 Comparison of Direct Streaking and Enrichment Broth Methods for Isolation of 22 Isolates of *Salmonella* and 37 isolates of *Shigella*.

Organisms	Direct Streak only	Enrichment only				Both Methods	Total
		GN		SF			
		MC	XLD	MC	XLD		
Salmonella	9	1				0	10
	8		2			1	11
	7			4		2	13
	3				13	6	22
Shigella	31	0				5	36
	29		1			7	37
	35			1		1	37
	35				1	1	37

* Number of organisms isolated from direct streaking method corresponds with one of the four enrichment methods.

Table 3 Distribution of *Salmonella* isolated from 22 Positive Stool Specimens

Organisms	Direct Streaking				Enrichment Broths					Total	
	MC	SS	XLD	Sub-total	GN		SF		Sub-total	No.	Percent
					MC	XLD	MC	XLD			
<i>Salmonella</i> Serogroup B	1	6	4	8	0	3	3	11	11	14	63.6
<i>Salmonella</i> typhi	0	1	1	1	1	0	2	4	4	4	18.2
<i>Salmonella</i> serogroup E	0	0	0	0	0	0	1	4	4	4	18.2
Total	1	7	5	9	1	3	6	19	19	22	100.0

Table 4 Distribution of *Shigella* isolated from 37 Positive Stool Specimens

Organisms	Direct Streaking				Enrichment Broths					Total	
	MC	SS	XLD	Sub-total	GN		SF		Sub-total	No.	Percent
					MC	XLD	MC	XLD			
<i>S. dysenteriae</i>	0	1	0	1	0	1	1	1	1	2	5.4
<i>S. flexneri</i>	24	20	22	29	4	5	0	0	6	29	78.4
<i>S. boydii</i>	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	5.4
<i>S. sonnei</i>	2	4	2	4	0	1	0	0	1	4	10.8
Total	28	26	25	36	5	8	2	2	9	37	100.0

Discussion

The efficacies of MacConkey, SS and XLD agars were similar for isolation of *Shigella* but for *Salmonella* there were fewer isolates from MC than from either SS or XLD agar when the stool specimens were plated directly. In isolation of both organisms,

however, XLD agar was superior to MC when the specimens were plated indirectly with enrichment broth. This result is similar to that reported by Taylor and Schelhart (7) and Morris et. al. (9). Results with combination of media showed that only the combination of direct streaking and enrichment in SF

broth streaked to XLD medium can detect all 59 isolates of enteric pathogens.

Of all pathogens isolated, *Shigella flexneri* was the most frequently isolated species (49.1%). These organisms were all isolated by direct streaking. In isolation of all *Shigella*, direct streaking was markedly superior to GN and SF enrichment. This observation agreed with some reports (1, 3, 9, 11, 12) but others had shown the greater isolation of *Shigella* by the use of enrichment broth (4, 6, 7, 10, 13). In addition, no more than 75.7% of the *Shigella* were obtained from one kind of plates, whereas all three media used in parallel increased up to 97.3% of isolates.

ย่อเรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* จากอุจจาระของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ จำนวน 252 ราย อุจจาระแต่ละรายนำไปตรวจหาโดยใช้วิธี Direct Streaking คือเลี้ยงบน MacConkey Agar SS Agar และ XLD Agar และโดยวิธี Enrichment Broth คือเลี้ยงใน GN Broth และ Selenite Broth แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อ

In contrast to the *Shigella* data, Selenite enrichment was observed to be greatly superior to direct streaking for detection of *Salmonella*. Besides, SF broth streaked to XLD was the best enrichment method. This was similar to that reported by Taylor and his colleagues (6, 7, 10, 11).

The results of this study indicate that, in the examination of a stool specimen suspected of harboring either *Salmonella* or *Shigella*, it would be desirable to plate the specimen directly on MC, SS and XLD agar and also to inoculate the same specimen in Selenite broth for enrichment before plating on XLD agar.

บน MacConkey และ XLD จากวิธีดังกล่าวสามารถแยกเชื้อ Enteric pathogens ได้ทั้งหมด 59 isolates ซึ่งในจำนวนนั้นแยกเป็น *Shigella* เสีย 37 isolates และ *Salmonella* 22 isolates นอกจากนั้นยังพบเชื้อ *Shigella flexneri* มากที่สุดคือ พบถึง 49.1%

จากการแยกเชื้อ *Shigella* พบว่าวิธี Direct Streaking ให้ผลดีกว่าวิธี Enrichment Broth ไม่ว่าจะใช้วิธีใด คือ วิธี Direct Streaking บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด

สามารถพบเชื้อได้ถึง 97.3 % ขณะที่วิธี Enrichment Broth ตรวจพบเพียง 24.3 % เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในวิธี Direct Streaking พบว่าแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพพอๆ กัน และสามารถแยกเชื้อได้ไม่เกิน 75.7%

สำหรับการตรวจแยกเชื้อ Salmonella พบว่าให้ผลตรงข้ามคือ เมื่อใช้วิธี Selenite Enrichment Broth แล้วนำไปเลี้ยงบน XLD

Agar สามารถตรวจพบเชื้อได้สูงถึง 86.4% ขณะที่วิธี Direct Streaking ให้ผลเพียง 40.9 % แต่ถ้าใช้ทั้งสองวิธีดังกล่าวร่วมกันก็จะให้ผลการแยกเชื้อที่ดีที่สุด จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจแยกเชื้อทั้ง Salmonella และ Shigella จากอุจจาระในเวลาเดียวกัน ควรใช้วิธี Direct Streaking บน MacConkey, SS และ XLD Agars ร่วมกับวิธี Selenite Enrichment Broth ที่ต้องนำไปเลี้ยงต่อบน XLD Agar.

References

1. Pollock, H.M. and Dahlgren, B.J.: Clinical evaluation of enteric media in the primary isolation of Salmonella and Shigella. Appl. Microbiol. 27 : 197-201, 1974.
2. Isenburg, H.D., Kominos, S. and Siegel, M.: Isolation of salmonellae and shigellae from an artificial mixture of fecal bacteria. Appl. Microbiol. 18 : 656-659, 1969.
3. Taylor, W.I. and Harris, B.: Isolation of shigellae. II. Comparison of plating media and enrichment broths. Am. J. Clin. Pathol. 44 : 476-479, 1965.
4. Taylor, W.I. and Schelhart, D.: Isolation of shigellae. IV. comparison of plating media with stools. Am. J. Clin. Pathol. 48 : 356-362, 1967.
5. Taylor, W.I.: Isolation of shigellae. I. Xylose Lysine Agars, new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 44 : 471-475, 1965.
6. Taylor, W.I. and Schelhart, D.: Isolation of shigellae. V. Comparison of enrichment broths with stools. Appl. Microbiol. 16 : 1383-1386, 1968.
7. Taylor, W.I. and Schelhart, D.: Isolation of shigellae. VI. Performance of media with stool specimens. Appl. Microbiol. 16 : 1387-1393, 1968.
8. Rollender, W., Beekford, O., Belsky, R.D. and Kostroff, B.: Comparison

- Xylose lysine deoxycholate agar and MacConkey agar for the isolation of *Salmonella* and *Shigella* from clinical specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 51: 284-286, 1969.
9. Morris, G.K., Kochler, J.A. Gangarosa, E.J. and Sharrar, R.G.: Comparison of media for direct isolation and transport of shigellae from fecal specimens. *Appl. Microbiol.* 19:434-437, 1970.
10. Taylor, W.I. and schelhart, D.: Isolation of shigellae VIII. Comparison of Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Hektoen Enteric Agar, *Salmonella-Shigella* Agar, and Eosin Methylene blue agar with stool specimens. *Appl. Microbiol.* 21: 32-37, 1971.
11. Taylor, W.I. and Harris, B.: Isolation of shigellae. III. Comparison of new and traditional media with stool specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 48: 350-355, 1967.
12. Dunn, C. and Martin, W.J.: Comparison of media for isolation of salmonellae and shigellae from fecal specimens. *Appl. Microbiol.* 22: 17-22, 1971.
13. Croft, C.E. and Miller, M.J.: Isolation of shigella from rectal swabs with Hajna "GN" broth. *Am. J. Clin. Pathol.* 26:411-417, 1956.
-



MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL VARIATIONS OF TRICHOPHYTON RUBRUM

by

Mansuang Feungphian M.S.*

Parimondh Khanjanasthiti Ph.D.*

INTRODUCTION

Trichophyton rubrum is the most frequently found species that causes Dermatophytosis in Bangkok (1), Chiang Mai (2) and other geographic regions (3,4,5). This might be due to anthropophilic and cosmopolitan properties of this organism. As described in Beneke's Medical Mycology Manual (6) *T. rubrum* produces velvety to cottony colony with reddish to rose-purple pigment on the reverse side. Microscopic characteristics consist of numerous clavate microconidia, chlamydospores, racquet hyphae and nodular bodies. Macroconidium is thin walled, 3-8 celled. Physiologically *T. rubrum* produces red pigment on potato dextrose agar and cornmeal dextrose agar and does not perforate autoclaved hair. Urease test

is negative in 7 days. The identification of this species, however, is not an easy task. Balabanoff (7) pointed out that *T. rubrum* was the markedly variable species which had many morphological forms between granular with complete typical conidia and fluffy with different form of conidia. Numerous variants of *T. rubrum* have been found in many parts of the world as in India (8), Thailand (9), Hongkong (10) and New Zealand (11). Besides, biochemical characteristics of this species are not, some what, reliable for identification. Thammayya et al (12) made a contradictory report that *T. rubrum* gave positive urease test in 7 days instead of negative one.

This paper reports morphological and biochemical variations of 53 isolates of *T. rubrum* which were isolated

*Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University Chiang Mai Thailand.

from patients at Chiang Mai Hospital including their sensitivity to some antifungal drugs and their enzymatic activities.

Materials and Methods

The fungi were isolated from patients of Dermatophytosis at Chiang Mai Hospital, Chiang Mai, Thailand, from January 1974 to March 1975. Mycosel agar plates (BBL, Division of BioQuest, Cockeysville, Maryland 21030) were used as medium for the isolation. *Trichophyton rubrum* was identified according to Beneke and Rogers⁽⁶⁾ morphologically and then, transferred onto Mycosel agar slants at room temperature for further experiments as follows.

Macroscopic observation

Colonial textures, topography and pigmentation were observed and recorded at 4 weeks on Mycosel agar plates which carefully sealed with masking tape.

Microscopic observation

Slide culture was made for each fungal isolate. All such specific structures as macroconidia, microconidia etc. were examined within a period of 60 days.

Biochemical tests

A. Urease test (13)

Each isolate of *T. rubrum* was grown in modified Christensen's urea medium. The test was positive when the agar medium turning red within 7 days.

B. Pigment production in potato dextrose agar

Growth of each isolate on potato dextrose agar plate (Difco Laboratory, Detroit, Michigan) were observed for pigment production within a period of 30 days.

C. Hair perforation test (14)

Fragment of infant hair in 25 ml of sterile distilled water with a small amount of 10% sterilized yeast extract solution in a petridish was inoculated with each of the fungi. Hair perforation was observed within 28 days of incubation at room temperature.

D. Growth on casein agar (15).

Casein agar (Difco Laboratory, Detroit, Michigan) was used to test the ability of each fungal isolate to grow on this medium in comparison with that on Sabouraud agar

In vitro drug susceptibility test.

Different concentration (mcg/ml or mcl/ml) of Griseofulvin (Glaxo-

Vidhyasom, Thailand). Ezon T (Yamanouchi Pharm, Japan), Mycosynalar (Protochemie, Switzerland) and Canesten (Bayer Lever Kusen, Germany) were incorporated each into a set of Sabouraud agar slants. A uniform inoculum of the tested fungus about a pin head size was transplanted onto each of this medium and observed for growth within 30 days with a control growth on Sabouraud agar without antifungal drug. Minimum inhibitory concentration of each drug against each isolate of the fungi was recorded.

Study of enzymatic activities in culture medium

After a pure culture of the fungus had been grown on Brain Heart Infusion agar (Difco Laboratory, Detroit, Michigan) for 3 weeks at 25°C, a small plug of medium 1 mm. from the colony edge was removed with the use of 1 cm. diameter cork borer to obtain a constant amount of agar medium. Two of such agar plugs were put into 1 ml. of each of the substrates. Enzymatic activities were stopped after two hours of incubation in water bath at 37°C by the addition of 1 ml Tris buffer pH 9.8 to each of the substrate tubes. Enzymatic activity was directly proportional to free paranitrophenol released, which was measured with Coleman Spectrophotometer (Model 6/35) at 410 nm, the

activity was expressed as optical density (OD) per two plugs per two hours multiplied by 1000.

The substrates used were:-

Paranitrophenyl A-D glucopyranoside
(0.5 mg/ml in 0.1 M acetate buffer pH 5.4)

Paranitrophenyl B-D glucopyranoside
(0.5 mg/ml in 0.1 M acetate buffer pH 5.4)

Orthonitrophenyl B-D galactopyranoside
(0.5 mg/ml in 0.1 M citrate phosphate buffer pH 7.0)

Paranitrophenyl phosphate
(0.5 mg/ml in 0.1 M Tris HCl buffer pH 8.6 for alkaline phosphatase and in 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.2 for acid phosphatase).

Results

From 108 dermatophytosis suspected cases, 54 were positive for dermatophytes. Fifty five isolates of the fungi were responsible for the infections. Among these isolates, 53 were identified morphologically as *Trichophyton rubrum*, 2 as *T. mentagrophytes*.

Although the 53 isolates of *T. rubrum* possessed the same criteria for the identification of this species, they showed variation in both macroscopic and microscopic appearances. They were roughly divided, according to colonial textures regardless the pigmentation, into 3 forms: Velvety,

Granular and Fluffy. Meanwhile, microscopic structures were classified into 3 types; Type I, Type II and Type III.

A Type I produces numerous microconidia with many chlamydo spores. Macroconidia are variable from none to common** in number (Figure I)

A Type II shows chlamydo spores predominantly with rare* macroconidia and a small number*** of microconidia (Figure II)

A Type III appears largely as sterile hyphae with a small number of chlamydo spores and microconidia. Macroconidia was absent or rare (Figure III)

The majority of *T. rubrum* isolates was Velvety (56.6%) whereas Granular (18.8%) and Fluffy (24.5%) forms were less frequently found. Each form of colonial texture produced mostly Type I microscopic characteristic (Table 1.) *Trichophyton rubrum* isolates showed different degrees of sensitivity to Griseofulvin, Ezon T, Mycosynalar and Canesten. Base on statistical difference ($P < 0.05$), isolates

* Rare = 1-10 macroconidia per slide Culture

** Common = more Than 10 macroconidia per slide culture.

*** Small number = 1-20% approximately of a slide culture.

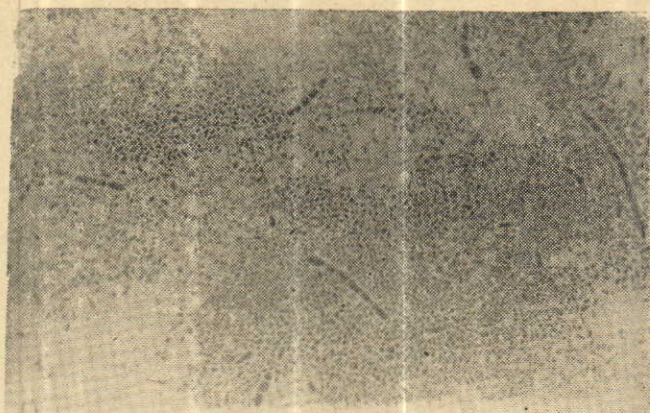


FIGURE. I A TYPE I MICROSCOPIC CHARACTERISTIC.

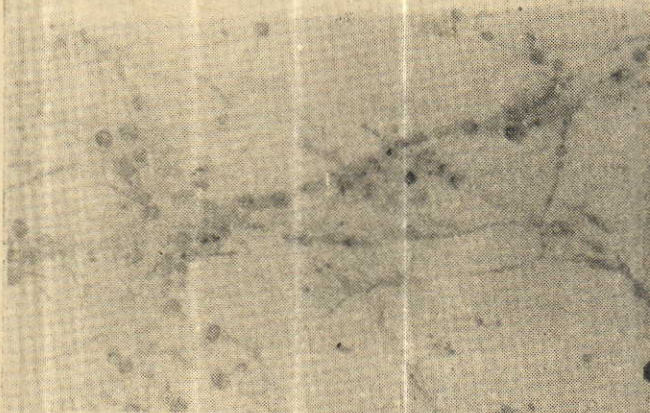


FIGURE. II A TYPE II MICROSCOPIC CHARACTERISTIC.



FIGURE. III A TYPE III MICROSCOPIC CHARACTERISTIC.

Table 1 Different colonial forms and microscopic characteristics of Trichophyton rubrum showing variable degrees of sensitivity to antifungal drugs.

Colonial texture	Number and percentage	No. of isolate showing microscopic characteristics			In vitro drug susceptibility test ($\bar{x} \pm$ S.D.)				
		Type I	Type II	Type III	Griseofuvin ug/ml	Ezont ul/ml	Mycosynalar ul/ml	Canesten ul/ml	
Velvety (V)	30 56.6%	22	8	0	6.13 ± 2.47	1.65 ± 0.52	0.58 ± 0.41	0.79 ± 0.62	
Granular (G)	10 18.8%	10	0	0	6.6 ± 2.37	1.60 ± 0.48	0.42 ± 0.16	0.48 ± 0.31	
Fluffy (F)	13 24.5%	7	2	4	5.93 ± 2.49	1.35 ± 0.47	0.5 ± 0.17	0.77 ± 0.69	
					$P < 0.05(G/F)$	$P < 0.05(G/F)$ $P < 0.01(V/F)$	$P < 0.01(V/G)$	$P < 0.01(F/G)$ $P < 0.01(V/G)$	

Table 2 Different biochemical reactions of *Trichophyton rubrum* in connection with colonial forms and microscopic characteristics.

Urease Test	Pigment production in potato-dextrose agar	Number and percentage	No. of isolate giving microscopic characteristics			No. of isolate showing Colonial Texture			Enzyme activities (- $\pm$ S.D.) Unit (u) = OD/2 plugs/ 2 hours						
			Type I	Type II	Type III	Velocity	Granular	Fluffy	1*	2*	3*	4*	5*		
+	-	12 (22.6%)	6	6	0		11	1	0	81.1 $\pm$ 52.0	240.14 $\pm$ 200.7	41.42 $\pm$ 21.5	172.08 $\pm$ 127.35	195.28 $\pm$ 159.04	
+	+	2 (3.7%)	0	2	0		2	0	0						
-	-	5 (9.4%)	4	0	1		3	0	2						
-	+	34 (64.1%)	29	2	3		14	9	11	60.76 $\pm$ 53.74	206.58 $\pm$ 130.87	48.97 $\pm$ 28.77	261.92 $\pm$ 138.76	363.68 $\pm$ 202.31	
										P < 0.05					P < 0.01

1* = Paranitrophenyl A-D glucosidase

1* = Paranitrophenyl A-D glucosidase

2* = Paranitrophenyl B-D glucosidase

3* = Orthonitrophenyl B-D galactosidase

4* = Paranitrophenyl acid phosphatase

5* = Paranitrophenyl alkaline phosphatase.

a of the Fluffy form were more sensitive to Griseofulvin than those of the Granular form and more sensitive to Ezon T than those of the Granular and Velvety forms. However, the Granular form was more sensitive to Mycosynalar than the velvety form and more sensitive to Canesten Than the Fluffy and Velvety forms.

Thirty four isolates 64.1% of *T.rubrum* had physiologically typical characteristics; they are negative urease test in 7 days, produce red pigment in potato dextrose agar and do not perforate hair in vitro (Table II). The remaining ones had variable properties i.e. positive urease test, no pigmentation in potato dextrose agar (22.6%); positive urease test with pigmentation in potato dextrose agar (3.7%) and negative urease test without pigmentation in potato dextrose agar (9.4%). *Trichophyton rubrum* isolates seemed to have the same pattern of enzymatic activities for the five substrates tested. They yielded high activities (over 100 u.) of Paranitrophenyl B-D glucosidase, Paranitrophenyl acid and alkaline phosphatases. The negative urease test group, however, yielded significantly higher activities of Paranitrophenyl acid and alkaline phosphatases with $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively.

Discussion

Several factors influencing the dermatophytes morphologically and physiologically have been found by many authors. Hexose and the related structural formula of monosaccharide support pigment production (16,17). Gross structure of a colony, pigmentation and microscopic appearance are influenced by amino acid and the medium used (18,19). In this study, the same lot of medium was used to ensure the identity of nutrients for growth. The incubation temperature was kept between 25°C-28°C. Subculturing was made at an interval of 15 days with typical portion of the colony to retain the original characteristics. Variation in morphology and biochemical reactions of *T.rubrum* isolates might be, in part, the results of antifungal drugs used during the treatment prior to isolation. Another possibility is the occurrence of unstable intermediate mutants (20). Some isolates, therefore, represent only temporary characteristics until they achieve the constant ones during successive subcultures.

The Velvety and Granular forms of colonial texture mostly produce numerous microconidia while macroconidia are variable. The Fluffy form has more chlamydospore but less microconidia. Although there are some significance differences in the degree of sensitivity to

particular drug in vitro between isolates of different from of colony, the usual dose when used topically are excess beyond the minimum inhibitory concentrations. The colonial form of a pathogen alone, therefore, is not an indicator of the treatment response.

The patterns of enzymatic activity of various *T. rubrum* isolates against the five paranitrophenol derivatives are almost similar although the negative urease test group has higher activities of paranitrophenyl acid and alkaline phosphatases. This should be a new biochemical characteristic of this species which can differentiate some variants of *T. rubrum* that give unusual pattern. It is of interest that

ย่อเรื่อง

จากการศึกษารูปร่างลักษณะ และปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยละเอียด ของรา *Trichophyton rubrum* จำนวน 53 ตัว ที่แยกได้จากคนไข้ พบว่าลักษณะ Colony และการให้สีแตกต่างกันไป, Colony ชนิด Velvety พบมากที่สุด 56.6 % ชนิด Fluffy 24.5 % และ Granular 18.8 % ลักษณะที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ

แบบที่ 1 มี Microconidia มากมาย เห็น Chlamydo-spores 5 อยู่กระจัดกระจาย อาจไม่พบ Macroconidium หรือพบได้บ้างไม่มากนัก

T. rubrum isolates which involved in cutaneous infection produced high activity of paranitrophenyl - B - D - glucosidase as well as *Cryptococcus neoformans* (21) and *Histoplasma duboisii* (22) which cause systemic fungal diseases. Moreover, high alkaline phosphatase activity of *T. rubrum* is similar to those of yeast phase of *H. duboisii* (22) and *Blastomyces dermatitidis* (23) Since dermatophytes are well known for its tendency to alkalize the medium (24) and in the ring worm infection, the area involved shows higher pH than the normal part (25). Whether these enzymatic activities have any connection with pathogenesis is a subject of further investigation.

แบบที่ 2 พบ Chlamydo-spores เป็นส่วนมาก, macroconidium มีน้อย (1-10 ต่อ slide culture) Microconidia มีเป็นส่วนน้อย (1% - 20% ของ slide culture)

แบบที่ 3 พบ hyphae เป็นส่วนมากมี Microconidia และ Chlamydo-spores เป็นส่วนน้อย (1% - 20% ของ slide culture) Macroconidium อาจไม่พบเลย หรือพบน้อยมาก

Colony ชนิด Velvety และ Granular มักจะให้ลักษณะที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์แบบที่ 1 เป็นส่วนมาก ชนิด Fluffy มีโอกาสพบ Chlamydo-spores มาก และ Microconidium น้อย

เมื่อทำการทดสอบกับยาฆ่าเชื้อราชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อที่ลักษณะ Colony ชนิด Fluffy มีความไวต่อยา Griseofulvin มากกว่าชนิด Granular และมีความไวต่อยา Eton T. มากกว่าชนิด Granular และ Velvety. แต่เชื้อชนิด Granular มีความไวต่อยา Mycosynalar มากกว่าชนิด Velvety และไวต่อ Canesten มากกว่าชนิด Fluffy และ Velvety.

รา *Trichophyton rubrum* ให้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีแตกต่างกันไป ส่วนมาก (64.1%) ให้ Pigment สีแดงใน Potato dextrose agar, ให้ผลบวกต่อ Urease test. ใน 7 วัน อีกส่วนหนึ่ง (22.6%) ไม่ให้ Pigment ใน Potato dextrose agar. ให้ผลบวกต่อ

Urease test ส่วนน้อย (9.4%) ไม่ให้ pigment ใน Potato dextrose agar และให้ผลลบต่อ Urease test นอกจากนั้นอีกส่วนหนึ่ง (3.7%) ยังให้ pigment ใน potato dextrose agar และให้ผลบวกต่อ Urease test ด้วย ราทั้งหมดไม่เจาะเส้นผม

Enzymes ที่เชื้อราส่วนมากปล่อยออกมาใน Brain heart infusion agar ที่มี activity มากพอสมควร (เกิน 100 u) ได้แก่ Paranitrophenyl-B-D-glucosidase, Paranitrophenyl acid and alkaline phosphatases นับว่าเป็นลักษณะสำคัญทางชีวเคมีของเชื้อ ใน species น้อยอย่างหนึ่ง.

References

1. Taylor, R.L., Kotrajaras, R. and Jotisankasa, V., Occurrence of dermatophytes in Bangkok, Thailand Sabouraudia, 6:307, 1968.
2. Khanjanasthiti, P. Dept. of Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand. Personal communication.
3. Bentley-Phillips, B., Bayles 'M.A.H. Superficial fungus disease of Natal. South African Med. J., 46:445, 1972.
4. Blank, F., Mann, S.J., Reale, R.A. Distribution of dermatophytes according to age, ethnic group and sex. Sabouraudia, 12:352, 1974.
5. Desai, S. and Bhat, M.L.A. Dermatophytes in Bombay. A study of the incidence, clinical feature incriminating species of dermatophytes and their epidermicity. Indian J. Med. Res., 49: 663, 1961.
6. Beneke, E.S. and Rogers, A.L., Medical Mycology Manual. 3rd Edition, Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minnesota, pp 94, 1970.
7. Balabanoff, V.A., Dimorphism of dermatophytes with regard to the grade of Parde of parasitic adaptation and their classification. Mycopathologia, 25:323, 1965.
8. Roy, A., Studies on hyperpigmented form of *Trichophyton rubrum* Bull. Cal. Sch. Trop. Med., 12: 67, 1965.
9. Tasanakorn, P. and Dhiraptura, C. A variant of *Trichophyton rubrum* in Thailand, Siriraj Hospital Gazette, 22:101, 1970.

10. Wong, K.O. and Chan, Y.F. Dermatophytosis in Hong Kong. *British. J. Derm.*, 80:287, 1968.
11. Smith, J.M.B., Rush-Munro, F.M., An unusual strain of *Trichophyton rubrum* from Fiji. *Sabouraudia*, 9:153, 1971.
12. Thammaya, A.M., Sanyal and Basu, N., The relative importance of urease test and hair perforation test in routine differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Bull. Cal. Sc. Trop. Med.*, 16:43 1968
13. Philot, C., The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* by a simple urease test, *Sabouraudia*. 5:189, 1967.
14. Ajello, L. and Georg, L.K., In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* *Mycopath. et mycol. appl.* 8:3-17, 1967.
15. Georg, L.K. and Camp, L.B., Routine nutritional test for the identification of dermatophytes. *J. Bact.* 74:113-121, 1957.
16. Silva, M. and Benham, R., Nutritional studies of the dermatophytes with special reference to the red pigment producing variety of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Invest. Derm.*, 22:285, 1954.
17. Lewis, G.M., Hopper, M.E. Pigment production by fungi. *Arch. Derm. & Syph.* 44:453, 1941.
18. Edgecombe, A.T., *Trichophyton purpureum* (Bang) and *Trichophyton gypseum* (Rodin). *Arch. Derm. & Syph.* 46:651, 1942.
19. Silva, M., The effect of amino acid of the growth and sporulation of *Trichophyton rubrum*: Possible application to diagnosis and therapy. *J. Invest. Derm.*, 30:69, 1958.
20. Emmons, C.W. and Hollaender, A., Relation of ultraviolet induced mutation to speciation in dermatophytes. *Arch. Derm. & Syph.* 52:257, 1965.
21. Suwanakachorn, M., Khanjanasthiti, P. and Panas-ampol, K., Study of the enzyme activities in the culture media of *Cryptococcus neoformans* isolated from birds' feces and from patients. *Chiang-Mai Medical Bull* 13:322, 1974.
22. Khanjanasthiti, P. Comparative study of protein fractions and enzyme in the culture filtrates of *Histoplasma capsulatum* and *Histoplasma duboisii* Ph.D thesis, M.S.U., University Microfilms Inc., East Lansing, Michigan, 1971.
23. Beneke, E., Wilson, R. and Rogers, A., Extracellular enzyme of *Blastomycetes dermatitidis*. *Mycopathologia Mycol. Appl.*, 39:325, 1969.
24. Goldfarb, N.J. and Herrman, F., A study of pH changes by molds in culture media, *J. Invest. Derm.*, 27:193, 1956.
25. Herrman, F., Berendt, H. and Karp, F.L., On the acidity of the scalp and other area of the skin in children. *J. Invest. Derm.* 7:215, 1946.



SEROLOGICAL SURVEY OF AMOEBIASIS BY LATEX AGGLUTINATION TEST

อารีย์ เอี่ยมดงามเลิศ 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 และต้องอาศัยผู้ชำนาญในการตรวจแยกชนิดของอมีบา 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 และคณะได้มีผู้ทำการศึกษาขึ้นอีก ครั้งโดย Stamm และคณะในปี 1973 Heiblum และ Cordero (2) ก็ได้ศึกษาถึงการนำ Latex agglutination test มาใช้ในการช่วยวิเคราะห์โรคภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน นอกจากจะศึกษาถึง sensitivity และ Specificity แล้วเขายังได้ศึกษาว่าภูมิคุ้มกัน (Antibody response) จะอยู่ได้นานเท่าใดเมื่อทดสอบโดยวิธีดังกล่าว Savanat Thara Tharavani et al, (10) ก็ได้ศึกษาในทำนองเดียวกับของ Heiblum และ Cordero.

วัตถุประสงค์

จากการค้นคว้าเอกสารดังกล่าวในบทนำ ผู้เขียนมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเพื่อตรวจหาภูมิคุ้มกัน (Antibody response) ต่อโรคภูมิคุ้มกัน (invasive amoebiasis) ในน้ำเลือดจากการนำเลือดและน้ำเหลืองที่ส่งมาตรวจ VDRL ในโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเพื่อนำผลการศึกษาไปเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ได้มีผู้รายงานไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์กับผู้ที่จะนำวิธีการทดสอบดังกล่าวใช้ประกอบการพิจารณาวินิจฉัยโรคภูมิคุ้มกันในภายหลัง

วัสดุและวิธีการ

Sera

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

Antigen

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

or TPS-1 medium (ดู appendix) และเป็น Axenic culture สำหรับมีบ้านภาควิชาปรสิตวิทยา 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 mu 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 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมสำหรับ 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 นั้นสามารถนำไปทำการทดสอบกับน้ำเหลืองได้โดย 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

การทดลองทุกครั้งจะกระทำร่วมไปกับน้ำเหลืองซึ่งเป็น 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 เหล่านี้มาเป็นเครื่องมือช่วยวิเคราะห์โรคทางห้องปฏิบัติการ การทดสอบต่างๆ อาทิเช่น Gel diffusion, Immunoelectrophoresis, Indirect, hemagglutination, Indirect fluorescent antibody และ Complement fixation test เหล่านี้ปรากฏว่าให้ผลดีในแง่ของ Sensitivity และ Specificity ในผู้ป่วยซึ่งเป็น Invasive amoebiasis แต่มีข้อเสียในแง่ที่ว่า การทดสอบดังกล่าวกระทำลำบากในห้องปฏิบัติการบางแห่งซึ่งไม่มีอุปกรณ์ที่ครบ นอกจากนั้นการทดสอบต้องใช้เวลานานจึงจะทราบผลเป็นงานซึ่งต้องการความละเอียดละออและอาศัยประสบการณ์เกี่ยวกับวิธีทำพอสมควร 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 ส่วนข้อเสียของการทดสอบนี้คือถ้าหากนำวิธีทดสอบนี้ไปทดสอบกับน้ำเหลืองของกลุ่มคนที่เคยเป็น 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 ถ้าหากพิจารณาถึงสิ่งแวดล้อมแล้วอัตราการตรวจซึ่งให้ผลบวกน่าจะสูงสำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนและเชื่อกันว่าโรคบิคมิตัวจะระบาด ได้มากกว่า ในเขตอื่นของโลก เช่นเดียวกันในการศึกษาค้นคว้าผู้เขียนมิได้ ทำการตรวจอุจจาระของบุคคลซึ่งการทดสอบน้ำเหลืองให้ผลบวกโดยวิธี Latex agglutination และมีได้ตามประวัติของบุคคลดังกล่าวว่าเคยเป็น โรคบิคมิตัว มา ก่อนหรือไม่ ฉะนั้นผู้เขียนคิดว่าอัตราการตรวจพบครั้งนี้ จึง

ค่อนข้างสูงซึ่งสอดคล้องกับผู้ที่ได้ศึกษาเรื่องนี้มาก่อน สำหรับการทดสอบน้ำเหลืองของผู้ที่ให้ผลบวกถ้าหากจะสรุปโดยอ้างถึงผลซึ่งผู้ศึกษา มาก่อนดังกล่าวข้างต้น จะเน้นถึงการตรวจพบที่ให้ผลบวกว่าอาจเป็นไปได้ 3 ประการด้วยกัน คือบุคคลดังกล่าวได้เคยเป็นโรคบิคมิตัวมาก่อนหรือกำลังเป็นโรคบิคมิตัว (Invasive amoebiasis) หรือมิได้เป็นอย่างหนึ่งอย่างใดดังกล่าวแต่ การ ทด สอบ นั้น ให้ ผล เป็น แต่ เพียง False positive

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

เหลืองให้ผลบวกวิธีนี้แพทย์มักจะตกใจสนใจ
ไปอย่างแน่นนอนว่าบุคคลผู้นั้นกำลังเป็นโรคบิด
มีตัว แพทย์จะต้องอาศัยอาการ, 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 cite 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.



AN OVERVIEW OF HUMAN HISTOCOMPATIBILITY (HLA) SYSTEM

Prasit Chanarat, M.S.*

INTRODUCTION

Histocompatibility in human transplantation is mainly related to the basis for the selection of compatible donors in the ABO and histocompatibility antigens (HLA) (1-3). Both antigens are found on lymphocytes, granulocytes and platelets, and widespread in tissues (4-6). The rejections of skin graft and kidney transplantation are associated with HLA incompatibility (7-15). HLA system is revealed to be the genetic markers of certain diseases (16-29). The present communication deals with a review of background, genetic, histocompatibility testing and applications of HLA system.

BACKGROUND

The first of histocompatibility system was detected in mice by Medawar,

and called H-2 system. The histocompatibility systems in other species, i.e., H-1 (Ag. B) in rat. B in chicken, Ch-L-A in chimpanzee and DL-A in canine were subsequently documented (30-33). The first HLA antigen leukocytes was identified by Dausset, called "Mac" antigen (34), and now generally known as HLA-A2. HLA antigens were further reported by many investigators, i.e., van Rood, et al. (4^a, 4^b, 5^a, 5^b, 6^a, 6^b, 6^c), Shulman, et al. (PI Gr Ly B1, PI Gr Ly C1) and Payne, et al. (LA-1, LA-2, LA-3) (35-37). Human histocompatibility system was called LA by Payne, Du by Amos, Hu-1 by Dausset, FOUR by van Rood, and HL-A by the world Health Organization (WHO). At present, HL-A system, the major histocompatibility system, is recommended as HLA system, after

* Division of Blood Banking and Immunohematology, Department of Pathology Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok.

the Sixth Workshop of WHO and the International Union of Immunological Societies in Arthus in July, 1975 (38)

CHARACTERIZATION OF HLA ANTIGENS

HLA antigens have been solubilized by exposure to low intensity sound, by proteolytic digestion, by organic solvent or detergent extraction and simple salt (39, 41-47). Transplantation antigens are glycoprotein and composed of two polypeptide chains. HLA alloantigenic determinant is responsible for the protein portion at the chain of 31,000 M.W. Another chain of 11,800 M.W. is similar or identical to B-2 macroglobulin. Carbohydrate possibly plays a role in the determination of some HLA specificity even though sialic acid is not essential for HLA alloantigenic activity (48-52).

GENETIC OF HLA

Understanding of a major histocompatibility antigen is realizing its great complexity which is composed of the series of many closely linked genes.

The genetic loci have been assigned to the autosomal chromosome C6 by somatic cell hybridization using IPO-B marker (53), and by family studies (54) which they showed linkage between HLA and phosphoglucumutase (PGM3) on the basis of detection of HLA components are mainly concerned to serological defined (SD) and lymphocyte defined (LD). The SD specificities of the HLA system mainly based on the lymphocytotoxicity testing to be assigned to two separated loci (first or LA, second or FOUR). The LA and FOUR are currently called A and B loci, respectively (38). AJ (C) locus can be considered to be the third locus. LD locus to be responsible for MLC is recognized to be the fourth (D) locus. Certainly, LD antigens have high linkage disequilibrium (Δ) association with HLA-B7 or HLA-B8 of SD determinants (55). Each locus of LA and FOUR can be represented by more than 20 different antigens (Table 1). The inheritance of the LA and FOUR antigens transmitted by the same parental chromosome is called the haplotype. A deriving of haplotype

combination is the result of crossing-over at mitosis which the frequency is determined around 0.467% (56).

GENETIC ANALYSIS

If there are l specificities in the LA series and k in the FOUR series, the numbers of haplotypes, genotypes, and phenotypes are

$$lk, \frac{1}{2}lk(lk+1) \text{ and } \left[1 + \frac{1}{2}(l-1)(l-2)\right] \left[k + \frac{1}{2}(k-1)(k-2)\right] \text{ respectively.}$$

A constant gene frequencies in the population are maintained followed to the Hardy-Weinberg law, the frequency of the gene (p) of an antigenic specificity is given by: $p = 1 - \sqrt{1-f}$, where f is the frequency of the positive individuals. On the other hand, the calculation of p is determined by the method of maximum likelihood (57). Estimated haplotype frequencies (x_{ij}) (58) can be expressed from population phenotype frequencies in the form: $X_{ij} = D_{ij} + p_i p_j$, where p_i and p_j are the allele frequencies and D_{ij} is the gametic associations (the linkage disequilibrium parameter or Δ). D_{ij} value is estimated by D_{ij}

$= \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+d)(c+d)}{n}}$, where $n = a + b + c + d$, and the corresponding frequencies are represented in table:

LA Series			
	$i+$		$i-$
FOUR $j+$	a		b
Series $j-$	c		d

The variance of estimated D_{ij} can be approximated by the form:

$$V(\Delta) \approx \frac{(a+b)(a+c)}{4n^3}$$

$$\text{or } V(\Delta) \approx \frac{1}{4n} f_i f_j$$

where f_i and f_j are the frequencies of individual positive to the i -th and j -th specificities respectively. The standard error of X_{ij} (74) is given by $S = \sqrt{f/4n}$; where f = relative frequency and n = number of families.

HISTOCOMPATIBILITY TESTING

An adequate matching of histocompatibility antigen between prospective donors and recipients is necessary for successful organ transplantation. Several methods of detection which can indicate degrees of histocompatibility are available both in vitro and in vivo. A

suitable method should be highly reproducible, simple, unsophisticated and less time-consuming.

I. LEUKOAGGLUTINATION

The first HLA antigen is recognized by leukoagglutination (34). The leukocyte suspension is performed by using defibrinated blood or collecting blood into ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Red blood cells are removed by sedimentation, centrifugation, or sedimentation by dextran or polyvinylpyrrolidone (PVP). Platelets are eliminated by differential centrifugation. Using EDTA blood, the pH of blood and the concentration of EDTA are critical (59). The leukocytes from defibrinated blood is rarely agglutinated. The viability of polymorphonuclear cells (PMN) is important in leukoagglutination. The sera prior to testing is inactivated at 56 °C for destroying the inhibitor. In microtechnic (59), acetic acid is added to lyse red blood cells in order to prevent the interference of the microscopic reading. Recently, the capillary leuko-

agglutination (60) is developed and may be more effective.

II. LYMPHOCYTOTOXICITY

The lymphocytotoxicity testing is dependent upon the permeability of lymphocytes after incubation with antibody and complement. The lymphocytes suspension is separated by the PMN attachment to nylon, grass, or cotton (61,62); phagocytic property of PMN to iron particles; isopycnic solution of Ficoll-Hypaque, and Ficoll-Triosil (63-70). Recently the simple method for lymphocytes separation is the Ficoll-Hypaque-Sucrose technique method (71). Rabbit or human mixed with rabbit complement is immediately added or after preincubation (59). An excess antibody should be removed. Indicator systems for qualitative and/or quantitative lymphocytes dead cells are used in different ways.

Dye exclusion method is based on the ability of intact lymphocytes to exclude dye such as trypan blue, eosin-Y and Negrosin while dead cells take up the dyes. The dead cells

can also be identified under phase contrast microscope, and ^{51}Cr released method (59,72,73,75).

The sensitivity of the lymphocytotoxicity testing is enhanced by using frozen cells, synergism of sublytic antibody and the lymphocytes treated by proteolytic enzymes such as trypsin, papain and Ficin, chemicals, 2-Aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide (AET), and cystein (76-82).

Many factors can affect antigen-antibody reaction including complement source, different ionic strength, different in affinity, serum inhibitor, viability and purity of lymphocytes suspension, sialic acid covering of antigenic site and complement sensitivity are important (83-85).

III. COMPLEMENT FIXATION

The presence of HLA antigen on platelets was first recognized by Shulman et al. through complement fixation test which antigen was described as the $\text{Pl Gr Ly}^{\text{B1}}$ (86). The variant methods were developed by Nyman et al. (87), and Svejgaard et al. (88).

Platelets suspension is prepared by a differential centrifugation of blood collected in sodium citrate or EDTA as disodium salt. In sterile condition, the platelets suspension obtained could be stored at 4°C for 4 to 5 days.

If 0.1% sodium azide is added to the platelets suspension and stored at 4°C , the preparation is stable for 10 to 12 months. Platelets complement fixation test is 4 times less sensitive than lymphocytotoxic testing.

IV. MIXED LEUKOCYTE CULTURE (MLC)

The MLC test is a method to determine the compatibility of donor and recipient. One-way stimulation method of Bach and Voynow (89) is performed by the treatment of the stimulating cell population with Mitomycin C. A mixture of stimulating and responding cells is incubated at least for 72 hours of culture. An assay is finally performed by counting incorporated radioactive thymidine and/or examining the morphology of blastic transformation under light microscope (90,91). The MLC test is being used

for detection of HLA identity, especially in the bone marrow transplantation.

SOURCE OF ANTISERA

The HLA antibodies are found in multiparous women, polytransfused patients, transplanted patients, volunteer recipient of skin graft or leukocyte injection and/or alloimmunized chimpanzee. The monospecific antisera is found in 1.0% of multiparous women with leukocyte antibody.

The identification of HLA antibody is analyzed by 2 x 2 table (Table 2).

Table 2. The 2 x 2 table

		First serum	
		+	-
Second Serum	+	a	b
	-	c	d

If $b = c = 0$, the sera are identical

If $b = 0$, serum 2 is contained within serum 1, and vice versa if $c = 0$

If the sera show a significant positive association ($ad - bc > 0$, or $ad/bc > 1$), they may show one or more antibodies.

The correlation coefficients is measured by (37,97).

$$P = \frac{(ad - bc)}{\sqrt{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}}$$

where $n = a + b + c + d$

APPLICATION OF HLA TYPING

It now appears that the HLA system is also important in other fields other than in the area of organ transplantation. In fact, the HLA system is involved in pregnancy, transfusion of white blood cells and platelets, association with diseases, paternity and anthropology.

I. TRANSPLANTATION

Antileukocyte antibodies was present after skin grafting. Nevertheless the observations that the survival times of skin graft well match for HLA and ABO were significantly longer than poor ones. The survival time of one locus incompatibility skin graft was 13.37 ± 8.87 days while the two loci incompatibility was 11.51 ± 2.31 days ($p < 0.001$) (92). Dausset and Horst reported that the survival times

of HLA identical sibling, $\frac{1}{2}$ identical and unrelated were 96, 71 and 47% at 2 years, respectively (93). Tissue typing is of clinical significance in kidney transplantation when donors and recipients have two HLA antigens of B (FOUR) locus in common. At present, transplantation with cadaverous kidney is frequently overemphasized because of ethical problems in removing kidney from living donors.

II. TRANSFUSION

About 2% of all blood transfusion (94), the febrile reaction is frequently due to HLA antibodies of recipients direct against HLA antigens of granulocyte donors and it causes destruction of cells and liberation of pyrogens. In modern blood transfusion therapy, infusion of platelet concentrated to arrest bleeding in thrombocytopenic patients is a common practice. Multiple transfusion in these cases will eventually develop multispecific HLA antibodies. Finally, HLA typing of platelets becomes necessary for selecting donors for thrombophoresis.

III. ASSOCIATION BETWEEN HLA AND DISEASES

The correlation between the specific HLA antigens or phenotypes and the development of disease has been investigated. Many reports suggested an association between HLA-Bw15 and juvenile diabetes. A highly significant increase of HLA-B8 in juvenile diabetes mellitus and w15 in insulin-dependent diabetics have been documented (95,96). HLA-B8 was also increased in Grave's disease (98). HLA-B27 has strong association with ankylosing spondylitis (99). Patel suggested that HLA-B7 associated with breast cancer but was not confirmed by Cordon (100). Increased incidence of HLA-A2, B12 and HLA-A1, B8 haplotypes have been shown in leukemia and HLA-A1, B8 in asthma (101). The mechanism of association between HLA and disease may be due to the possible receptor role of HLA antigens or the molecular mimicry between HLA antigens and viruses, and/or the immune response (Ir) gene linked to HLA complex. The LD determinants have

been revealed to exhibit a stronger association with diseases than SD determinants (102). HLA typing may also be helpful in diagnosis of certain diseases such as, in differentiating Reiter's disease from gonococcal arthritis (103); in prognosis that children with HLA-A9 seem to be more resistant to leukemia (104); and in therapeutic approach by which myasthenia gravis patients with HLA-B8 are the good candidates for early thymectomy.

IV ANTHROPOLOGY

HLA antigens may be used in population genetic studies (40,31,82,105, 106), i.e., the frequencies of HLA antigens of haplotypes varies from one race to another, genetic drift and genetic distance. HLA-A1 and HLA-B8 are very common in Caucasians but

are very low in Orientals, Negroes, South American Indians and Australasian Aborigine population. HLA-A9 has a higher frequencies in Thais, the New Guinea natives and in Eskimos than in Caucasian. HLA-A3 and B7 was a very low incidence in Orientals. The gametic association of HLA-A1 and HLA-B8 was associated in Caucasian and Negroes while a certain association was not significant in Thais.

ABSTRACT

An introductory paper of HLA antigens is presented in the form of the method of histocompatibility testing, genetics, its history, general study and its application in transplantation, blood transfusion, and the study of diseases. One hundred and six references have been included, and the recent nomenclature is also described.

Table 1 Recognized HLA Antigens

LA (first locus)	FOUR (second locus)	AJ (third locus)	D locus
HLA-A1	HLA-B5	HLA-Cw1	HLA-Dw1
HLA-A2	HLA-B7	HLA-Cw1	HLA-Dw2

HLA-A3	HLA-B8	HLA-Cw3	HLA-Dw3
HLA-A9	HLA-B12	HLA-Cw4	HLA-Dw4
HLA-A10	HLA-B13	HLA-Cw5	HLA-Dw5
HLA-A11	HLA-B14		HLA-Dw6
HLA-A28	HLA-B18		
HLA-A29	HLA-B27		
HLA-Aw19	HLA-Bw15		
HLA-Aw23	HLA-Bw16		
HLA-Aw24	HLA-Bw17		
HLA-Aw25	HLA-Bw21		
HLA-Aw26	HLA-Bw22		
HLA-Aw30	HLA-Bw35		
HLA-Aw31	HLA-Bw37		
HLA-Aw32	HLA-Bw38		
HLA-Aw33	HLA-Bw39		
HLA-Aw34	HLA-Bw40		
HLA-Aw36	HLA-Bw41		
HLA-Aw43	HLA-Bw42		

ย่อเรื่อง

ได้รวบรวม รายงาน จาก ผล การ ศึกษา HL-A antigen ซึ่งเป็น antigen ที่อยู่บนเม็ดโลหิตขาว เพลลิต และตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ และได้รวบรวมถึงวิธีการทดสอบต่าง ๆ การศึกษาทางกรรมพันธุ์ ประวัติ ตลอดจนการนำไปประยุกต์ในการให้เลือด รวมทั้งการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ HL-Antigen กับโรคต่าง ๆ

และมนุษยวิทยารายงาน นี้ ได้รวบรวมเอกสารอ้างอิงถึง 106 รายงาน

REFERENCES

1. Dausset, J., and Hors, J.: HL-A and kidney transplantation. *Nature new Biol.* 237:150, 1972.
2. Opelz, G., Mickey, M., and Terasaki, P.I.: HL-A and Kidney transplants: Reexamination. *Transplantation.* 17:371, 1974.

3. Ceppellini, R., Mattiuz, P.I., Scudeller, G., and Visetti, M.: Experimental allotransplantation in man. I. The role of the HL-A system in different genetic combination. *Transplantation Proc.* 1:385, 1969.
4. Dausset, J., and Rapaport, F.T.: Transplantation antigen activity of human blood platelets. *Transplantation* 4:182, 1966.
5. Ivasakova, E.: Cytotoxic effect of human alloimmune antibodies on epidermal cell. *Vox Sang.* 12: 295, 1967.
6. Shulman, N.R.: In *Histocompatibility testing*. National Academy of Sciences - National Research Council, Washington, 1965 p. 7.
7. Amos, D.B., Anderson, E.E., Glenn, J.F., Gunnells, J.C., Lancaster, S.L., macguen, J.M., Robinson, R.R., Selgler, H.F., Stickel, D.L., and Ward, F.F.: Selection of donors for kidney transplantation. *Transplantation Proc.* 3:993, 1971.
8. Batchelor, J.R., and Joysey, V.C.: Influence of HL-A incompatibility on cadaveric renal transplantation. *Lancet* 1:790, 1969.
9. Dausset, J.: The genetic of transplantation antigens. *Transplantation Proc.* 3:8, 1971.
10. Dausset, J., and Hors, J.: Analysis of 221 renal transplants: Influence of cross-reactions between donor and recipient HL-A antigens. *Transplantation Proc.* 3:1004, 1971.
11. Hamburger, J., Crosniter, J., Descamps, B., and Rowinska, D.: The value of present methods used for the selection of organ donors. *Transplantation Proc.* 3: 260, 1971.
12. Morris, P.: Analysis of histocompatibility in cadaver renal transplantation. *Transplantation Proc.* 3: 1032, 1971.
13. Morris, P.J., Ting, A., and Forbes, J.F.: Further studies of HL-A. *Transplantation Proc.* 3:109, 1971.
14. Patel, R., Mickey, M.R., and Terasaki, P.I.: Serotyping for hemotransplantation. XVI. Analysis of kidney transplants from unrelated donor. *New Eng. J. Med.* 279:501, 1968.
15. Perkins, H.A., Kounta, S.L., Payne, R., and Belzer, F.O.: Achievements and limitations of histocompatibility testing from ten HL-A factors in kidney transplantation. *Transplantation Proc.* 3:130, 1971.
16. Dausset, J., Degos, L., and Hors, J.: The association of the HL-A antigens with diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 3:127, 1974.
17. Dausset, J. In Schwatez, R.S.: *Progress in clinical immunology*, vol. 1, Grune & Stratton, Inc., N.Y. 1972, pp. 183-220.
18. Svejgaard, A., Jersild, C., Nielsen, L.S., and Bodmer, W.F.: HL-A

- antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigen*. 4:95, 1974.
19. Ryder, L.P., Nielsen, L.S., and Svejgaard, A.: Association between HL-A histocompatibility antigen and nonmalignant disease. *Humangenetik* 25:251, 1974.
 20. Russel, T.J., Schultes, L.M., and Kuban, D.J.: Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *New Eng. J. Med.* 287, 738, 1972.
 21. McDevitt, H.O., and Bodmer, W.F.: HL-A immune response gene and disease. *Lancet* i: 1269, 1974.
 22. Amiel, J.L.: Discussion Symposium on the relationship between histocompatibility antigens and tumor antigens. *Transplantation Proc.* 3:1277, 1971.
 23. Forbes, J.F., and Morris P.J.: Leukocyte antigens in Hodgkins disease. *Lancet* 2:849, 1970.
 24. Morris, P.J., and Forbes, J.F.: HL-A and Hodgkins disease. *Transplantation Proc.* 3:1275, 1971.
 25. Zervas, J.D., Delamore, I.W., and Israels, M.C.G.: Leukocyte phenotypes in Hodgkins disease. *Lancet* 2:634, 1970.
 26. Jeannet, M., and Magnin, C.: HL-A antigens in hematological malignant disease. *Transplantation Proc.* 3:1301, 1971.
 27. Thorsby, E., and Lie, S.O.: Relationship between the HL-A system and susceptibility to disease. *Transplantation Proc.* 3:1305 1971.
 28. Patel, R., Mickey, M.R., Terasaki, P.I.: Leukocyte antigens and disease. I. association of HL-A 2 and glomerulonephritis. *Brit. Med. J.* 2:426, 1969.
 29. Burch, P.R.J.: Histocompatibility and acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1:853, 1971.
 30. Counce, S., Smith, P., Barth, R., and Snell, G.D.: Strong and weak histocompatibility gene differences in mice. *Ann. Surg.* 144: 198, 1956.
 31. Crittenden, L.B., Briles, W.E., Stone, H.A.: Susceptibility to an avian leukosis - sarcoma virus: close association with an erythrocyte isoantigen. *Science* 169: 1324, 1970.
 32. Boyd, A.D., Rapaport, F.T., Ferrebee, J.W., Cannon, F.D., Dausset, J., Lower, R.R., and Spencer, F.C.: Role of HL-A system of canine histocompatibility in cardiac transplantation. *Transplantation Proc.* 3:152, 1971.
 33. Balner, H., van Leeuwen, W., van Vreeswijk, W., Dersjant, H., and van Rood J.J.: Leukocyte antigens of Chimpanzees and their relation to human HL-A antigens. *Transplantation Proc.* 2:454, 1970.
 34. Dausset, J.: Iso-leuko-anticorps. *Acta Haematologica (Basel)* 20: 156, 1958.
 35. van Rood, J.J., and van Leeuwen, A.: Leukocyte grouping. A method and its application. *J. Clin. Invest.* 42:1382, 1963.

36. Shulman, N.R., Aster, R.H., Pearson, H.A., and Hiller, M.C.: Immunoreactions involving platelets. VI. Reactions of maternal isoantibodies responsible for neonatal purpura. Differentiation of a second platelet antigen system. *J. Clin. Invest.* 41: 1059, 1962.
37. Payne, R., Tripp, M., and Weigle, J.: A new leukocyte isoantigen system in man. Cold spring harbor symposia on quantitative biology, vol. XXIX, 1964, pp 285-295.
38. WHO-IUIS: WHO-IUIS Terminology committee nomenclature for factors of the HL-A system. *Transplantation Proc.* 8:109, 1976.
39. Reisfeld, R.A., Pellegrino, M., Papermaster, B.W., and Kahan, B.D.: Serologic characterization of soluble HL-A antigens from continuous lymphoid cell lines derived from normal donors. In Terasaki (Ed.). *Histocompatibility Testing*, 1970, pp 455-460 (Munksgaard, Copenhagen, 1970).
40. Albert, E.D., Mickey, M.R., McNicholas, A.C., and Terasaki, P.I.: Seven new HL-A specificities and their distribution in three races; in Terasaki (Ed.). *Histocompatibility testing* 1970, pp 221-230 (Munksgaard, Copenhagen, 1970).
41. Reisfeld, R.A., Pellegrino, M.A., and Kahan, B.D.: Salt extraction of soluble HL-A antigens. *Science* 172:1134, 1971.
42. Mann, D.L., Rogentine, G.N. Jr., Fahey, J.L., and Nathenson, S.F.: Solubilization of human leukocyte membrane isoantigens. *Nature* 217:1180, 1968.
43. Sanderson, A.R., and Batchelor, J.R.: Transplantation antigens from human spleens. *Nature* 219: 184, 1968.
44. Kahan, B.D., Reisfeld, R.A., Pellegrino, M., Curtoni, E.S., Mattiuz, P.L., and Ceppellini, R.: Water-soluble human transplantation antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 61:897, 1968.
45. Reisfeld, R.A., Pellegrino, M.A., Papermaster, B.W., and Kahan, B.D.: HL-A antigens from a continuous lymphoid cell line derived from a normal donor. I. Solubilization and serologic characterization. *J. Immunol.* 104: 560, 1970.
46. Mann, D.L., and Fahey, J.L.: Properties of HL-A alloantigens solubilized by chemical techniques. *Transplantation Proc.* 3:234, 1971.
47. Reisfeld, R.A., and Kahan, B.C. In Inman, F.P. (ed): *Contemporary Topics in Immunochemistry*, vol. 1 Plenum Press, New York, p 51.
48. Nathenson, S.G., Shimada, A., Yamane, K., Muramatsu, T., Cullen, S., Mann, D.L., Fahey, J.L., and Graff, R.: Biochemical property of papain-solubilized murine and human histocompatibility alloantigen. *Federation Proc.* 29:2026, 1970.

49. Tanigaki, N., Na Kamuro, K., Natori, T., Minowada, J., and Pressman, D.: Structure of HL-A histocompatibility and antigen. The structural component of papain solubilized HL-A antigen molecules. *Transplantation Proc.* 7:195, 1973.
50. Svejgaard, A., Hauge, M., Jersild, C., Platz, P., Ryder, L.P., Nielsen, L.S., and Thomsen, M.: The HE-A system. An introductory survey. *Monographs in human genetics*, vol. 7, 1975, p 38.
51. Ferrone, S., Pellegrino, M.A., and Reisfeld, R.A.: In *The antigens* vol. 3, Sela, M. (ed.). Academic Press, 1975, p 418.
52. Joysey, V.C.: In *Clinical aspects of immunology*. 3rd. Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., Lachmann, P.J. (eds.). Blackwell Scientific Publications, 1975, p 227.
53. Jongsma, A., van Somern, H., Westerveld, A., Hagemeijer, A., and Pearson, P.: Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. *Humangenetik* 20:195, 1973.
54. Mayr, W.R., Bissbort, S., and Kompf, J.: Confirmation of the linkage HL-A/PGM3. *Humangenetik* 28:173, 1975.
55. Wentzed, J., Harris, R., McNorr, W., Maliick, N.P.: HL-A and renal graft survival. *Lancet* 1:1053, 1974.
56. Speiser, P., Pausch, V., and Pacher, M.: A further observation of a recombination within the HL-A system in an Australian family. *Vox Sang.* 25:543, 1973.
57. Piazza, A., Morton, N.E.: A formal genetic analysis of the HL-A system. *Amer. J. Human. Genet.* 25:119, 1973.
58. Mattiuz, P.I., Ihde, D., Piazza, A., Ceppellini, R., and Bodmer, W.F.: New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In *Histocompatibility testing*. Terasaki, P.I. (ed.), 1970, pp 193-205, (Munksgaard, Copenhagen, 1970).
59. Amos, D.B.: Genetic and antigenetic aspects of human histocompatibility system. *Advance in immunology*, vol. 10, 1969, 290-291.
60. Thomson, J.S., Severson, C.D., Coppleson, L.W., and Stokes, G.: Leukocyte capillary agglutination demonstration of additional leukocyte antibodies in cytotoxically "Monospecific" antisera. *Histocompatibility Testing 1970*, p 587 (Munksgaard, Copenhagen).
61. Johnson, T.M., and Garvin, J.E.: Separation of lymphocytes in human blood by means of glass wool column. *Proc. Soc. Biol. and Med.* 102:333, 1959.
62. Rebinowity, Y.: Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass column including tissue culture observation. *Blood* 23:811, 1964.

63. Levien, S.: Magnetic techniques for in vitro isolation of leukocytes. *Science* 123:185, 1956.
64. Cassen, B., Hitt, J., and Hay E.F.: The efficient separation of lymphocytes from normal human blood. *J. Lab. Clin. Med.* 92: 778, 1958.
65. Thiefelder, S.: A method for the isolation of human lymphocytes. *Vox Sang.* 9:477, 1964.
66. Terasaki, P.I., Vredevoe, D.L., and Mickey, M.R.: Serotyping for hemotransplantation. X. Survival of 196 grafter kidney subsequent to typing. *Transplantation* 5:1057, 1967.
67. Boyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scan, J. Clin. Lab. Invest. (Supple)* 97:21, 1968.
68. Perper, R.J., Zee, T.W., and Mickelson, M.M.: Purification of Lymphocytes and platelets and platelets by gradient centrifugation. *J. Lab. Clin. Med.* 72:842, 1968.
69. Harris, R., and Ukaejiofo, E.O.: Rapid preparation of lymphocyte for tissue typing. *Lancet* 2:327, 1969.
70. Harris, R., and Ukaejiofo, E.O.: Tissue typing using a routine one step lymphocyte separation procedure. *Brit. J. Haemat.* 18: 229, 1970.
71. Chanarat, P., and Chiwailp, P.: A simple method for the elimination of platelets from the lymphocyte platelet mixture by sucrose. *Am. J. Clin. Path.* 63:237, 1975.
72. N.T.T.R.L. and Batchelor: Catalogue of antisera and techniques (National Tissue Typing Reference Laboratory, South-West regional transfusion center, Southmead, Bristol, 1973).
73. Ablin, R.J.: Application of the fluorescent antibody method for the identification of HL-A antibodies. *Tiss. Antigen* 4:434, 1974.
74. Bodmer, J.C., and Bodmer, W.F.: Studies on African Pygmies. IV. A comparative study of the HL-A polymorphism in the Babing a Pygmies and other African and Caucasian population. *Amer. J. Human Genet.* 22:396, 1970.
75. Welsh, K.I., and Cresswell, P.: A ^{51}Cr microcytotoxicity test. *Transplantation* 12:234, 1971.
76. Hors, J., Preud'Homme, J.L., Toulze-Zepateria, M.T., Guillet-Bigot, J., Ray, J.P., Dausset, J.: A simplified method for freezing lymphocytes in nitrogen vapors. *Transplantation* 15:417, 1973.
77. Cohen, I., Nelken, D., and Sebatello, I.: The synergistic action of antibodies. A method to increase the sensitivity of the lymphocyte microcytotoxicity test. *Vox Sang.* 22:200, 1972.

78. Braun, W.F., Grecek, D.R., Murpy, J.J.: Expanded HL-A phenotype of human peripheral lymphocyte after trypsinization. *Transplantation* 13:337, 1972.
79. Bube, F.W., Siebel, E., and Heumann, H.: The possibility of influencing histocompatibility antigens by proteolytic enzymes. *Vox Sang.* 25:327, 1973.
80. Mittal, K.K., Mickey, M.R., and Terasaki, P.I.: Serotyping for hemotransplantation XXXI. A 45-minutes microcytotoxicity test. *Transplantation* 8: 801, 1969.
81. Hammond, M.G., Appadoo, B., and Brain, P.: Subdivision of HL-A5 and comparative studies of the HL-A polymorphism in South African Indians, *Tissue Antigens* 4:42, 1974.
82. Signal, D.P., Mickey, M.R., and Terasaki, P.I.: Serotyping for hemotransplantation. XXXII, HL-A haplotypes in Japanese families. *Transplantation* 8:829, 1969.
83. Harris, R., Wentzel, J., Cocking, H., Dodsworth, H., and Ukaejiofo, E.O.: Error in allograft donor typing: A modified microcytotoxicity test. In *Histocompatibility testing 1970*, p 603, (Copenhagen: Munksgaard).
84. Dick, H.M., and Crichton, W.B.: Tissue typing techniques. 1972, pp 29 - 44. (Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1972).
85. Grothaus, E.A., Rauckmen, E.J., and Amos, D.B.: Conditions affecting the performance of the lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* 11:145, 1971.
86. Shulman, N.R.: In *Histocompatibility testing*. National Academy of Science - National Research Council, Washington 1965, p 7.
87. Nyman, G., Heron, I., and Jensen, K.G.: Micro complement fixation test for typing of platelets. A new method. *Vox Sang.* 20: 85, 1971.
88. Svejgaard, A., Kissmeyer-Neilsen, F., and Thorsby, E.: HL-A typing of platelets. In *Histocompatibility testing 1970*, p 153 (Copenhagen: Munksgaard).
89. Bach, F.H., and Voynow, N.K.: One-way stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science* 153: 545, 1966.
90. Bach, M.L., Solliday, S., and Stambuk, M.: Detection of disparity in the mixed leukocyte culture test: A more rapid assay. In *Histocompatibility testing 1970*, p 643 (Copenhagen: Munksgaard).
91. Waithe, W.J., and Hirschhorn, K.: The lymphocyte response to activators. In Weir, D.M. (ed.): *Cellular Immunology*, vol. 2, 2nd edition, 1973, Ch. 25 (Blackwell Scientific Publication).
92. Walford, R.L., Colombani, J., and Dausset, J.: Retrospective leukocyte typing of unrelated human donor-recipients pairs in relation to skin allograft survival times. *Transplantation* 7:188, 1969.

93. Dausset, J., and Horst, J.: HL-A and kidney transplantation. *Nature New Biol.* 238:150, 1972.
 94. Svejgaard, A., Hange, M., Jersild, C., Platz, P., Ryder, L.P., Nielsen, L.S., and Thomsen, M.: The HL-A system: An Introductory Survey, 1975, p 50. In *Monographs in Human Genetics*. vol. 7, 1975.
 95. Nerup, J., Platz, P., Andersen, O.O., Christy, M., Lymgsoe, J., Poulsen, J.E., Ryder, L.P., Nielsen, L.S., Thomsen, M., and Svejgaard, A.: HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2:864, 1974.
 96. Singal, D.P., and Blanchman, M.A.: Histocompatibility (HL-A) antigen, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22: 429, 1973.
 97. Dausset, J., Ivanyi, P., Feingold, N.L. Tissue alloantigens present in human leukocytes. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 129:386, 1966.
 98. Platz, P., Ryder, L., Staub, N.L., Svejgaard, A., Thomsen, M., Nerup, J., and Christy, M.: HL-A and idiopathic addison in disease. *Lancet* 2:289, 1974.
 99. Aho, K., Ahvonen, P., Lassus, A., Sievers, K., and Tilikanen, A.: HL-A antigen 27 and reactive arthritis. *Lancet* 2:157, 1973.
 100. Cordon, A., and James, D.C.O.: HL-A and carcinoma of the breast. *Lancet* 2:565, 1973.
 101. Dick, H.M., and Crichton, W.B.: *Tissue Typing Technique*. The Williams and Wilkins Company, 1972. p 110.
 102. Vladutiu, A.O.: HL-A and disease. *Lancet* 2:288, 1974.
 103. Morris, R.I., Metzger, A.L., Bluestone, R., and Terasaki, P.I.: Use of HL-A-W27 in arthropathies of inflammatory bowel disease. *New Eng. J. Med.* 290: 1117, 1974.
 104. Lowler, S.D., Klouda, P.T., Smith, P.G., and Till, M.M.: Survival and the HL-A system in acute lymphoblastic leukaemia. *Brit. Med. J.* 1:547, 1974.
 105. Tsuji, K., Aizawa, M., Tiakura, K., Nakayama, E., Hasekura, H., Yoshida, T., Akaza, T., Orita, K., Kodama, T., Nomoto, K., Goya, T., Miyamoto, M., and Ito, M.: Distribution of the HL-A antigens of the Japanese population in Japan. *Vox Sang.* 26: 449, 1974.
 106. Chiwailp, P., and Chanarat, P.: The HL-A system in Thais. *Vox Sang.* 30:74, 1976.
-



TYPHOID ANTIBODY LEVEL IN CHIANG MAI POPULATIONS

นันทนา คังใจครอง วท.บ. เทคนิคการแพทย์*
ประสิทธิ์ กวีคณานนท์ พ.บ.**

ไทฟอยด์เป็นโรคที่พบได้บ่อย ในจังหวัด
เชียงใหม่ โรคนี้เกิดจากการติดเชื้อ Salmonella
typhi และ เชื้อ Salmonella Paratyphi
เป็นส่วนใหญ่ การวินิจฉัยโรคที่แน่นอนนั้น
ต้องอาศัยการเพาะเชื้อ ซึ่งจะบ่งบอกได้แน่
นอนว่า คนไข้ติดเชื้อ Salmonella species
ใด เช่น Salmonella Paratyphi A หรือ
Salmonella typhi เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธี
การเพาะเชื้อนั้น เสียเวลาและสิ้นเปลืองกว่า
มาก การทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาจึงเป็นที่
นิยมกว่า การทดสอบดังกล่าวนี้เป็นการหาระดับ
Antibody ต่อเชื้อ Salmonella ใน serum
ของผู้ป่วย และสามารถบ่งบอกได้เพียงว่า ผู้
ป่วยติดเชื้อ Salmonella group ใด เช่น
Salmonella group A หรือ group D เป็นต้น
ทั้งนี้เนื่องจาก species ของ Salmonella ใน
แต่ละ group นั้น จะมี Common Antigen
ร่วมกันอยู่ เช่น Salmonella group A มีทั้ง
หมด 3 species แต่ละ species จะมี
Common Antigen ที่ร่วมกันคือ O₂ และ

O₁₂ (Table 5) และ Common Antigen น
เองที่เป็นตัวการทำให้เกิด Cross Reaction
ขึ้นหรือที่เรียกว่า ปฏิกริยาไขว้

รายงานฉบับนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงระดับ
Antibody ต่อเชื้อ Salmonella typhi, Salmonella
paratyphi A และ Salmonella Paratyphi B
ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อ Salmonella group
D, A และ B ตามลำดับ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการระดับ Typhoid
Antibody ในคนไข้ที่มารับการรักษาตัวใน
โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ด้วยสาเหตุต่าง ๆ
กันยกเว้นที่ป่วยเป็นไข้ หรือได้รับวัคซีน
ไทฟอยด์มาก่อน หรือโรคที่มีการเปลี่ยนแปลง
ของ Immune System

วัตถุและวิธีการ serum ผู้ป่วย 200
รายได้จากคนไข้ที่มา รับการรักษาด้วยสาเหตุ
ต่าง ๆ ยกเว้นที่ป่วยเป็นไข้, ที่เป็นไทฟอยด์,
ได้รับวัคซีนไทฟอยด์มาก่อน โรคที่มีการ

*ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ภาควิชาอายุรกรรม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เปลี่ยนแปลงของ Immune system ที่เป็นโรค Infectious Disease คนไข้ที่ไม่ได้รับการถ่ายเลือดอย่างน้อย 1 เดือนก่อนเจาะเลือดตรวจไทฟอยด์ (serum) ดังกล่าวได้เก็บในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนสิงหาคม 2519

- Salmonella typhi (somatic Ag)
- Salmonella typhi (flagella As)
- Salmonella paratyphi A (somatic)
- Salmonella paratyphi B (somatic Ag)
- Normal saline solution (0.85% NaCl)
- The microtiter system (Cooke engineering Co.)

Antigen ทั้ง 4 ตัว ได้เตรียมเองจาก Cultures ที่ isolate ได้จากคนไข้โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ โดยใส่ลงทดสอบคู่กับ Antigen ที่ซื้อจากบริษัท Difco แล้ว serum คนไข้ถูกแยกจาก clotted blood นำมาทำ dilution ด้วย Normal Saline Solution ใน Tubes จากนั้นนำ 1:5 diluted serum นั้นมาทำ Serial two fold dilution โดยใช้ 0.025 ml volume แล้วเติม 0.025 ml Antigen จากนั้นเกาะ Plates เพื่อให้ serum กับ Antigen เข้ากันดี และนำไป Incubate ที่ 37°C, 18 ชั่วโมงใน moist chamber ค่า Final dilution ที่ได้จะเป็น 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 1:320 อ่านผล Agglutination ในวันรุ่งขึ้น กำหนดให้ Dilution ของ serum ที่สูงที่สุดที่ยังให้ผล Agglutination เป็นค่า Titer

ในการอ่านผลนี้ ถ้า Negative Reaction จะเห็นเป็นลักษณะเม็ดกลม ๆ อยู่ตรงกลางหลุม ขอบเรียบ (No-agglutination)

ส่วน Positive Reaction จะเห็นเป็นแผ่น Antigen ผ่นออกเต็มหลุม (Agglutination)

หมายเหตุ ในการตรวจสอบ ทุกครั้งได้ทำ Control โดยใช้ serum ที่ทราบระดับ Antibody Titer และการตรวจสอบ ก็กระทำโดยผู้ตรวจสอบคนเดียวกันโดยตลอด

ผลการทดลอง จากตารางที่ 1-4

Antibody titer ต่อ O-Antigen ของเชื้อ Salmonella typhi นั้นมี range ตั้งแต่ Negative ถึง 1:80 ได้ค่าเฉลี่ยในคนปกติเท่ากับ 1:20 ส่วน titer 1:80 นั้นจะเห็นได้ว่ามีเพียง 5 คน จึงอาจให้ค่านี้เป็นค่าที่สงสัยว่าจะเป็น Salmonellosis ในการตรวจ serum ของผู้ป่วย Antibody titer ต่อ H-Antigen ของเชื้อ Salmonella typhi มี range ตั้งแต่ Negative ถึง 1:320 และได้ค่าเฉลี่ยในคนปกติเท่ากับ 1:80 จากตารางที่ 2 นี้แสดงให้เห็นว่ามีระดับ Antibody ต่อ H-Antigen ที่ค่อนข้างสูงในประชากรส่วนใหญ่ที่ไม่ได้เป็นไข้ไทฟอยด์ และมีค่าสูงได้ถึง 1:320 Antibody titer ต่อ O-Antigen

ของเชื้อ *Salmonella paratyphi*A นั้นมี range
ตั้งแต่ Negative ถึง 1:40 ซึ่งก็มีเพียงคนเดียว
ที่วัดระดับได้ 1:40 Antibody titer ได้เท่า
กับ 1:40 ได้ค่าเฉลี่ยในคนปกติเท่ากับ Nega-

tive Antibody titer ต่อ O-Anrigen ของ
เชื้อ *Salmonella paratyphi* B นั้นมี range
ตั้งแต่ Negative ถึง 1:40 ได้ค่าเฉลี่ยใน
คนปกติเท่ากับ Negative

Table 1 Antibody titer to somatic antigen of *Salmonella typhi*

Ab. titer to <i>S. typhi</i> (O)	Negative	1:20	1:40	1:80
Number of serum	87	73	35	5
Percentage	43.5	36.5	17.5	2.5

Table 2 Antibody titer to flagella antigen of *Salmonella typhi*

Ab. titer to <i>S. typhi</i> (H)	Negative	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Number of serum	20	37	59	47	29	8
Percentage	10	18.5	29.5	23.5	14.5	4

Table 3 Antibody titer to somatic antigen of *Salmonella paratyphi* A

Ab. titer to <i>S. paratyphi</i> A	Negative	1:20	1:40
Number of serum	175	24	1
Percentage	87.5	12	0.5

Table 4 Antibody titer to somatic antigen of *Salmonella paratyphi* B

Ab. Titer to <i>S. paratyphi</i> B	Negative	1:20	1:40
Number of serum	149	43	8
Percentage	74.5	21.5	4

Table 5 Salmonella Group Somatic Antigen (from Salmonella Infektionen, Kauffmann-White-Schema, Behring Institute.)

Group	Salmonella species	Somatic Ag (O)	Flagella Ag (H)	
			phase 1	phase 2
Group A	Salmonella paratyphi A	1,2,12	a	(1,5)
	Salmonella nitra	2,12	g,m	-
	Salmonella kiel	1,2,12	g,p	-
Group B	Salmonella paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
	Salmonella typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
	Salmonella derby	1,4,5,12	j,g	(1,2)
	Salmonella sandiego	4,5,12	e,h	e,n,z ₁₅
Group D	Salmonella typhi	9,12, (Vi)	d	-
	Salmonella enteritidis	1,9,12	g,m	(1,7)
	Salmonella dublin	1,9,12, (Vi)	g,p	-
	Salmonella panama	1,9,12	i,v	1,5
	Salmonella gallinarum	1,9,12	-	-

วิจารณ์

จากรายงานนี้ได้แสดงให้เห็นว่า ประชากรทั่วไปของจังหวัดเชียงใหม่ที่ไม่ได้เป็นไข้ไทฟอยด์ก็มีระดับ Antibody ต่อ Antigen ต่าง ๆ ของเชื้อ Salmonella ได้ต่างกันอยู่แล้ว ดังนั้นในการแปลผลการตรวจสอบ serum จากผู้ป่วยที่สงสัยเป็นไข้ไทฟอยด์ จึงจำเป็นต้องทราบระดับ Antibody ที่อาจพบได้ในคนปกติของคนในท้องถิ่นนั้น ๆ ก่อน เนื่องจากคนแต่ละชุมชนระดับ Antibody ก็จะแตกต่างกันได้มาก สุดแล้วว่าจะเคยได้รับเชื้อ Salmonella

ต่าง ๆ มากน้อยเพียงใด นอกจากการยึดเอาว่า Significant titer ของแต่ละชุมชนเป็นตัวบ่งบอกการเป็น Salmonellosis แล้ว ยังมีผู้เสนอให้ใช้ Rising titer 4 เท่าของค่าที่มีนัยสำคัญด้วย (1) และเนื่องจาก Antibody ต่อ H-Antigen นี้พบว่ามีระดับขึ้นที่หลัง O-Antigen ซึ่งเป็น Antibody ที่พบได้ในระยะ Active infection ส่วน H-Antibody นั้นจะมีค่าที่สูงมาก และอยู่เป็นเวลานานซึ่งจะเป็นตัวบ่งบอกถึงการได้รับ Antigen ในอดีต อาจจะโดยวิธีฉีดวัคซีนหรือได้รับการติด

เชือกตาม อันจะเป็นระยะที่เรียกว่า Past infection (4) แล้ว ดังนั้นจึงมีผู้เสนอให้ยกเลิกการใช้ระดับ Antibody ต่อ H-Antigen ในการวินิจฉัยโรคไทฟอยด์เสีย (1) จากการตรวจสอบหาระดับ Antibody ต่อ O-Ag และ H-Antigen ครั้งนี้ก็ได้ผลเป็นที่สนับสนุนข้อความและข้อเสนอแนะดังกล่าว

ในการแปลผล ควรคำนึงถึง Common Antigen อีกด้วย ก็จะเห็นได้ว่า *Salmonella typhi* นั้น Somatic (O) มี 2 ตัวคือ O₉, O₁₂, และ Antigen O₁₂ นี้มีอยู่ใน *Salmonella* ทุกตัวใน group A,B และ group D อีกด้วย (ตารางที่ 5) (2,3)

สรุปผลการทดลอง

ได้รายงานการทดสอบ ความสำคัญของการหา Antibody ต่อ Somatic Antigen ของเชื้อ *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* และ Flagella Antigen ของเชื้อ *Salmonella typhi* ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ระดับ Antibody ต่อ O-Antigen ของเชื้อ *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Sal.* *paratyphi B* ที่ควรจะถือว่า มีนัยสำคัญนั้นควรจะเท่ากับ 1:160, 1:80, 1:80 ตามลำดับ ส่วนระดับของ Antibody ต่อ H-antigen ของ *Salmonella typhi* นั้นไม่มี

ความสำคัญทางคลินิก ในการช่วยวินิจฉัยโรคไทฟอยด์

ABSTRACT

Typhoid antibody level was determined in 200 subjects of patients, admitted in Chiang Mai Hospital, with various diseases and fevers, except typhoid fever, infectious diseases, typhoid vaccinated and blood transfused within 1 month. The serum typhoid antibody level to somatic antigen (O-Ag) of *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* and *Salmonella paratyphi B* were determined as well as antibody to flagella antigen (H-Ag) of *Salmonella typhi*. It was found that the mean of antibody to O-Ag of *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* and H-Ag of *Salmonella typhi* were 1:20, negative, negative and 1:80 respectively.

REFERENCES.

1. Steven A. Tchroeder: Interpretation of serologic Tests for Typhoid Fever, JAMA, 206:839-840, 1968

2. Peter sansone, et al.: High Titer
Widal Reaction, JAMA, 220:1615-
1616, 1972.
3. Dawid W. Reynolds, R. LeRoy Carpen-
ter and William H. Simon: Diagnostic
Specificity of Widal's, Reaction
for typhoid fever, JVMA, 214:2192-
2193, 1970.
4. Samuel A. Levinson and Robert P.
Mac Fate : Clinical Laboratory Diag-
nosis, LEA and FEBIGER, Philadel-
phia, pp. 658, 1969.

ผลของยาไพรมาควินต่อการใช้ออกซิเจนของ เม็ดเลือดแดงของหนูที่เป็นโรคมาลาเรีย

สร้อยสังวาลย์ สาทรักษ์ วท.บ. (เกียรตินิยม, เทคนิคการแพทย์)*

บุญยืน สาริกะภาติ Ph.D.**

ย่อเรื่อง

ได้ใช้ Warburg Manometer ทด oxygen uptake ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรที่ ติดเชื้อไข้มาลาเรีย *P. berghei* เมื่อใส่ไพรมาควินลงไปจนมีความเข้มข้น 10^{-6} M ปรากฏว่า oxygen uptake ลดลงถึง 56% เมื่อเม็ดเลือดแดงถูก infect 48% แต่ถ้าเม็ดเลือดแดงถูก infect 64% oxygen uptake ลดลง 20.82% ส่วนเม็ดเลือดแดงปกติของหนูถีบจักร กลับเพิ่ม oxygen uptake สูงขึ้นเมื่อเติมไพรมาควินลงไป

บทนำ

ใน ค.ศ. 1938 Fulton และ Christophers (6) ได้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า ควินินและอะเทบริน (atebrine) ขัดขวางการใช้ออกซิเจนของเม็ดเลือดแดงของลิง ที่ ติดเชื้อไข้มาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* Coggeshall และ Maier (4) และ Silver-

man et al. (8) ทดลองได้ผลเช่นเดียวกัน เมื่อใช้ยาทั้งสองนี้กับ *P. lophurae* และ *P. gallinaceum* ผู้เขียนจึงได้ทดลองผลของยาไพรมาควิน (primaquine) ต่อการใช้ออกซิเจนของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร ที่มีเชื้อไข้มาลาเรียชนิด *P. berghei* โดยเปรียบเทียบกับผลของยานี้ต่อเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรปกติ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

ใช้หนูถีบจักร 30 ตัว ติดเชื้อไข้มาลาเรีย *P. berghei* เข้าไปทางหน้าท้อง เมื่อเปอร์เซ็นต์ของพาราไซท์สูงประมาณ 48% นำหนูเหล่านั้นมาเจาะเลือดออกทางหัวใจ การเจาะเลือดใช้ heparin เป็น anticoagulant เลือดที่ได้นำมา รวมกันแล้วนำไปนับจำนวนพาราไซท์

นำเลือดมาแยกเม็ดเลือดขาวออกโดยผ่านกระดาษกรอง filter paper powder 1 กรัมต่อเลือด 10 มิลลิลิตร (7)

ขั้นต่อไปนำเลือดที่แยก เม็ดเลือดขาวออก แล้วนี้มา centrifuge ที่ 1000 g เป็นเวลา

*กำลังศึกษาต่อชั้นมหาบัณฑิต ที่บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

10 นาที เท supernatant ทั้ง เม็ดเลือดแดง อยู่ทั้งกันหลอด เติม Krebs-Ringer phosphate buffer ลงไปปริมาณเท่ากับ supernatant ที่ทิ้งไปในตอนแรกหรืออาจเติมลงไป 10 มิลลิลิตรต่อเม็ดแดงหนึ่งมิลลิลิตร นำไป centrifuge ที่ 1000 g เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ทั้ง ถ้างเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีเช่นนี้สองครั้ง

การหา oxygen uptake ทำโดยใช้ Precision Warburg apparatus นำเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้วนำมาผสมกับ Krebs Ringer phosphate buffer จนมีค่า hematocrit เท่ากับ 10-30% ใส่ Red cell suspension 1 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตรของกลูโคส 40 ไมโครโมลลงใน Warburg flask ใส่ 0.1 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ลงไปแทนยา ใน side arm ของ flask สำหรับ flask ที่เป็น control ใส่ 0.1 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ลงไปแทนยา ใน center well ของ flask ใส่ 0.2 มิลลิลิตรของ 5 M KOH ซึ่งเป็นชนิด carbonate-free แล้วใส่กระดาษกรองชั้นเล็ก ซึ่งพับเป็นลูกฟูกไว้ด้วย เพื่อช่วยให้มีผิว ในการดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากขึ้น

การทดลองทำที่ 37 °C. ระบายของ oxygen uptake วัดทุก 10 นาที เป็นเวลาสองชั่วโมง

สำหรับผลของยาไพโรมาควิน เมื่ออ่าน ระบาย oxygen uptake ได้ประมาณ 20 นาที ค่อยๆ เอียง side arm ให้ยาไพโรมาควิน

ไหลลงผสมกับ Red cell suspension ใน flask แล้วเขย่า flask ไปจนครบ 10 นาที จึงอ่านระดับ oxygen uptake และอ่านไปเรื่อยๆ ทุก 10 นาที

การทดลองเมื่อทำเปอร์เซ็นต์ฟาราไรท์เป็น 64% และทดลองกับเม็ดเลือดแดงของหนูปกติด้วย

ผลการทดลอง

Oxygen uptake ของเม็ดเลือดแดงของ หนูปกติมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.104 ไมโคร อะตอม ต่อ 10^9 เซลล์ ต่อชั่วโมง แต่เมื่อ มียาไพโรมาควินเข้มข้น 10^{-6} M อยู่ด้วย oxygen uptake เพิ่มขึ้นเป็น 0.149 ไมโคร อะตอมต่อ 10^9 เซลล์ ต่อชั่วโมง ซึ่ง เพิ่มขึ้น 43.26%

Oxygen uptake ของเม็ดเลือดแดงดิบ- จักรที่มีเชื้อ P.berghei อยู่ 48% มีค่าเท่ากับ 0.885 ไมโครอะตอมต่อ 10^9 เซลล์ ต่อชั่วโมง เมื่อมีไพโรมาควินเข้มข้น 10^{-6} M อยู่ด้วย oxygen uptake เปลี่ยนเป็น 0.390 ไมโครอะตอมต่อ 10^9 เซลล์ ต่อชั่วโมง ซึ่ง inhibit 56%

Oxygen uptake ของเม็ดเลือดแดงของ หนูดิบจักรที่มีเชื้อ P.berghei อยู่ 64% มีค่า เฉลี่ยเท่ากับ 1.003 ไมโครอะตอมต่อ 10^9 เซลล์ ต่อชั่วโมง เมื่อมีไพโรมาควินเข้มข้น 10^{-6} M อยู่ด้วย oxygen uptake ลดลง 20.8% คือเป็น 0.792 ไมโครอะตอมต่อ 10^9 เซลล์ ต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 1 และที่ 2

*ไมโครอะตอม คือไมโครกรัมอะตอม

ตารางที่ 1 แสดง Oxygen uptake ของ เม็ดเลือดแดงของ หนูถีบจักรปกติ และหนูที่ติดเชื้อไข้มาลาเรียชนิด *P.berghei*

Parasitemia %	Oxygen uptake u atom/ 10^9 cells/hr	% change
0	0.094	
0	0.115	
48	0.88	+ 73.07
48	0.89	
64	0.947	+ 86.44
64	1.060	

ตารางที่ 2 ผลของยาไพราควินที่มีความเข้มข้น 10^{-6} M ต่อ Oxygen uptake ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรปกติ และหนูที่ติดเชื้อไข้มาลาเรียชนิด *P.berghei*

Parasitemia %	Substrate	Oxygen uptake u atom/ 10^9 cells/hr	% change
0	Glucose	0.104	
0	Glucose + Primaquine	0.149	+ 43.26
48	Glucose	0.885	- 56.00
48	Glucose + Primaquine	0.390	
64	Glucose	1.003	- 20.80
64	Glucose + primaquine	0.792	

วิจารณ์ผล

การที่ไพราควินไปกระตุ้น ให้เม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรปกติใช้ออกซิเจนมากขึ้นนั้น เรายังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน เพียงแต่คาดคะเนว่าไพราควินคงไปกระตุ้น pentose phosphate pathway ในเม็ดเลือดแดง โดย

ทำหน้าที่เป็น electron carrier ระหว่าง NADPH กับออกซิเจน เหมือนกับในกรณีของ methylene blue

สำหรับเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักรที่ติดเชื้อไข้มาลาเรีย *P.berghei* ปรากฏว่าไพราควินชั้น 10^{-6} M inhibit oxygen uptake

เมื่อมีพาราไซต์ 48% ได้มากกว่า เมื่อมีพาราไซต์ 64% ถึง 2.8 เท่า ซึ่งแสดงว่ายาไพรมากวิน inhibit การเจริญเติบโตของเชื้อใช้ขณะที่พาราไซต์ infect เม็กเลือดแดงไม่มากนักอย่างใด ผล ถ้าเม็กเลือดแดงถูก infect มากเสียแล้ว ยาไพรมากวินกลับ inhibit การเจริญของเชื้อใช้ได้ลดลง

ไพรมากวินเป็นยาประเภท 8-amino-quinoline ใช้รักษาโรคมาลาเรียของกนชนิก *P.vivax* ได้ผล กล่าวคือไม่มีการย้อนกลับมาเป็นได้ใหม่ แต่ถ้าใช้ยาชนิดอื่นเช่นกลอโรควิน ยาไม่สามารถฆ่าเชื้อโรคมาลาเรียที่ตับได้ ทำให้ยย้อนกลับมาเป็นโรคได้ใหม่ Cho และ Aviado (3) กล่าวว่ายาไพรมากวินจะไป interfere กับ carbohydrate metabolism ของพาราไซต์ โดยอาจไป inhibit เอ็นไซม์ใน Pentose phosphate pathway กังซ็อนของ Cotton และ Sutorious (5) Beaudoin และเพื่อนร่วมงานของเขา (2) รายงานว่า ไพรมากวิน vacuoles ในไซโทพลาสตมีปริมาณใหญ่ขึ้นโดยดูจาก exoerythrocytic stage ของ *P.fallax*, Aikawa และ Beaudoin (1)

REFERENCES:

1. AIKAWA, M. and BEAUDOIN R.L. Morphological effects of 8-aminoquinolines on the exoerythrocytic stages of *Plasmodium fallax* Miltit. Med 134; 986, 1969.

แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้ยา 8-aminoquinoline แก่ exo-erythrocytic stage ของ *P.fallax* แล้ว ไมโทคอนเดรียจะพองขึ้นและ endoplasmic reticulum ขยายตัวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเราก็จำเป็นต้องศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบว่า ไพรมากวินขัดขวาง การใช้ออกซิเจนในเม็กเลือดแดงที่มีเชื้อใช้มาลาเรียอย่างไร

ABSTRACT:

Effect of primaquine on oxygen uptake of mouse red cell infected with *Plasmodium berghei*.

Oxygen uptake of mouse red cell infected with *P.berghei* was measured by Warburg Manometer. The addition of primaquine to give final concentration of 10^{-6} M caused inhibition of oxygen uptake by 56% when parasitemia was 48% and 20.80% when parasitemia was 64%. Primaquine was observed to increase oxygen uptake of normal mouse red cells.

2. BEAUDOIN, R.L., STROME, C.P.A. and CLUTTER, W.G. A-tissue culture for the study drug action against the tissue phase of malaria Miltit. Med. 134: 979, 1969
3. CHO, W.C. and AVIADO, D.M. Pathogenic Physiology and chemo-

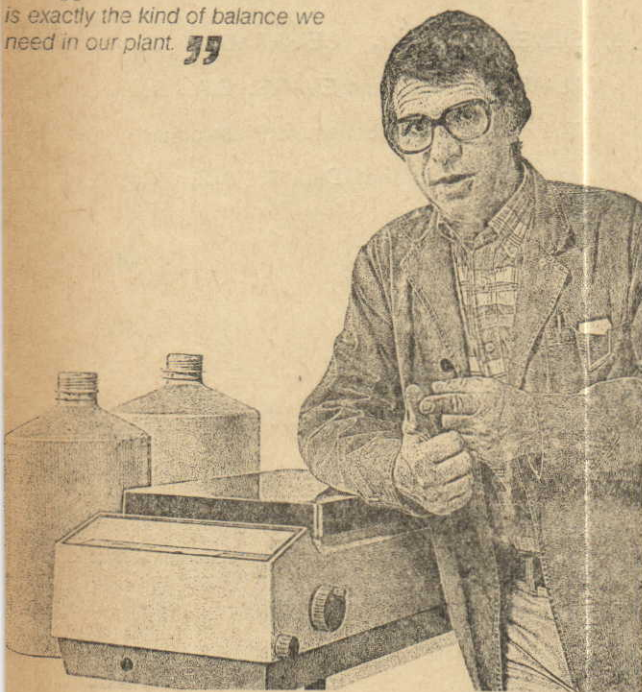
- therapy of *Plasmodium berghei* IV. Influence of chloroquine on oxygen uptake of red blood cells infected with sensitive or resistant strains. *Exptl. Parasit.*, 23: 143, 1968.
4. COGGESHALL, L.T., MAIER, J. Determination of the activity of various drugs against the malaria parasite. *J. Infectious Diseases* 69: 108, 1941.
 5. COTTON, D.W.K. and SUTORIU, A.H.M. Inhibiting effect of some antimalarial substances on^o glucose-6 phosphate dehydrogenase *Nature*, 233: 197, 1971.
 6. FULTON, J.D. and CHRISTOPHER, S.R. Observations on the respiratory metabolism of malaria parasites and trypanosomes *Ann.Trop.Med. Parasit.*, 32: 43, 1938.
 7. GRANT, P.T. and FULTON, J.D. The catabolism of glucose by strains of *Trypanosoma rhodesiense* *Biochem. J.*, 66: 242, 1957.
 8. SILVERMAN, M., CEIPHAML., J. TALIAFERRO L.G. and EVANS., E.A., Jr. The in vitro metabolism of *Plasmodium gallinaceum*. *J.infect. Dis.*, 75: 212, 1944.
-

Now that we use a Mettler E20 top-loading balance in our plant, we can actually see how much raw material we save.

Because with this new balance we can weigh up to 20 kilos with gram precision. Just like with a laboratory instrument. It is easy to see what this means for our costly raw materials. Dispensing for further processing in our production machines is done with such precision that there is no waste of expensive raw materials. Considering the savings, the E20 has already paid for itself.

But only because precise weighing with the E20 does not generate additional expenses. Everything is as smooth as clock-work: taring the large containers on the low weighing platform, adding new raw materials, determining how much material has been filled in. Today, our production workers can't even imagine it any other way.

The Mettler specialist was right when he suggested the new E20. That is exactly the kind of balance we need in our plant.



The fast, rugged precision balances of the E series can do a lot more than that. Consult your Mettler specialist and get the whole story.

METTLER
always gives you so much more

METTLER

ผู้แทนจำหน่ายแต่ผู้เดียวในประเทศไทย
Exclusive Agents For Thailand

บริษัท ป.เคมีอุปกรณ์จำกัด

CESCO LTD.

P.O. Box 445

100-104 อาคาร 1 ถนนราชดำเนิน

พระนคร

โทร. 210191, 214683, 223300

โทรเลขย่อ เซสโกลิมีท

พิมพ์อ้อไผ่ โทวาทิ วท.บ. (ภาษานำบัด) *

ส่วนอาชีพบักหมยถึงการให้การรักษา แก่ผู้ป่วย โดยเน้นหนักไปในการใช้กิจกรรม ต่างๆ เพื่อให้ผู้ป่วยได้ฝึกทำเพื่อสามารถกลับไป ต่สังคมได้เหมือนเดิม กิจกรรมนั้นจะมุ่งไปใน ด้านการรักษา ซึ่งอาจจะเป็นกิจกรรมที่ต้องใช้ ฝีมือ แรงงาน หรือเพียงเพื่อให้เกิดความเคลื่อนไหว-ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย หรือการฝึกให้ ผู้ป่วยช่วยเหลือตัวเองในกิจวัตรประจำวัน ซึ่ง กิจกรรมที่ทำนั้นอาจจะมีเครื่องช่วยต่าง ๆ (self

โครงการจัดตั้งสาขาอาชีวบัต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่

help aids) เพื่อให้ผู้ป่วยทำได้ดีขึ้น นอกจากรักษาทางร่างกายแล้ว ในด้านจิตใจนั้นจะจัดหากิจกรรมเพื่อให้เหมาะสมกับจุดมุ่งหมายของการรักษา เพื่อยกย่องผู้ป่วยให้กลับเข้าสู่สังคมในสภาพปกติและยังช่วยแนะแนวทางและให้กำลังใจแก่ผู้ป่วยให้เกิดความเชื่อมั่นในตัวเอง นอกจากนี้ยังมีการประเมินผลความสามารถของผู้ป่วยที่เหลืออยู่ว่าสามารถทำอะไรได้บ้าง เพื่อให้ผู้ป่วยที่มีความพิการเหลืออยู่ให้มีอิสระในการที่จะยังชีพอยู่ด้วยตนเอง โดยฝึกกิจกรรมเตรียมอาชีพ ให้เกิดความชำนาญเพื่อผู้ป่วยจะได้ยกเป็นอาชีพและดำเนินชีวิตอยู่ เป็นส่วนหนึ่งของสังคม

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ทั้งสองอย่างมีจุดประสงค์ในการรักษาเหมือนกัน แต่วิธีการนำมารักษาต่างกัน แต่ถึงอย่างไร การรักษาก็สัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก และพร้อมที่จะช่วยรักษาและแก้ปัญหของผู้ป่วย และผู้ทพพลภาพให้ช่วยเหลือตัวเองได้ และมีบทบาทต่อครอบครัวและสังคมได้ทั้งเดิม เพื่อเป็นการลดภาระแก่สมาชิกคนอื่น ๆ และประเทศชาติ.

ABSTRACT

Rehabilitation is the help and training given to a sick or handicapped person to enable him to live as full a life as his remaining abilities and degree

of health will allow. Physical Therapy and Occupational Therapy are parts of Rehabilitation team which work closely. The objectives of treatment are the same but processes of treatment are different. Physical Therapy is treatment by physical means: electricity, Heat, light, sound, massage and particularly exercise to reduce pain and maintain or improve functions. For Occupational Therapy is a form of medical treatment prescribed by a physician in which the patients attempt to improve his condition by carrying out a specific activity under the direction of a qualified Occupational Therapy.

REFERENCES:

1. Macdonald, Maccual., Mirrey: Occupational Therapy in Rehabilitation. Third Edition 1970 Reprinted 1972 by the University Press Aberdeen Great Britain
2. Licht: Rehabilitation and medicine 1968
3. Wright: Tidy 'a Massage and remedial exercise. Eleventh Edition 1968.
4. จาระไน โยธินชัชวาล : เอกสารกองสุขภาพจิต กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กุมภาพันธ์ 2520.



ข้อและวิธีวิเอกสาร

Indirect immunofluorescence assay for antibody to germ tube of Candida albicans -- a new diagnostic test.

by Ho Y.M. et al. J.Clin. Pathol. 29: 1007-1010, 1976.

ผู้ทำการทดลองได้ใช้วิธี indirect immunofluorescence สำหรับศึกษาเกี่ยวกับ antibody ใน serum ของคนไข้ที่กำลังเป็นโรค Candida albicans infectoin เปรียบเทียบกับคนปกติ โดยอาศัยหลักความจริงที่ว่า antigenicity ของ germ tube (mycelium) และ blastospore ของเชื้อ Candida albicans ไม่เหมือนกัน ซึ่งผลการทดลองของเขาพบว่า antibody titer ต่อ germ tube ในคนที่กำลังเป็นโรค สูงกว่าในคนปกติอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นวิธี anti-germ tube immunofluorescence assay จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ไร้มองได้ว่า คนไข้คนนั้นๆ กำลังเป็นโรค Candida albicans infection อยู่หรือไม่และเป็นวิธีที่บอกได้ชัดเจนว่าวิธี agglutination assay

2,7-Fluorenediamine and 2,5-fluorenediamine as a peroxidase reagents for blood smears.

By Inagaki A, Uno S, Yoneda M, et al. J Lab Clin Med 88:334-348, 1976.

การนำเอาปฏิกิริยาเปอร์ ออกซิเดส ของเซลล์สายแกรนโลซัยท์ และโมโนซัยท์มาใช้สำหรับวินิจฉัยแยกแยะเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดมัยอีโลบลาสต์, โมโนบลาสต์, และลิมโฟบลาสต์นั้นมีผู้นิยมกันมาก วิธีที่ทำกันส่วนใหญ่ต้องใช้ เป็นซีดิน หรือเป็น ซีดิน ไฮโดร-กลอไรด์เป็นตัวให้ไฮโดรเจน แต่ปรากฏว่าเมื่อไม่นานมานี้รัฐบาลญี่ปุ่น, สหรัฐอเมริกาและประเทศอื่น ๆ อีกหลายประเทศได้ออกกฎหมายห้ามการผลิตและจำหน่ายเป็นซีดินขึ้น เพราะว่ามันทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะขึ้นในหมู่คนงานที่เกี่ยวข้องกันสารตัวนี้มาก ๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม เพราะฉะนั้นจึงได้มีการสร้างวิธีทำและหลักการใหม่ขึ้น ผู้รายงานเรื่องนี้ได้ก็ดัดแปลงวิธีซีดีโทเคมีคอลสำหรับปฏิกิริยาเปอร์ ออกซิเดสขึ้นใหม่ โดยใช้อนุพันธ์โคเคมีนของฟลูออรีนมาแทนเป็นซีดิน ปรากฏว่าการย้อมแกรนูลเปอร์ออกซิเดสที่ได้ผลบวก และการแยกสายของเซลล์นั้นให้ผลดีทั้งสองอย่างด้วยกัน

ปกรณ โทยานนท์.
วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ดำรงกั พินตานนท์
วท.ม.

Electrophoretic Amylase fraction as an aid in diagnosis of pancreatic diseases,

By Mark E. Legaz and Margaret A. Kenny Clin Chem 22: 57-62, (1976)

Lagaz และ Kenny ได้รายงานถึงการตรวจหา amylase isoenzyme ในคนปกติ และคนไข้ pancreatitis ทั้ง acute และ chronic โดยใช้ cellulose acetate electrophoresis ใน discontinuous buffer system สามารถแยก amylase fraction เป็น 3 pancreatic amylase (p_1, p_2, p_3) และ 3 salivary amylase isoenzyme (s_1, s_2, s_3)

Between day และ within day precisions ของการแยกครั้งนี้ได้ค่า C.V. ของ p_2, p_3, s_1, s_2 น้อยกว่า 10%

p_1 isoenzyme พบต่ำกว่า 2% ของจำนวนคนที่ศึกษาครั้งนี้ ส่วน p_2, s_1 และ s_2 isoenzyme พบในทุกคน p_3 isoenzyme พบว่า serum ของคนไข้ acute หรือ chronic pancreatitis และ อาจพบในคนไข้ที่ได้รับ renal transplant บางคนได้ค่า

บุญพะเยาว์ เลหาจินดา
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) วท.ม.

The Role of the Lewis Blood group System in Blood Transfusion Complication.

Umnova, M.A. Skaohilova, N.N.

Ichalovskaya, T.A. Sakharov, R.S.

Piskunova, T.M. Belogeroova, V.I. and Shakhshvarov, V.D.

Central Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow,

USSR. Probl. Hematol. Blood Transf. 20: 33, 1975.

ผู้ศึกษาได้ให้ outline สั้น ๆ เกี่ยวกับ

immunogenetics ของ Lewis system และเน้นบทความทางทฤษฎีของ Potapov ที่ว่าพลเมืองของมอสโกเป็น $Le(a-b-)$ 12% โดยได้พบว่าใน 5 ราย ที่ไม่ได้ตรวจหา Lewis antibodies ได้นำไปสู่การเกิดปฏิกิริยา hemolytic ในการให้เลือดอย่างรุนแรง และมีอยู่รายหนึ่งถึงกับเสียชีวิตไป โดยที่ได้เสียเลือดมากแบบ intrapartum แล้วได้ให้เลือดโดยสามีของผู้ป่วยเองเป็น donor และให้แบบ direct transfusion สามีคนนี้เป็น $Le(a+)$ ผู้ป่วยคนหนึ่งมี anti- Le^b ส่วนคนอื่น ๆ เป็น anti- Le^a ในรายทั้งหมดนี้ได้พบ antibodies โดย indirect antiglobulin test หรือมีฉะนั้นก็จะพบว่าปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลง ที่มักจะเกิดใน tube ใน saline ที่ 20 และ 37 °C

และไม่ได้กล่าวไว้เลยว่า antibodies นี้ให้ผล hemolysis ในหลอดทดลองหรือไม่ และก็มีหลักฐานว่าในการทำ routine crossmatch ในส่วนมากนัก (ผู้ป่วยมาจากที่ห่างจากชุมชน) เป็นวิธีทำใน gelatin หรือ serum ไม่ sensitive พอที่จะหา antibodies เช่นนั้นพบได้ และบางทีก็ไม่ได้ทำ crossmatch ด้วยผู้ศึกษาได้แนะนำว่าในกรณีเช่นนี้มีปฏิกิริยาอย่างรุนแรง ควรจะได้รับการรักษาที่สถานี่จัดเป็นพิเศษ โดยจะมีเลือดที่เหมาะสมจัดไว้ใช้อย่างสะดวก และมีเครื่อง dialysis อยู่พร้อมที่จะใช้ได้ทันที

สุรภา เกษะ

ว.ทบ. (เทคโนโลยีการแพทย์)

Buford, L E., M.S. Pickett, and P.A. Hartman. 1977.

Sanitation in Self-Service Automatic Washers.

App. Env. Mic. 33:74-78.

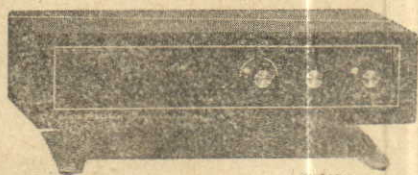
ได้มีการสำรวจ microbial transfer ในโรงซักผ้าที่ใช้เครื่องซักแบบ self service automatic washer โดยการ swab samples จากผิวในของเครื่อง และน้ำที่ใช้ซักทั้งก่อนและหลังการเติม disinfectant น้ำยาที่ใช้ซักมี 3

ชนิด คือ Chlorine, quaternary ammonium product และ phenolic disinfectant ตัวอย่างของ sample ทั้งหมดมาจากเครื่องซัก 4 เครื่อง แต่ละเครื่องจะทำซัก 10 หน อุณหภูมิของน้ำที่ใช้ซัก vary ตั้งแต่ 24 ถึง 51 °C

ผลปรากฏว่า quaternary ammonium product มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อถึง 97 % รองลงมาได้แก่ chlorine ซึ่งสามารถฆ่าได้เพียง 58 % ส่วน phenolic disinfectant ฆ่าได้เพียง 25 % เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพของ chlorine และ phenolic disinfectant จะลดลงถ้าอุณหภูมิของน้ำต่ำลง

ดังนั้นการซักผ้าโดยใช้เครื่องซักแบบนี้ จึงทำให้เกิด contamination ระหว่างรอบการซักได้ง่าย ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่สำหรับ public health problem ทางแก้ไขภาวะเช่นนี้คือการปรับอุณหภูมิของน้ำ ตลอดจนการรู้จักรักษาความสะอาด เครื่องซักของผู้ที่มาใช้ก่อน ผู้เขียนได้แนะนำวิธีการป้องกัน contamination ที่เกิดด้วยการเปลี่ยนแปลงวิธีการใช้เครื่องซักให้ถูกต้อง รวมถึงการใช้ disinfectant ที่เหมาะสม เพื่อช่วยรักษาระดับสุขาภิบาลให้ดีขึ้น.

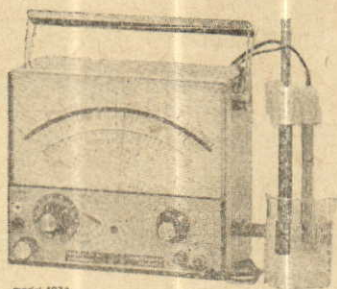
กฤต พันธุ์พิศุทธิ์ชัย วท.ม.



model 701



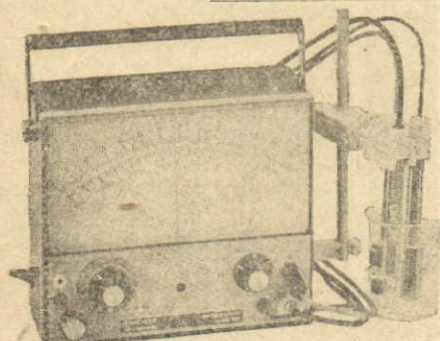
model 501A



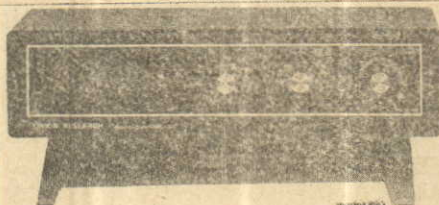
model 407A

for specific ion and gas sensing electrodes

model	pH range / readability	mv range / readability	special features
407A	0 - 14 0.02 pH	±700mv 2mv	2 cycle log scale for direct reading of ion concentrations scales for known addition and subtraction methods recorder output, slope indicator, operates on line and batteries
701	0 - 13.99 0.01 pH 2 pH units 0.001 pH	±1,999mv 1mv ±200mv 0.1mv	scale expansion, illuminated mode indication: pH, mv, exp. electrically variable iso-point (pH 6-8), ATC, BCD, output variable strip chart recorder output
501A	0 - 13.999 0.001 pH	±1,999.9mv 0.1mv	automatic push-button restandardization in pH and mv, electrically isolated strip chart and BCD outputs - permits output to be earth grounded while measuring earth grounded solutions, recorder output has separate span and offset controls, front panel test mode



model 399



model 601

for pH and redox electrodes

model	pH range / readability	mv range / readability	special features
301	0 - 14 0.04pH	±400mv 4mv	11 cm long scale, line operated
399	0 - 14 0.02pH	±700mv 2mv	18 cm long mirror scale, auto-temp. compensation, slope indicator strip chart recorder output, line operated
601	0 - 13.99 0.01pH	±1,999mv 1mv	BCD output for interfacing to ORION printer variable recorder output, ATC, slope indicator electrically variable iso-point (pH 6-8)



For more information please contact

SIAM MEDICO SUPPLY CO., LTD.

26/3 MAHAESAK ROAD, BANGKOK

Tel. 2336797, 2337433 Ext. 191, 192

Cable address: MEDICO BANGKOK.

ORION RESEARCH



ข่าวในวงการ

สมรส

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สนิท มกรแก้วเกียร
อาจารย์ระดับ 6 ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะ
เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้
เข้าสู่พิธีมงคลสมรส กับ อาจารย์ ลักษณะ-
ชยุติมันต์กุล อาจารย์ระดับ 4 ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อ
วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2520 ณ โรงแรมรถไฟ
เชียงใหม่

การประชุมสัมมนาวิชาการ

การประชุมสัมมนาวิชาการและปฏิบัติการ
ทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 1 ซึ่งคณะ
เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ
สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ได้
ร่วมกันจัดขึ้น ณ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 7-8 เมษายน
2520 (วันที่ 9 ทักษิณศึกษา) นั้น ปรากฏ
ว่าได้รับผลสำเร็จเป็นที่น่าพอใจและน่ายินดีเป็น
อย่างยิ่งของทุกฝ่าย โดยได้รับความสนใจจาก
นักเทคนิคการแพทย์ แพทย์ นักวิทยา-
ศาสตร์ และผู้สนใจอื่น ๆ จากทั่วประเทศเป็น
จำนวนมาก มีผู้เข้าร่วมประชุมประมาณ 350
คน ซึ่งผู้เข้าร่วมประชุมส่วนใหญ่ได้ชื่นชมกับ

การจัดการประชุมครั้งนี้ สำหรับเนื้อหาและ
ประโยชน์ที่ผู้เข้าร่วมประชุม ๆ ได้รับพอจะ
ประมวลได้ดังนี้

1. ความรู้ทางด้านวิชาการ
2. ความรู้ทางด้านปฏิบัติการ
3. ความรู้ จากการ ได้พบ ปะ และ แลก
เปลี่ยนข้อคิดเห็นซึ่งกันและกันทางด้าน
วิชาชีพเทคนิคการแพทย์ และสัม-
พันธภาพในทางส่วนตัว (มนุษย์
สัมพันธ์)
4. ความรู้เกี่ยวกับเครื่องมือ และวิทยา
การใหม่ ๆ จากบริษัทห้างร้านที่นำ
มาแสดง
5. ทักษิณศึกษาภูมิ ประเทศ และ สถานที่
ท่องเที่ยวของท้องถิ่น (เชียงใหม่-
ลำพูน)
6. ประเพณีบางอย่างของท้องถิ่น เช่น
ขันโตกดินเนอร์.

อาจารย์ใหม่

ภาควิชาโลหิตวิทยา คณะเทคนิคการ
แพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ขออิมตัว
อาจารย์ เกชา ร่วมไทรย์ จากแผนกเวชศาสตร์
ชัดสุคร คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหา-

วิทยาลัย ให้มาช่วยปฏิบัติหน้าที่ราชการใน
ภาควิชา ซึ่งได้รับอนุมัติให้ยืมตัวได้ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน - 31 ตุลาคม 2520

นายดิษฐ์ (บุญล้อม) สงค์ศิริ ได้รับ
การคัดเลือกเข้ารับบรรจุเป็นอาจารย์ระดับ 4 ภาค
วิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 2 พฤษภาคม
2520

คนบัตืกลับจากต่างประเทศ

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชัยโรจน์ แสงอุดม
คนบัตืคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่ ซึ่งได้รับทุนรัฐบาลออสเตรเลีย ภายใต้
โครงการฝึกอบรมให้เส้นทางไปฝึกอบรม
รวมประชุม และสัมมนาทาง ด้าน บริ การ โส หิต
(International Training Course in Blood
Transfusion Service) มีกำหนด 3 เดือน
7 วัน ตั้งแต่วันที่ 14 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่
21 พฤษภาคม 2520 นั้น บัตืท่านคนบัตืได้
เสร็จสิ้นการฝึกอบรมประชุมและสัมมนากังกล่าว
นั้น และได้กลับมาปฏิบัติหน้าที่ราชการตาม
เดิมแล้วตั้งแต่วันที่ 23 พฤษภาคม 2520

อาจารย์ไปฝึกอบรมและลาศึกษาต่อ

อาจารย์เยาว์ วงศ์วิเศษ อาจารย์ระดับ
3 โครงการจัดตั้งภาควิชารังสีวิทยา คณะ
เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้

รับอนุมัติให้ลาไปศึกษาต่อชั้นปริญญา มหาบัณฑิต
สาขาพิษวิทยาการแพทย์ ณ คณะบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยทุนส่วนตัวมีกำหนด
2 ปี ตั้งแต่วันที่ 14 มีนาคม 2520 ถึงวันที่
13 มีนาคม 2522

อาจารย์พิมพ์อำไพ ไกวาทิ อาจารย์ระดับ
3 โครงการจัดตั้งภาควิชาอาชีวบำบัด คณะ
เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับ
อนุมัติให้ลาไปศึกษาต่อชั้นปริญญา มหา บัณฑิต
สาขาชีววิทยา ณ คณะบัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยด้วยทุนส่วนตัวมีกำหนด 2
ปี ตั้งแต่วันที่ 2 มิถุนายน 2520 ถึงวันที่
1 มิถุนายน 2522

อาจารย์รุจภา นิมสังข์ อาจารย์ระดับ
4 ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับทุนองค์การ
อนามัยโลก (WHO) ให้ไปฝึกอบรมทางด้าน
Advanced Clinical Chemistry-Practice,
teaching and Research ณ กรุงลอนดอน
ประเทศอังกฤษ มีกำหนด 1 ปี โดยได้รับ
อนุมัติและจะออกเดินทางในวันที่ 2 มิถุนายน
2520

อาจารย์วารุณี คุณาชีวะ อาจารย์ระดับ
4 ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการ
แพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับทุนองค์
การอนามัยโลก (WHO) ให้ฝึกอบรมทางด้าน
Serology (เกี่ยวกับธนาคารเลือด) ณ ประเทศอังกฤษ มีกำหนด 1 ปี และจะเดินทางไปยังประเทศนั้นในวันที่ 1 กรกฎาคม 2520

ข้าราชการกลับจากต่างประเทศ

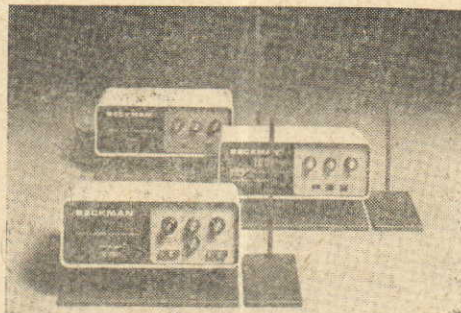
คุณนวลชื่น คำทอง นักวิทยาศาสตร์
ระดับ 4 ธนาคารเลือด โรงพยาบาลนคร
เชียงใหม่ ซึ่งได้รับทุนจากรัฐบาลนิวซีแลนด์
ได้เดินทางไปฝึกอบรมทาง ด้าน ธนาคาร เลือด
ณ Blood Transfusion Center, Auckland,
New zealand มีกำหนด 6 เดือน ตั้งแต่
วันที่ 23 พฤษภาคม 2519 นั้น บัดนี้จะได้
ได้เสร็จสิ้นการฝึกอบรมดังกล่าวแล้ว และจะได้
กลับมาปฏิบัติหน้าที่ราชการตามเดิม ในวันที่
6 มิถุนายน 2520

อาจารย์ไปอบรม

อาจารย์จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหา-
วิทยาลัยเชียงใหม่ ที่จะไปร่วมการฝึกอบรม
ข้าราชการ และพนักงานตามโครงการศึกษา
เพื่อความมั่นคงของชาติ ณ โรงละครแห่งชาติ
กรุงเทพมหานคร รวม 2 รุ่น มีดังนี้.-

รุ่นที่ 1 ตั้งแต่วันที่ 6-10 มิถุนายน
2520 เวลา 8.30-16.30 น. ได้แก่
อาจารย์ไพโรจน์ สภาวจิต และอาจารย์
เนตร สุวรรณฤทธาสน์

รุ่นที่ 2 ตั้งแต่วันที่ 13-24 มิถุนายน
2520 เวลา 9.00-12.00 น. ได้แก่ ผู้ช่วย-
ศาสตราจารย์ ดร.สนิท มกรแก้วเกียร และ
อาจารย์ ดร.อุกมศักดิ์ เทวซึ่งเจริญ.



The New Beckman Digital pH Meters

The first of this new Beckman series are the three stylish digital instruments shown here: Models 3500, 3550 and 4500. Common to all three are the Beckman self-test switch for a quick check of electrodes and verification of proper instrument operation; pedestal-mounted tilting meter for convenient reading; analog and binary-coded-decimal output for recorder and printer; and rugged design.



For more information please contact
SIAM MEDICO SUPPLY CO. LTD.
26/3 Mahaesak Road Silom Bangkok
Tel. 233 9645

Cable address: MEDICO BANGKOK

BECKMAN

INSTRUMENTS, INC.
FULLERTON, CALIFORNIA 92634 USA.

KW0022

ดัชนีโฆษณา

1. บริษัท สยามเมดิโก ชัพพลาย จำกัด	ปกหน้าด้านใน
2. บริษัท สยามเมดิโก ชัพพลาย จำกัด	ปกหลังด้านนอก
3. บริษัทบริสตอลลาบอเรตอรีส์ แห่งประเทศไทย จำกัด	ปกหลังด้านใน
4. บริษัท ป. เค. อู่อุปกรณ์ จำกัด	116
5. บริษัท สยามเมดิโก ชัพพลาย จำกัด	125
6. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ที.พี.ดี.	127
7. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล เชียงใหม่วินเนอร์	
8. บริษัท สยามเมดิโก ชัพพลาย จำกัด	128
9. บริษัท สยามเมดิโก ชัพพลาย จำกัด	
10. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เซอร์ติฟายด์ แล็บ จำกัด	129
11. ห้างหุ้นส่วนจำกัด รัชมอร์	130
12. บริษัท ทานาเบ้ เซยาคุ จำกัด สาขากรุงเทพฯ	131
13. บริษัทเจ็บบีและเจ็สเซ็น จำกัด	132
14. บริษัท สยามเมดิโก ชัพพลาย จำกัด	
15. บริษัท บริสตอลลาบอเรตอรีส์ แห่งประเทศไทย จำกัด	133
16. บริษัท ดุเม็กซ์ จำกัด	ใบแทรก