

MycobaKK : ชุดสีย้อมเชื้อวัณโรคราคาถูก *

บรรจบ ศรีภา**

ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์***

ภาควิชาพยาธิวิทยา และ *นักวิทยาศาสตร์โครงการ

ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

MycobaKK : An Inexpensive Tubercle bacilli Staining Kit

Banchob Sripa**, Pramote Srivanitcharak***

Department of Pathology and *Research Assistant, Department of Surgery,
Faculty of Medicine, Khon Kaen University

MycobaKK is a staining kit for mycobacteria prepared from a commercially available cotton dye and was developed by the authors. Experimental evidences on various specimens have demonstrated comparable staining quality with the standard acid fast staining using Ziehl Neelsen method. MycobaKK has been applied both on the sputum and paraffin sections with reliable effectiveness and quality. Preparation of the staining kit is simple and is 20-fold cheaper than the standard one. The staining mixture is thus expected to be useful and applicable for routine tubercle bacilli staining in diagnostic and hospital laboratories.

บทนำ

จากการศึกษานำเอาสีย้อมผ้าที่มีขายตามท้องตลาดทั่วไปและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสีย้อมเบสิก ฟุคชินมาทำการย้อมเชื้อวัณโรคและได้พัฒนาเป็นชุดสีย้อมสำเร็จรูปราคาถูก MycobaKK ผลปรากฏว่าชุดสีย้อมดังกล่าวสามารถย้อมเชื้อวัณโรคทั้งในเสมหะและชิ้นเนื้อส่งตรวจผู้ป่วยวัณโรคได้ดีเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน Ziehl-Neelsen นอกจากนี้ยังสะดวกและเฉพาะราคาสีย้อมก็ถูกกว่าประมาณ 20 เท่า จากผลการศึกษานี้คาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ในการตรวจเชื้อวัณโรคในห้องปฏิบัติการชันสูตรทั่วไปและเป็นการประหยัดงบประมาณแผ่นดินด้วย

—X—

การตรวจหาเชื้อมาโคแบคทีเรีย (Mycobacteria) ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรคในเสมหะหรือชิ้นเนื้อส่งตรวจสามารถกระทำได้หลายวิธี แต่ที่สะดวกและเป็นที่ยอมรับกันมากในงานประจำวันก็คือ Ziehl-Neelsen method⁽¹⁾ ซึ่งอาศัยคุณสมบัติการทนกรด (acid-fastness) ของแบคทีเรียส่วนประกอบหลักของสีย้อมที่ใช้ย้อมโดยวิธีการนี้ก็คือเบสิก ฟุคชิน (basic fuchsin) แต่เนื่องด้วยสีนี้มีราคาก่อนข้างแพง ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำเอาสีย้อมผ้าที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันซึ่งมีขายตาม

ห้องตลาดทั่วไปมาทดสอบเปรียบเทียบ ปรากฏว่าได้ผลดีและมีราคาถูกกว่าถึง 20 เท่า จากนั้นจึงได้พัฒนามาเป็นสีย้อมสำเร็จรูป MycobacKK

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสีย้อม MycobacKK : ละลายสีย้อมผ้าชนิดสีบานเย็น (ตราแมลงมุม) 0.5-1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มจนละลายทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมฟีนอล 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองแล้วเก็บในขวดสีชา กรองสีทุกครั้งก่อนใช้

Acid alcohol : 3% HCl ใน 95% อีทกอลฮอร์

Counter stain : 1% Methylene blue ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

การย้อมสี : ย้อมตามวิธีมาตรฐาน Ziehl-Neelsen method⁽¹⁾ โดยหยดสี MycobacKK พอท่วมสเมียร์หรือ paraffin sections ที่ผ่านขบวนการ deparaffinization และ rehydration มาแล้ว ล้างด้วยตะเกียงอีทกอลฮอร์จนสีเดือดพอเป็นไอ แล้วล้างน้ำ, decolorized ด้วย acid alcohol และ counter stained ด้วย 1% Methylene blue

Microwave method : หยดสีย้อม MycobacKK พอท่วมสเมียร์หรือ paraffin section แล้วนำเข้าตู้อบไมโครเวฟเป็นเวลา 30-60 วินาที จากนั้นจึงผ่านขบวนการตามวิธีปกติ นอกจากนี้ยังได้ทดสอบคุณสมบัติการติดสีกับแบคทีเรียตัวอื่นๆ และการทนกรดของสี MycobacKK ด้วย

สรุปผลและวิจารณ์

จากการทดสอบคุณสมบัติของสีย้อม MycobacKK ผลปรากฏว่าคุณสมบัติการติดสีและความเฉพาะเจาะจงไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน Ziehl-Neelsen method (ดังตารางที่ 1) สามารถย้อมได้ทั้งสเมียร์เสมหะ และชิ้นเนื้อส่งตรวจ (paraffin sections) สเมียร์เสมหะผู้ป่วยวัณโรคที่ทิ้งไว้หลายวันและมีแบคทีเรียตัวอื่นเพิ่มขึ้น เมื่อนำมาย้อมก็สามารถพบความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ระหว่าง Acid fast กับ Non-acid fast bacteria สำหรับคุณสมบัติความทนกรดของสีย้อม MycobacKK สามารถทน Acid alcohol, กรดกำมะถัน (H_2SO_4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1%, 5% และ 20% รวมทั้งน้ำกรดเติมเบสเตอริไรเซนต์ด้วย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการย้อมสีด้วย Ziehl-Neelsen method และ MycobacKK

	การติดสี Ziehl-Neelsen method	MycobacKK
Tuberculous sputum	+	+
Non-tuberculous sputum	-	-
Histological sections of tuberculosis	+	+
Mycobacterium tuberculosis	+	+
Nocardia sp.	-	-
Pseudomonas pseudomallei	-	-
Staphylococcus aureus	-	-
Staphylococcus sp.	-	-
Enterococcus sp.	-	-
Klebsiella sp.	-	-
E. coli	-	-
Salmonella sp.	-	-
Shigella sp.	-	-

ตารางที่ 2 ความทนกรด (Acid fastness) ของสี MycobKK

	ความทนกรดหลังจาก			ด้วย	
	1% H ₂ SO ₄	5% H ₂ SO ₄	20% H ₂ SO ₄	น้ำกรด เค็มแบบเคเตอร์	acid alcohol
Mycobacterium tuberculosis	+	+	+	+	+
Nocardia sp.	-	-	-	-	-
Pseudomonas pseudomallei	-	-	-	-	-
Non-acid fast bacteria	-	-	-	-	-
Histological sections of tuberculosis	+	+	+	+	+

ส่วนการใช้ตู้อบไมโครเวฟช่วยในการย้อมสีพบว่าใช้ได้ดีสำหรับสี MycobKK โดยเชื่อมา-โคแบคทีเรียจะติดสีเหมือนวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อดีที่ใช้เวลาสั้นกว่าและสไลด์สะอาดปราศจากเขม่าตะเกียง นอกจากนี้เชื่อมาโคแบคทีเรียยังสามารถถูกทำลายได้ด้วยไมโครเวฟ⁽²⁾

ผลจากการศึกษาคุณสมบัติของสี MycobKK ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถใช้ย้อมเชื้อวัณโรคและเชื่อมาโคแบคทีเรียตัวอื่นได้ผลดีเทียบเท่า

วิธีย้อมมาตรฐาน แต่มีราคาถูกกว่าประมาณ 20 เท่า จึงคาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ในการตรวจเชื้อวัณโรคในหึ่งปฏิบัติการทั่วไป

เอกสารอ้างอิง

1. Bartholomew JW. Stains for microorganisms in smear. In: Clark G, ed. Staining Procedures. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1973: 251-4.
2. Spencer S.R.C, Lee M, Gooch H, Duerden B. Use of microwares for acid and alcohol fast staining. J Clin Pathol 1985; 38: 1073-84.