# เปรียบเทียบผลการใช้อาหารไข่สูตร Ogawa และสูตร Loewenstein-Jensen ในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค**

ชัยเวช นุชประยูร*

*A preliminary comparison of "Loewenstein–Jensen" and "Ogawa" media on routine mycobacterial isolation in 3248 specimens showed that the Ogawa medium, which is easier prepared at cheaper cost, and widely used in a certain area of the world, tended to give positive result less frequently than the former one.*

เป็นที่ยอมรับกันว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจากเสมหะด้วยอาหารเพาะเชื้อประเภทไข่นั้นเตรียมง่าย ราคาถูก และใช้ได้ผลดีในการเพาะเชื้อวัณโรคประจำวัน อาหารเพาะเชื้อประเภทนี้ ประกอบด้วยไข่, กลีเซอรอล และสารละลายเกลือแร่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สูตรเหล่านี้มีหลายชนิดและมีความแตกต่างกันในส่วนผสมของสารละลายเกลือแร่ เช่น สูตรของ Loewenstein–Jensen (L–J) มีส่วนประกอบของสารละลายเกลือแร่ ซึ่งประกอบด้วย asparagine, magnesium citrate, magnesium sulfate และ mono potassium phosphate, ในปัจจุบันสูตร L–J นี้ ยังถือว่าเป็นสูตรมาตรฐานและเป็นที่นิยมใช้ทั่วไป[1] ถึงแม้ว่าต้องใช้เกลือแร่หลายชนิดและราคาแพง จึงได้มีผู้ดัดแปลงสูตรสารละลายเกลือแร่ให้ผสมง่ายยิ่งขึ้น และมีราคาถูกลง สูตรซึ่งง่ายและถูกกว่า L–J สูตรหนึ่งคือ สูตร "Ogawa" ซึ่งนิยม

* ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย

** งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุน "พระยามไหสวรรย์"

ใช้กันแพร่หลายในประเทศญี่ปุ่น[3] มีส่วนประกอบของสารละลายเกลือแร่ ประกอบด้วย mono sodium glutamate (ผงชูรส) กับ mono potassium phosphate

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ ก็เพื่อเปรียบเทียบดูว่าอาหารเพาะเชื้อสูตร Ogawa ซึ่งผสมง่ายและถูกกว่านั้น จะได้ผลทัดเทียมกับสูตร L–J ในการนำมาใช้ในการเพาะเชื้อเป็นประจำวันสำหรับผู้ป่วยของเราหรือไม่

## วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้ กระทำที่หน่วยชันสูตรโรคของสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ฯ อาหารเพาะเชื้อสูตร Loewenstein – Jensen (L–J) และสูตร Ogawa ที่ใช้ในการศึกษานี้เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทผนวกท้ายรายการนี้

โดยปกติ การเพาะเชื้อวัณโรคประจำวันกระทำโดยใช้อาหารเพาะเชื้อ 2 ขวดต่อหนึ่งตัวอย่างด้วยวิธี swab culture[4] ซึ่งมีหลักการโดยย่อคือ ใช้ swab 2 อันกวนเสมหะแล้วนำมาแช่ใน oxalic acid เพื่อลด contamination จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วย sodium citrate แล้วจึงป้ายลงบนอาหารเพาะเชื้อ รายละเอียดของการปฏิบัติมีดังต่อไปนี้

**เครื่องใช้**

1. Swab
2. หลอดแก้วขนาด 20×1.50 ม.ม.
3. น้ำยา 5% oxalic acid
4. น้ำยา 5% sodium citrate
5. Racks
6. อาหารเพาะเชื้อ
7. ตู้ฟักอุณหภูมิ 37° เซลเซียส

Swab ทำด้วยไม้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2–3 มม. ยาว 6–8 นิ้ว ใช้สำลีพันปลายไม้ข้างหนึ่งให้แน่น (ความยาวของสำลีที่พันปลายไม้ยาวประมาณ 1") นำ Swab ที่ทำเรียบร้อยแล้วใส่กล่องสังกะสีที่มีฝาปิด เรียงเอาปลาย Swab ลงข้างล่างเพื่อความสดวกในการหยิบใช้ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

**วิธีทำ** เอา Swab ชุบน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Sterilized water) แล้วนำไปกวนในภาชนะที่ใส่เสมหะใช้ swab 1 คู่ต่อหนึ่ง specimen แล้วเอา swab นี้ใส่ในหลอดแก้วสอาดที่นึ่งแล้ว (1 คู่ต่อหนึ่งหลอด) เรียงไว้ใน racks ซึ่งเรียงหลอดแก้วได้ 2 แถว หลอดแก้วที่ใส่ swab เรียงไว้แถวหน้า เรียงหลอดแก้วที่สอาดอีกจำนวนหนึ่งไว้แถวหลัง เทน้ำยา Oxalic acid 5% ลงในหลอดแก้วแถวหน้า ซึ่งใส่ swab อยู่ ให้น้ำยาท่วม swab แช่ทิ้งไว้ 25 นาที

ขณะที่คอย swab แช่ให้ครบกำหนด เทน้ำยา sodium citrate 5% ลงในหลอดแก้วที่เรียงไว้แถวหลังประมาณครึ่งหลอด

เมื่อแช่ swab ครบ 25 นาทีแล้ว ก็ยก swab ขึ้นและใส่ลงไปในหลอดแก้วแถวหลัง (ซึ่งมีน้ำยา citrate) แช่ทิ้งไว้นาน 10 นาที แล้วนำไปป้ายในอาหารเพาะเชื้อทันที

**วิธี inoculate** กระทำโดยนำ swab ที่ผ่านการแช่ใน citrate ครบ 10 นาทีแล้ว มาถูบนพื้นหน้าของอาหารเพาะเชื้อ ในการถู swab บนพื้นหน้าของอาหาร หมุน swab ไปด้วยขณะที่ถู และไม่ถูแรงจนอาหารติดออกมา ใช้ swab 1 อันต่อสารเพาะเชื้อ 1 ขวด และเสมหะจากผู้ป่วยหนึ่งตัวอย่างต่อสารเพาะเชื้อ 1 คู่

นำขวดเพาะเชื้อที่ทำเรียบร้อยแล้ว ใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37 เซลเซียส

ตรวจการเพาะเชื้อทุกสัปดาห์ เมื่อมีเชื้อขึ้น กระทำการพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อวัณโรค โดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวะเคมีดังต่อไปนี้

ก. งอกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังสัปดาห์ที่สอง

ข. นิคม ไม่มีสี และไม่เปลี่ยนสี

ค. ทดสอบ Niacin ให้ผลบวก

ง. ทดสอบ Catalase ให้ผลบวกต่ำ ๆ

จ. ทดสอบ Nitrate reduction ให้ผลบวก

ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นเลย ภายหลังสัปดาห์ที่ 8 ไปแล้ว อ่านผลว่าลบ และถ้ามีเชื้ออื่นปะปนภายใน 8 สัปดาห์ ถือว่าเป็น contamination ในการศึกษานี้กระทำเป็น 2 ช่วง ติดต่อกัน กล่าวคือ ช่วงแรกทำการเพาะเชื้อด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร L-J 2 ขวดต่อหนึ่งตัวอย่าง ในช่วงนี้มีจำนวนทั้งสิ้นรวม 5,458 ตัวอย่าง ช่วงต่อมาทำการเพาะเชื้อด้วยอาหารเพาะเชื้อสูตร L-J หนึ่งขวดควบกับสูตร Ogawa หนึ่งขวดต่อหนึ่งตัวอย่าง ในช่วงหลังนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 4,090 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่เป็นเสมหะ ส่วนน้อยเป็นการป้ายจากกล่องเสียงและน้ำจากช่องปอด จากผู้ป่วยซึ่งมารับการตรวจที่คลินิคผู้ป่วยนอก และผู้ป่วยในของโรงพยาบาลสมาคมปราบวัณโรค และจากสถานพยาบาลต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร

## ผล

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราผลบวกระหว่างการเพาะเชื้อในช่วงแรก (LJ-LJ) กับการเพาะเชื้อในช่วงหลัง (LJ-Ogawa)

จากจำนวน 5,458 ตัวอย่างซึ่งเพาะเชื้อใน LJ–LJ นั้น ปรากฏว่ามี contamination ทั้งสองขวด ทำให้อ่านผลไม่ได้ 282 ราย *เหลือ* จำนวนที่อ่านผลได้ 5,176 ราย ในจำนวน 5,176 รายนี้ ปรากฏมีเชื้อขึ้นในขวดใดขวดหนึ่งหรือทั้งสองขวด ซึ่งรายงานได้ว่าบวกจำนวน 783 ราย คิดเป็นอัตราบวกร้อยละ 15.13

จากจำนวน 4,090 ตัวอย่าง ซึ่งทำการเพาะเชื้อในอาหารเพาะเชื้อ LJ–Ogawa นั้น ปรากฏว่ามี contamination ทั้งสองขวดซึ่งทำให้อ่านผลไม่ได้ 338 ราย คงเหลือจำนวนที่อ่านผลได้ 3,752 ราย ในจำนวนนี้ ปรากฏมีเชื้อขึ้นในขวดใดขวดหนึ่งหรือทั้งสองขวด ซึ่งรายงานได้ว่าบวก 607 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.18

อัตราบวกระหว่าง LJ–LJ (ร้อยละ15.13) กับ LJ–Ogawa (ร้อยละ 16.18) นี้ ถือได้ว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.10$)

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราบวกระหว่างการใช้อาหารเพาะเชื้อสูตรLJ กับสูตร Ogawa ซึ่งกระทำในช่วงที่สอง

จากจำนวน 4,090 ตัวอย่างซึ่งได้ป้ายลงในอาหารเพาะเชื้อ LJ และ Ogawa อย่างละขวดนั้น ปรากฏมี contamination ใน *ขวดใดขวดหนึ่ง* หรือทั้งคู่ ซึ่งต้องตัดออกเพราะอ่านผลไม่ได้เป็นจำนวน 842 ตัวอย่าง เหลือเพียง 3,248 ตัวอย่างที่จะนำมาเปรียบเทียบ

***ในจำนวน 3,248 ตัวอย่างปรากฏว่า***

| | | |
|---|---|---|
| ผลบวกทั้ง LJ และ Ogawa | 337 | ราย = ร้อยละ 10.38 |
| ผลลบทั้ง LJ และ Ogawa | 2,712 | ,, = ร้อยละ 83.50 |
| LJ +, Ogawa – | 121 | ,, = ร้อยละ 3.72 |
| LJ –, Ogawa + | 78 | ,, = ร้อยละ 2.4 |
| รวม LJ+ ทั้งหมด | 458 | ,, = ร้อยละ 14.10 |
| รวม Ogawa + ทั้งหมด | 415 | ,, = ร้อยละ 12.78 |

ความแตกต่างระหว่างอัตราบวกใน LJ (ร้อยละ 14.10) กับอัตราบวกใน Ogawa (ร้อยละ 12.78) มีความสำคัญทางนัยสถิติ ($x^2 = 8.77; p < 0.01$) ซึ่งแปลผลได้ว่าอัตราบวกใน LJ นั้น สูงกว่าใน ogawa

## วิจารณ์

การตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยวิธีเพาะเชื้อนับว่าเป็นขั้นตอนสำคัญ ไม่เพียงแต่จะช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรคเท่านั้น ยังมีประโยชน์ในการทดสอบการต้านยาด้วย เป็น

ที่หวังว่าสูตรอาหารที่ดี ควรจะเป็นสูตรที่เตรียมง่าย ราคาถูก และให้อัตราผลบวกสูง

ประเด็นของการศึกษานี้ ก็เพื่อดูว่า สูตร Ogawa ซึ่งเตรียมง่ายและราคาถูกกว่าสูตร LJ นั้นจะให้อัตราบวกสูง ทัดเทียมหรือดีกว่าสูตร LJ หรือไม่ เพราะหากให้อัตราบวกสูงทัดเทียมกันหรือสูงกว่าก็จะเป็นสูตรที่น่าจะนำมาใช้อย่างยิ่งสูตรหนึ่ง การศึกษานี้ไม่ได้ครอบคลุมถึงประเด็นอื่นเป็นต้นว่าสูตร Ogawa จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคดีทัดเทียมกับ LJ หรือไม่ ทั้งไม่ได้ตั้งใจจะเปรียบเทียบดูอัตรา contamination ระหว่างสูตรอาหารทั้งสอง เมื่อเปรียบเทียบดูอัตราบวกระหว่างช่วงที่ใช้สูตรอาหาร LJ–LJ กับช่วงที่ใช้ LJ–ogawa จะเห็นได้ว่าช่วง LJ–ogawa มีอัตราบวกสูงกว่าช่วง LJ–LJ เล็กน้อย ซึ่งเมื่อคำนวณหานัยสำคัญทางสถิติแล้ว ไม่ปรากฏความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ และถึงแม้ว่าการศึกษาดังกล่าวจะแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก็ยังไม่อาจสรุปได้ว่าสูตรใดสูตรหนึ่งดีเท่ากัน ทั้งนี้เพราะเป็นการเปรียบเทียบในช่วงเวลาต่างกัน ซึ่งอาจจะมีการกระจายของผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันกล่าวคือช่วงใดมีผู้ป่วยขั้น far advanced มากก็อาจพบอัตราบวกได้มากกว่า

ส่วนการเปรียบเทียบอัตราบวก ซึ่งทดสอบจากตัวอย่างเดียวกันในอาหาร 2 ชนิด พอจะช่วยยืนยันได้ชัดเจนว่า สูตร LJ นั้นให้อัตราบวกมากกว่าสูตร Ogawa อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าสูตร Ogawa นั้น ไม่ดีเท่ากับสูตร LJ แต่เนื่องจากเป็นสูตรที่เตรียมง่าย จึงอาจใช้แทนสูตร LJ ได้เมื่อจำเป็น

**ตารางที่ 1**

**Comparison LJ–LJ vs LJ–Ogawa**

| | LJ–LJ | LJ–Ogawa | Total |
|---|---|---|---|
| Total inoculation | 5,458 | 4,090 | 9,528 |
| Contamination both slopes | 282 | 338 | 620 |
| Culture excluding contamination | 5,176 | 3,752 | 8,928 |
| Reported positive (growth on either one) | 783 | 607 | 1390 |
| % positive | 15.13 | 16.18 | 15.57 |

$x^2 = 1.75 \quad p > 0.10$

**ตารางที่ 2**

เปรียบเทียบระหว่างสูตร LJ กับสูตร Ogawa
จากตัวอย่างเดียวกัน

| | |
|---|---|
| Total paired inoculation | 4,090 |
| Contamination (either LJ, or ogawa or both) | 842 |
| Uncontaminated specimen | 3,248 |
| Total LJ positive | 458 |
| Total ogawa positive | 415 |

| | | OGAWA | | |
|---|---|---|---|---|
| | | + | – | TOTAL |
| LJ | + | 337 (10.38) | 121 (3.72) | 458 (14.10) |
| | – | 78 ( 2.40) | 2,712 (83.50) | 2,790 (85.90) |
| | Total | 415 (12.78) | 2,833 (87.22) | 3,248 (100) |

( ) ร้อยละ $x^2 = 8.77 \quad p < 0.01$

# บทผนวก

LOEWENSTEIN-JENSEN MEDIUM[2]

**Basic solution**

| | | |
|---|---|---|
| Asparagine | 3.6 | g |
| $KH_2PO_4$ anhydrous | 2.4 | g. |
| $MgSO_4 7H_2O$ | 0.24 | g. |
| Mg-citrate | 0.6 | g. |
| Glycerol | 12 | ml. |
| Distilled water to | 600 | ml. |

Warm to dissolve the salts. Autoclave at 150 lbs for 15 min. Cooled to 56°C. Add 1,000 ml. well beaten eggs and 20 ml. of 2% aqueous solution of malachite green. Distribute it into McCartney bottle and inspissate the medium in a slanting position at 90°C. for 1 hour.

OGAWA MEDIUM (1%)[3]

**Basic solution**

| | | |
|---|---|---|
| Sodium glutamate | 5 | g. |
| $KH_2PO_4$ anhydrous | 5 | g. |
| Distilled water to | 500 | ml. |

1,000 ml. of well beaten eggs, 30 ml. of glycerol and 30 ml. of 2% malachite green are added. Mix the mixture well. Distribute it into McCartney bottles. Inspissate the medium in a slanting position at 90°C. for 1 hour.

## อ้างอิง

1. Kubica, G.P., Gross, W.M., Hawkins, J.E., Sommer, H.M., Vestal, A.L, and Wayne, L.G. : Laboratory Service for Mycobacterial Diagnosis, Amer. Rev. Resp. Dis. 112 : 773-788, 1975
2. Lennette, E.H, Spaulding, E.H., Truant, J.P. : Manual of clinical microbiology, 2nd Ed. Amer. Soc. Microbiol. Washington DC. 1974, p. 908

3. Tsugamura, M : Identification of mycobacteria. Tubercle 48 : 311–337, 1967

4. ไชยกาล, ป, เปรียบเทียบผลการเพาะหาเชื้อวัณโรคจากเสมหะโดยวิธี Concentration และวิธี Swab, จุลชีววิทยาสาร 5 : 13, 2504