INCIDENCE
OF
C. DIPHTHERIAE
FROM THE PATIENTS' CLINICAL SPECIMENS

ผ่องพรรณ เต็มสุข*

นราทร ธรรมบุตร พ.บ.*

ดวงรัตน์ วิภาประสิทธ์*

Introduction :

Diphtheria bacilli เป็น organisms ที่อยู่ใน genera Corynebacterium species เป็น species เดียวที่ทำให้เกิดโรค คอตีบ

รูปร่างของ organisms นี้ เป็นรูป rod—shape แต่ไม่แน่นอน ไม่มี capsule, และ spore ตรงปลาย rod ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะเป็นรูป club—shape มักจะมี Metachromatic granule ซึ่งเห็นได้โดยย้อม Methylene blue stain มีการเรียงตัวเหมือนอักษรจีน

Method :

การเพาะเชื้อและการ Identify นั้น Div. of Bacteriology ได้ supply Loeffler coagulated serum slant เป็น transport medium สำหรับ Diphtheria Bacilli, จากผู้ป่วยควรจะ streak ลงบน media นี้ diphtheria bacilli เจริญได้เร็วกว่าอยู่ใน normal flora ในเวลา ๒—๓ ช.ม. แรก(1)

Swab ที่อยู่ใน Loeffler medium นำมา streak บน Blood agar สำหรับ detected group a—β. hemolytic streptocci และจาก Loeffler medium นำมา smear และย้อมด้วย Methylene blue และ streak บน *Clauberg II medium*(2) เมื่อแยก diphtheria bacilli, media นี้ diphtheria bacilli จะขึ้นได้ดี normal flora ส่วนใหญ่จะถูก inhibit. เก็บ Blood agar plate และ Clauberg II medium ที่ ๓๗°C นาน ๑๘ ช.ม. ลักษณะ colony ของ diphtheria bacilli บน Clauberg II medium

* แผนกจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

๑๘ ช.ม. มีขนาดเล็ก สีเทาดำ กลมแบน ได้ดี บน media นี้ และจะให้ colony สีดำ แต่ถ้า incubate ๔๘ ช.ม. colony จะใหญ่ สนิท ใหญ่, นูน, กลม เมื่อย้อมดูจะแยก และเห็นชัดขน. Staphylococci ก็จะขึ้น ได้จาก diphtheria bacilli

รายงานตลอดปี ๒๕๑๔ มีดังนี้

Data Diphtheria ปี ๒๕๑๔ (มกราคม ๒๕๑๔ — ธันวาคม ๒๕๑๔)

MONTHS	Total cases	"ISOLATED" STRAINS		Positive Virulent test	
		patients	personels	patients	personels
มกราคม	๕	๕	—	๒	—
กุมภาพันธ์	๕	๕	—	๔	—
มีนาคม	๒	๒	—	—	—
เมษายน	๓	๓	—	๑	—
พฤษภาคม	๖	๖	—	๒	—
มิถุนายน	๕	๕	—	๕	—
กรกฎาคม	๕	๕	—	๔	—
สิงหาคม	๔	๔	—	๓	—
กันยายน	—	—	—	—	—
ตุลาคม	๑	๑	—	—	—
พฤศจิกายน	๔	๓	๑*	—	—
ธันวาคม	๑๔	๑๔	—	๕	—
รวม	๖๒	๖๑	๑*	๒๖ (๔๑.๙๓%)	—

* = from nurses.

นำ colony ที่มีลักษณะเหมือน diphtheria bacilli มาย้อมดู แล้ว streak ลงบน Blood agar plate เพื่อทำ Virulent test ต่อไป

Detection-Diphtheria toxin (Virulent test) :

การหา Toxin ของโรคคอตีบมี ๒ วิธีคือ

๑. Vivo test เป็นการฉีด intracutaneous เข้าสัตว์ทดลอง ซึ่งโดยมากใช้กระต่ายหรือหนูตะเภา

๒. Vitro test (Eleck's Method) หน่วยบัคเตรี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ใช้วิธีนี้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด ตามนโยบาย มีวิธีทำดังนี้ :

๑. ใช้กระดาษกรองขนาด๑.๕×๗ ซ.ม. ที่ปราศจากเชื้อจุ่มใน Diphtheria toxin ๕๐๐ Unit/ml. นำไปวางบน surface ของ serum agar ใน petri plate กดแผ่นกระดาษกรองให้ติดกับ surface ของ agar นั้น

๒. นำ plate นั้นไปทำให้แห้งในตู้อบ ๓๗°C นาน ๑-๒ ช.ม. โดยแง้มฝา plate เล็กน้อย

๓. ใช้เชื้อที่แยกได้ pure แล้ว นำมา streak จากขอบของแผ่นกระดาษกรองลากมาจนถึงขอบ plate ทำ positive control จากเชื้อ Diphtheria ที่พิสูจน์แล้วว่ามี Virulence

๔. นำ plate นั้นไปเข้าตู้อบ ๓๗°C นาน ๔๘ ช.ม. แล้วจึงอ่านผลโดยดู precipitating line ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ positive control.

จาก Data ตลอดปี ๒๕๑๔ แสดงให้เห็นว่ายังพบเชื้อนี้ได้บ้างในชุมชน

ปัญหาที่สำคัญที่จะต้องนำมาพูดถึง คือ การระบาดของโรคนี้เป็นแบบ Droplet สมัยก่อนที่ยังไม่มี artificial immunization ต่อโรคนี้ ผู้ที่ contact กับผู้ป่วยโรคคอตีบจะค่อย ๆ มีความต้านทานต่อโรคนี้จนพอที่จะป้องกันโรคนี้ได้ตลอดไป โรคคอตีบจึงเป็นในเด็กเล็กมาก ผิดกับปัจจุบันนี้ เรามีวัคซีนป้องกันทันสมัย แต่ก็มีช่องว่างอยู่ระยะหนึ่งคือระยะที่ Artificial immunity น้อยลง และ Natural immunity จึงไม่มากพอที่จะฆ่าเชื้อ C. diphtheria เป็นเหตุให้เชื้อนี้เล็ดลอดเข้าไปอาศัยอยู่ในคอ เป็นพาหะที่สำคัญของโรคนี้ไป

รายงานนี้จะสมบูรณ์กว่านี้ ถ้าได้ identify จาก throat swabs ของ personels ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยทุกท่าน

Discussion

การ smear และย้อมด้วย Methylene blue เพื่อดู Metachromatic granules ช่วยในการ identify เชื้อคอตีบ พบว่าเชื้อที่ได้จาก Clauberg II media หรือ Tellurite media ไม่ค่อยเห็น Metachromatic granules ใน blood agar plate จะเห็น granules ได้บ้าง แต่ใน Loeffer media เห็น granules ชัดมาก

การทำ Elek test บางครั้ง control ได้ผล false negative เนื่องจากว่า การที่เก็บเชื้อนานๆ (subculture) ทำให้เชื้อเสียคุณสมบัติในการสร้าง Toxin

Serum ที่ใส่ใน base media เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งที่ส่งเสริมให้เกิด precipitating line

หน่วยบัคเตรี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ใช้ Horse serum 2 ml. ต่อ base media 15 ml. และมักจะเห็นผล positive (ถ้าเชื้อที่พบมี Virulence) ภายใน ๑๘ ช.ม. และ line นี้จะเห็นชัดขึ้นทุกที่ใน ๔๘ ช.ม.

การทำให้แห้งของ agar surface เมื่อวางกระดาษกรองนั้น พบว่า ๑—๒ ช.ม. เป็นเวลาที่เหมาะสม เพราะถ้านานกว่านี้ precipitating line จะเกิดช้า และถ้า surface มีความชุ่มชื้นมาก เชื้อที่ streak จะไหลซึมไปในกระดาษกรองปนกันไปหมด

นอกจากนั้น precipitating line ที่เกิดขึ้นใกล้กับกระดาษกรองมาก (เพราะ Antitoxin มี potency ไม่ดี)

การ dry surface หลังจากวางกระดาษกรองที่ชุบ antitoxin นั้น เวลา ๑—๒ ช.ม. เป็นระยะที่เหมาะสม ถ้านานไป surface agar แห้งเกินไป พบว่า precipitation line จะเกิดช้า แต่ถ้า surface ยังเปียกชุ่มอยู่เชื้อที่ streak จะไหลซึมไปตามกระดาษกรองปนกับเชื้ออื่น นอกจากนี้ precipitation line ที่เกิดขึ้นจะอยู่ใกล้กับขอบกระดาษกรอง เห็นไม่ค่อยชัด การดู line ควรจะส่องกับแสงไฟสว่าง

Reference :

1) Daniels, J.B., M.P. Johnson, and R.A. Mac Cready.— Laboratory Diagnosis of Corynebacterium diphtheriae: Early

report of positive cultures in O–8 hrs.– Can. J. Public Health, 42:185–189, 1951.

2) Burkhardt, F. Bacteriological and Serological Standard Method of the Department of Medical Science, Bangkok, Nov. t,–Page 19, 1968.

3) Blair, J.E., Lennette, E.H., and Traunt, J.P.– Manual of Clinical Microbiology, Bethesda, MD.–Page 89–94,1970.

Acknowledgement:

ผู้รายงานขอขอบคุณ

๑. หัวหน้าแผนกจุลชีววิทยาที่อนุญาตลงตีพิมพ์

๒. ผศ. ดิลก เย็นบุตร ที่ได้ตรวจแก้ไขและแนะนำมาโดยตลอด