บทความพิเศษ

ความก้าวหน้าในการวินิจฉัยคลามีเดีย อินเฟ็กชั่นส์ ทางห้องปฏิบัติการ

นราทร ธรรมบุตร*
วัฒนา พันธุ์ม่วง*

Dhamabutra N, Phum-muang W. Recent progress : laboratory diagnosis of Chlamydial infections. Chula Med J 1985 July ; 29 (7) : 755-767

At the 13 th. International Congress of Chemotherapy held in Vienna, the laboratory diagnoses of Chlamydial infections were reviewed and discussed. The routine bacteriological swab, or a specific swab was recommended for clinical-specimen-collection.

The original Mc-Coy tissue culture were modified and stimulated by various means, including cell irradiation and by special substances (Dextran or cyclohexidine, etc.). About the serological means, the idoxuridine treatment in combination with immunofluorescence antibody (FA) technique was tried as well as the ELISA technique, Hybridization, monoclonal and polyclonal antibody reactions. The complement fixation technique studied was reported to be less sensitive than the FA technique.

At present however serological tests in the diagnosis of chlamydial infections remain of restricted value, because patients with signs of genital infection often have antibodies representing anamnestic response to previous C. trachomatis exposures.

The roles of Chlamydial infections are also reviewed in this article.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพศสัมพันธ์แนวใหม่ทำให้มนุษย์รู้จักปัญหาในโรคติดเชื้อขึ้นอีกหลายอย่าง เป็นต้นว่า

(1) ผู้ป่วยชาย ที่เป็น anterior urethritis มี discharge ไสออกมา และผู้ป่วยมีอาการ ร้อน เจ็บบริเวณนั้นมาก หรือ

(2) ผู้ป่วยหญิง ที่มี leukorrhoeae และแพทย์ได้ตรวจ cervix จนถึงให้ diagnosis ว่าเป็น cervicitis หรือ salpingitis แน่ หรือ

(3) ผู้ป่วยบางรายที่มี urethral drip แพทย์ย้อมแกรมดูและพบว่าเป็นโกโนเรีย ผู้ป่วยได้รับ spectinomycin* และเพ็นนิศิลลินครบ course แต่ก็ยังมี "clear discharge" อยู่ดี

ปัญหาจึงอยู่ที่ว่า เมื่อส่ง clinical specimens จาก discharge ของผู้ป่วยที่เรียบเรียงในตอนแรกนั้นอย่างถูกต้องวิธีการเพื่อตรวจหาปาโธเจนส์ที่แล็บผลการตรวจเพาะเชื้อมักจะ "No growth" หลายเปอร์เซ็นต์ เมื่อเป็นเช่นนี้แพทย์มักจะลงความเห็นว่าผู้ป่วยเป็น "หนองในเทียม"[1]

โรคหนองในเทียม เป็นโรคใหม่ที่รู้จักกันไม่นานนัก สาเหตุของโรคนี้เกิดจาก Chlamydia-trachomatis ซึ่งมี immunologic types D ถึง K (Table 1)

Chlamydiae เป็นกลุ่มบัคเตรีที่ grow และเพิ่มจำนวนแบบ binary fission ใน cell cytoplasm

Table 1 Chlamydial diseases*

SPECIES	SEROTYPE	DISEASE
C.psittaci	Many unidentified serotypes	Psitacosis
C.trachomatis	L 1, L 2, L 3	Lymphogranuloma venereum
C.trachomatis	A, B, Ba C	Hyperendemic blinding trachoma
C.trachomatis	D, E, F, G, H, I, J, K	Inclusion conjunctivitis (adult and new born) nongonococcal urethritis cervicitis, salpingitis proctitis, epididymitis and pneumonia of new borns

* From Schachter J.Chlamydial infections. New Eng J Med 1978; 298 : 428-435.

* Chlamydia infection "ดื้อ" ต่อยาต้านจุลินทรีย์ spectinomycin.

ของโฮสท์[2] และมีเพียง 2 สปีคีสที่แบ่งตาม antigenic compositive เป็น

ก. Chlamydia psittaci ก่อโรค ornithosis ในนก โรค psittacosis ในคน, โรค meningo pneumonia โรค feline pneumonitis เป็นต้น

ข. *Chlamydia trachomatis* ก่อโรค inclusion conjunctivitis ผู้ป่วยบางรายมีอาการทาง genital involvement คือ urethral discharge บัคเตรีนี้สามารถ infected ผู้ป่วยพร้อม ๆ กับที่ผู้ป่วยเป็นโกโนเรีย (double infection) เมื่อรักษาโกโนเรียหาย ไม่พบตัว gonococci แล้วก็ตาม ผู้ป่วยยังมี discharge อยู่ ซึ่งเดิมเรียกสภาวะอย่างนี้ว่า post gonococcal urethritis การแยกหาตัวในห้องแล็บไม่พบอะไร เพราะคลามีเดียแม้ว่าเป็นบัคเตรีชนิดหนึ่งก็ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายนัก โรค post gonococcal urethritis ในปัจจุบันจึงกลายเป็นโรค non gonococcal urethritis (N G U) หรือ non specific urethritis (N S U)

อนึ่ง การที่แพทย์ทั่วไป (general practitioners) ใช้วิธีวินิจฉัยโรค Chlamydial urethritis (N S U) โดยย้อมสีแกรมจาก urethral discharge และใช้การ exclusion ถ้าไม่พบบัคเตรีแกรมลบ diplococci (kidney shape) ก็จะอนุมาณเอาว่าผู้ป่วยเป็นหนองในเทียม ไม่ใช่ specific urethritis นั้นอาจจะไม่ถูกต้องเสมอไป

การแจ้งให้ผู้ป่วยทราบว่า เป็นโรคหนองในเทียมนั้น แม้ว่าแพทย์จะอ้างว่าจะทำให้ผู้นั้นหยุด "สำส่อน" แต่ในทางตรงกันข้าม ผู้ป่วยรายนั้นอาจหยุด "สำส่อน" จริงแต่กลายเป็นโรคประสาทหลอนไป เท่ากับเป็น Iatrogenic disease หรือฆ่าผู้ป่วยให้ตายไปทีละน้อย คำว่า "หนองในเทียม" เป็นคำขวัญ ที่น่ากลัว สยองขวัญต่อประชากรทั่วไป จึงควรชั่งใจให้ดีว่าควรจะวินิจฉัยว่า ผู้ป่วยเป็นหนองในเทียมละหรือ?

1. **แอนติเจนส์ของกลุ่มคลามีเดีย** คลามีเดียมีแอนติเจนส์ 2 ทัยป์ใน cell wall;[2-4]

ก. Group antigens : Chlamydiae ทุกพันธุ์มี group antigens เหมือนกันเป็น lipopolysaccharides ที่ทนเอ็นซัยม์ nuclease ทน proteinase แต่ถูกทำลาย (inactivated) โดย periodate และ lecithinase อย่างไรก็ดี ลักษณะ antigens นี้เหมือนแกรมลบ บาศิลไล ทั่วไป

ข. Specific antigens : อยู่ที่ cell wall เช่นกัน

เมื่อ fluorocarbon และ deoxycholate ทำลาย group antigens ส่วนที่เหลือเป็น specific protein ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี immunoadsorption

ฉะนั้น specific antigens ของคลามีเดียควรจะ detect โดยวิธี immunofluorescence antibody (F A)

C.trachomatis มีถึง 15 ทัยป์ ใน 15 ทัยป์, เป็น L G V* 3 ทัยป์ toxic effects มักจะสัมพันธ์กับ specific antigens, ซึ่งถ้าสามารถลบล้าง toxic นี้ได้ (โดยวิธี neutralization) ผลที่เหลือก็คือ group antigens ซึ่งเหมือน ๆ กันในกลุ่มคลามีเดียทั่วไป

2. **พยาธิกำเนิด**[5-8]

Trachoma และ N G U** เกิดจาก *C.trachomatis* ด้วยกัน แต่ต่างกันที่ immunotypes

---

* Lymphogranuloma venereum.

** Non gonococcal urethritis.

ก. Trachoma คือ chronic keratoconjunctivitis ที่มี follicles, papillay hypertrophy, pannus และสิ้นสุดด้วยการเกิด scar formation จนกระทั่งตาบอด

(1) ในเด็ก (new born) คือ acute purulent conjunctivitis หรือ inclusion conjunctivitis

(2) ในผู้ใหญ่ คือ follicular conjunctivitis ทำให้เกิด scar ring และ minor corneal involment

ข. ใน N S U* * * เกิด inclusion เช่นเดียวกับ conjunctivitis แต่ target site คือเนื้อเยื่อที่ genital tract ทำให้เกิด N G U, cervitis หรือ asymptomatic infection

(1) ในเพศชาย (male) เกิด urethritis (non gonococcal) หรือ epididymitis

(2) ในเพศหญิง (female) เกิด cervicitis, salpingtis หรืออุ้งเชิงกรานอักเสบ pelvic inflammatory disease (P I D)

3. การวินิจฉัยคลามีเดีย อินเฟ็กชั่นทางแล็บ (recent progress)

เมื่อ 28 สิงหาคม-2 กันยายน 2526 มีการประชุมระดับชาติ ครั้งที่ 13 (International Congress of Chemotherapy) ณ กรุงเวียนนา ประเทศออสเตรีย ที่ประชุมประกอบด้วยผู้เชี่ยวชาญทางคลามีเดีย อินเฟ็กชั่นส์ หลายท่านจากหลายสถาบันในโลก มีการวิจารณ์ วิธีการ ข้อดีและข้อเสียทางแล็บคลามีเดีย ที่พอประมวลได้ดังนี้

3.1 การเก็บสปีคิเม็นส์ :[9,10,11]

การเก็บแซมเปิลเพื่อหา Chlamydial infections ต้องคำนึงถึง;

ก. ใช้ tube swab ที่ดี อาจอนุโลมใช้แบบเดียวกับที่เก็บ clinical specimens เพื่อส่งแล็บ แบ็คทีเรียธรรมดาได้. swab ที่ดีคือ medical wire equipment แบบที่ทางหน่วยโสต ศอ นาสิก ลาริงซ์ใช้ และควรใช้ swabs ที่ไม่มีสาร calcium alginate จะทำให้การพบตัวคลามีเดียได้ง่ายขึ้น บางแล็บอาจเติมแอนตี้ไบโอติคลงไปใน swab ด้วยปฏิชีวนะที่ใช้คือ amphotericin B 2.5 ไมโครแกรม/มิลลิลิตร, vancomycin* 100 ไมโครแกรม/มิลลิลิตร และ gentamycin 10 ไมโครแกรม/มิลลิลิตร

ข. ต้องเก็บ samples ให้ถูกตำแหน่ง เป็นต้นว่า เก็บจาก genital area

ข. 1 ถ้าเป็นสตรี เก็บจากบริเวณปากมดลูกย่อมจะมีโอกาสได้ตัวคลามีเดียมากกว่าเก็บจากแซมเปิลจาก vaginal canal

ข. 2 ถ้าเป็นชาย ควรเก็บ clinical specimens จากบริเวณ urethral meatus โดยสอด instrument ลึกเข้าไป male urethra ประมาณ 2-3 เซ็นติเมตร

ข. 3 ถ้าเป็นเด็ก (infants) ควรเก็บบริเวณ nasopharyx ดีกว่าบริเวณอื่น ๆ

การใช้ transport tissue culture medium มีอายุนับตั้งแต่เก็บ clinical specimens ไม่ควรเกิน 2 วัน

3.2 การวินิจฉัย *C.trachomatis* ในห้องแล็บ :

3.2.1 คุณสมบัติในการย้อมสีจาก Conjunctival scraping หรือ epithelal urethral scraping, หรือ cervical scraping เพื่อหา typical cytoplasmic inclusion คลามีเดียย้อมสีแกรมมักไม่ติดสีดี Chlamydiae สามารถย้อมให้เห็น

* แวนโคมัยคิน เป็นของบริษัท Eli Lilly USA. แอนตี้ไบโอติคนี้มีขายในประเทศไทยแล้ว

* * * Non specific urethritis.

ได้ชัดเจนเหมือนกลุ่มริกเก็ตเสีย, โดยใช้ Giemsa's stain และ Macchiavello's stain

ก. Elementary bodies (small particles) ที่แก่เต็มที่ ย้อมเห็นสีม่วงใน Giemsa's stain และถ้าใช้ Macchiavello's stain จะติดสีแดงตัดกับสี blue ซึ่งติดเฉพาะ cytoplusm ของ host-cell

ข. Initial bodies (the larger, non infective particles) ถ้าย้อมด้วย Giemsa's stain ติดสี blue

ค. Intracellular inclusions (mature form) ถ้าใช้ Giemsa's stain จะเห็น compact mass ใกล้ ๆ นิวเคลียส ซึ่งตัว nucleus ติดสี dark purple

ถ้าใช้ Lugol's iodine solution ย้อม inclusions คลามีเดียที่เป็นเหตุของโรค L G V* , trachoma และโรค inclusion conjunctivitis ติดสี brown เพราะมีสารชนิดหนึ่งคล้ายกลัยโคเจน (glycogenlike matrix) มาจับรอบ ๆ inclusions สารนี้ติดสีน้ำตาล

3.2.2 ปัญหาเรื่องการเพาะเลี้ยง Chlamydiae ทางแล็บ

การแยกวิเคราะห์และเพาะเชื้อตัว Chlamydia ที่มีการวิจารณ์ในที่ประชุม ณ กรุงเวียนนา พอประมวลได้ดังนี้ :-

ก. วิธีเดิม (cells tissue culture)[12]

ปี ค.ศ. 1975, Tang และคณะ เป็นพวกแรกที่แยกวิเคราะห์ Chlamydia trachomatis จาก embryonated egg วิธีนี้ใช้เวลานานมากและผลการเพาะเลี้ยงมักไม่ได้ chlamydiae เพราะ *C.trachomatis* บางสายพันธุ์ไม่ grow ในเซลล์ของ embryonated egg.

ข. การกระตุ้นให้ cell ใน tissue culture "sensitive" ต่อ Chlamydiae มากขึ้น โดยการ

ข. 1 ใช้การแผ่รังสีกระตุ้น[13-15]

Gordon และคณะใช้ radiated ต่อ mouse fibroblast (Mc Coy cells) เพื่อให้เซลล์นี้ "sensitive" ต่อ Chlamydia มากขึ้น โอกาสที่จะได้ตัว Chlamydia มีมากขึ้น ผลการศึกษาข้อมูลปรากฏว่า cells ที่ถูก radiated ยังรับ Chlamydiae ไม่ได้ดีพอเพราะต้องใช้เวลา pretreatment ถึง 5 วัน

ข. 2 วิธี cell culture techniques

ปี 1974, มีผู้ใช้วิธี cell culture techniques ร่วมกับยา cytostatic (เป็นต้นว่า 5 iodo-2-deoxy-uridine. สาร cytochalasin B และสาร cycloheximide) สารดังกล่าวจะทำให้ cell-line เกิด "susceptible" ต่อจุลินทรีย์ Chlamydia มากขึ้น ทำให้การแยกวิเคราะห์มีรายงานว่าดีขึ้น, แต่ก็ต้องใช้ pretreatment ถึง 3 วัน

ข. 3 Hela cells No.229 และสาร DEAE-Dextran* * [16-24]

ในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีรายงานว่าการใช้ Hela cells No.229 ร่วมกับการทำ pretreatment ด้วย สาร DEAE-Dextran หรือสาร cycloheximide ทำให้การแยกวิเคราะห์และเพาะได้ Chlamydiae ได้มากขึ้น นับว่าเป็นการก้าวหน้า (recent progress techniques) ที่

---

* Lymphogranuloma venereum

* * DEAE คือ Diethyl amino ethyl dextran.

ดีที่สุด แต่เดิมนั้น วิธีที่ sensitive ที่ดีที่สุดในการวินิจฉัยคลามีเดียในแล็บ คือการใช้ idoxuridine อาบ (treat) cell culture เพื่อหา typical inclusions ใน epithelial cells โดยวิธี immunofluorescence antibody (FA) ซึ่งทำได้เร็วแต่ก็ต้องอาศัยผู้ชำนาญ และมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย[25-28]

3.3 **ทางสีร์โรโลยี** : เพื่อให้เข้าใจกระบวนการทางสีร์โรโลยีในการช่วยวินิจฉัยคลามีเดีย อินเฟ็กชั่นทางแล็บ, จึงขออธิบายคำที่สำคัญทางอิมมิวโนโลยีไว้ก่อน ดังนี้ :-

- **Monoclonal antibody** คือ antibody ที่จำเพาะต่อ antigenic determinant อันหนึ่งอันใดที่กระตุ้น clone เซลล์ที่จำสร้าง antibody นั้น clone เดียวเพื่อสร้าง antibody ชนิดเดียวที่จำเพาะต่อ antigen ที่ไปกระตุ้นนั้น

การสร้าง monoclonal antibody-in vivo ทำได้โดยเตรียม antigen ที่เป็น pure form ชนิดเดียวกระตุ้นสัตว์ทดลองสร้าง antibody ต่อ antigen นั้น ๆ ได้ แล้วนำ spleen cell ของสัตว์นั้น (ซึ่งนิยมใช้ mice) มา fuse เข้ากับ plasmacytoma cell* ซึ่งจะสร้าง antibody ชนิดเดียว ส่วนเซลล์ลูกผสมที่ได้จะสร้าง antibody ชนิดเดียวตามคุณสมบัติของ plasmacytoma และเป็น antibody ต่อ antigenic determinant ที่ไปกระตุ้น clone cells นั้นเพียงชนิดเดียว

- **Polyclonal antibody** คือ antibody's antigen หลาย ๆ ชนิดซึ่งเกิดจากการสร้างของ clone เซลล์หลาย ๆ เซลล์ให้ antibody ต่อ antigens หลาย ๆ ชนิด ซึ่งอาจจำเพาะหรือไม่จำเพาะต่อ antigen ที่เข้าไปกระตุ้นก็ได้ การเกิด polyclonal antibody ในร่างกายอาจเกิดพยาธิสภาพขึ้นในร่างกาย หรือไม่เกิดก็ได้ แล้วแต่ความจำเพาะของ antibody นั้น การเกิด polyclonal antibody เกิดจากร่างกายถูกกระตุ้นด้วย antigen ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น polyclonal B-cell activition ซึ่ง clone cell หลาย ๆ cells สร้าง antibody ขึ้น การเกิด polyclonal antibody สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างได้โดยฉีด Anti Ig D antibody ต่อสัตว์พันธุ์นั้นก็ได้ หรือในคนที่เป็น malarial infection ก็อาจพบ antibody ต่อเนื้อเยื่อตัวเองได้ หรือคนที่เป็น mycoplasma infection ก็อาจพบ cold antibody ต่อเม็ดเลือดแดง หมู่ O ได้

- Hybridoma คือเซลล์ลูกผสมที่ได้จาก spleen cell ของหนูซึ่งกระตุ้นด้วย antigen ที่ต้องการ กับ plasmacytoma ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของ plasma cell ของหนูที่สร้าง antibody ชนิดเดียว เมื่อ fuse เซลล์เข้าด้วยกันเป็น Hybridoma cells ซึ่งจะสร้าง monoclonal antibody ซึ่งจำเพาะต่อ antigen ชนิดเดียวเท่านั้นและสร้างได้ตลอดไปไม่จำกัดตามคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งนั้น

3.3.1 ทางสีร์โรโลยีร่วมกับ tissue culture

ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว *C.trachomatis* หรือ TRIG* * agents ต่าง "share" group antigens, ผู้ที่มี chlamydial infection ย่อมมี antibody ต่อ group antigens ที่ไม่มี protection host จาก reinfection ส่วน type specific จะ detect ได้จาก sera ผู้ป่วยที่มี infected ด้วย agents กลุ่มนี้มาก่อนแล้ว

---

* **plasma** cell ของหนู.

* * TRIG agents คือ Trachoma and inclusion conjunctivitis agents.

ก. ใช้วิธี Immunofluorescence antibody (FA)[30-32]

ก. 1 ใช้ FA technique ร่วมกับ Mc Coy cells culture,

ทั้ง FA technique ก็ดีและ tissue cells culture method ก็ดี ต่างก็มีข้อเสียด้วยกันคือ

วิธี FA มีข้อเสียที่บุคลากรที่ดู fluorescent microscope นานๆ ตาจะพร่า (tiring) มากกว่าดูจาก smears ใน light microscope ธรรมดา ส่วนวิธี tissue cells culture ต้องใช้เวลานานหลายวัน ฉะนั้น การใช้ FA technique เพื่อหา chlamydial inclusion ใน tissue cultures โดยใช้ polyclonal antisera ซึ่งวิธี combination นี้ ใช้เวลาเพียง 16 ชั่วโมงก็อ่านผลได้[33]

การใช้ FA technique น่าจะใช้วินิจฉัยได้โดยตรง (directed method) โดยไม่ต้องพึ่ง tissue cells อย่างไรก็ดี วิธี direct FA นี้ยังไม่มีผู้ใดทดสอบดูเลย

ข. การใช้ monoclonal antibody* ที่ labellod ด้วย isothiocyanate :

Monoclonal antibody ร่วมกับสารเคมีดังกล่าวช่วยเพิ่ม sensitiveness ของการทำ tissue culture method ทำให้เห็น inclusion body ขัดขึ้นทั้ง elementary และ reticulate bodies วิธีนี้ทำได้ยากและค่าใช้จ่ายสูง

ค. ใช้ tissue cells culture method ร่วมกับ DNA-hybridization:-

ช่วยหา Chlamydiae ใน tissue cells culture ได้ผลดีพอใช้

3.3.2 การใช้ ELISA* * techniques เพื่อให้วินิจฉัยเร็วขึ้น : เนื่องจากมีผู้ใช้วิธี ELISA กับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคโกโนเรีย ได้ผลดี ฉะนั้น จึงมีผู้นำมาทดสอบเพื่อวินิจฉัย genital chlamydial infections วิธีนี้ยังอยู่ในขั้นทดสอบจึงยังไม่มีข้อมูลสรุปว่าใช้ได้ผลดีเพียงใด

ก. การใช้วิธี indirect "sandwitch principle" โดยใช้ monoclonal antibody มา coat glass beads (ลูกแก้ว) หรือ "coat" หลอดทดลองก่อน แล้วนำมา incubate กับ clinical sample ภายหลัง[34]

ถ้ามีจุลินทรีย์ chlamydia ใน clinical samples นั้น :

ก. 1 chlamydia จะมาจับกับลูกแก้วหรือ tubal surface, เมื่อ wash glass beads หรือ tubes แล้ว

ก. 2 นำไป incubated กับ rabit serum ที่มี sp.antibody ต่อ chlamydia (ทัยป์) นั้น

ก. 3 wash อีกทีเพื่อ removed antibody ที่มากเกินไปจนเหลือออก

ก. 4 นำ beads (หรือ tubes) มา incubated กับ enzyme labelled antibody ต่อทัยป์ของ (คือ rabbit) antibody ที่ใช้

ก. 5 wash อีกครั้ง แล้วนำไป incubate กับ enzyme substrate การอ่านผลอาศัย spectrophotometer ช่วย

ข. การใช้ Hybridoma technique[29]

เพื่อทำให้เกิด monoclonal antibodies ต่อ C.trachomatis มีประโยชน์ในการ classify ยีนัส species และ types-specific-classes reactivity (ตารางที่ 2)

---

* monochlonal antibodies ในปัจจุบันมีขายตามท้องตลาดแล้ว

* * ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay

Table 2 Comparison between the benefit and disadvantage of ELISA and MIF tests.*

Characteristics	ELISA test	MIF test
1. Ability to classify Ig class antibody	Fair	Good. Especially secretary fraction of Ig A antibody.
2. Amount of specific antigens for the specific tests.	Small amount	Large amount
3. Sensitivity of the tests in various body fluids, such as tear, nasopha--ryngeal fluid and genital secretion.	Difficult	Good
4. Procedure and method	Easy	Difficult and time consuming.

* by the authors.

Table 2 a Comparison of Complement Fixation and Microimmunofluorescence tests for Chlamydial antibodies in Human sera

Population tested	% Positive	
	CF*	MIF*
Screening Studies		
"Normal" Adults	3%	25-40%
Pediatric Sera	< 1%	10%
Males-Sexually Active	5-10%	15-25%
Females-Sexually Active	10-20%	50-70%
Prostitutes	30-60%	85%
VD Clinic	8%	60%
Proven Chlamydial Infection (Isolation)		
Lymphogranuloma Venereum	100	100
Adult Inclusion Conjunctivitis	50	100
Male-Urethritis	15	90
Female-Urethritis	40	99
* ⩾ 1 : 16		
* ⩾ 1 : 8		

From UROLOGY TIMES, Vol. 5, No. 5, May 1977 & Vol. 5, No. 6, June 1977.

Identify extracellular element ของ chlamydiae โดย labelled *C.trachomatis* ด้วย monoclonal antibody ทำให้มี reactive กับ outer membrane protein. เมื่อตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นสี bright yellow-green-pinpoints และมี back ground เป็นสี dull red (เพราะใช้ Evan's blue เป็น counter stain)

ฉะนั้น hybridoma technique ช่วย classify biotype ของ chlamydiae

Polyclonal antisera ได้ผลไม่ดี (unacceptable) เพราะ detection level ของ polyclonal antisera ต่ำจนทำให้เห็นแต่ large chlamydial inclusion ส่วน elementary bodies กลับไม่เห็นเลย

DNA hybridization มีประโยชน์

(ก) ช่วย detect chlamydiae ใน tissue cell culture ได้ดี

(ข) ช่วย detect chlamydiae ใน clinical sample โดยตรงได้ดีด้วย

3.3.3 Micro-immunofluorescence technique (MIF)[32-33]

วิธีนี้ใช้ได้ในบางกรณีที่มี deep sited infections เช่นโรคปีนิวโมเนีย perihepatitis, epididymitis

วิธีนี้ยากและเสียเวลา (labourous and time consuming) และมีผู้วิจารณ์กันมากว่าทำอย่างไรจึงจะใช้เวลาน้อยลง ฉะนั้น อาจทำร่วมกับ

ก. Antigens-cross reactivity pattern (pooling แอนติเจนส์ต่าง ๆ มารวมกัน)

ข. การดู product ทาง biological charactistic

ค. One broad reacting antigen (เช่น L 2)

ง. ELISA method.

จ. การใช้ Hela cells culture เลี้ยง L 2 organisms

ฉ. กับ L 2 แอนติเจนส์ใน Hela cell MIF test

วิธี MIF-test แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ยากก็ตาม นับว่าเป็นวิธีที่ sensitive มากกว่าวิธีอื่น ๆ (ตารางที่ 2 a)

อย่างไรก็ดี ที่ประชุมรับว่า การใช้วิธีทาง sero-tests ในการวินิจฉัย Chlamydial infection ยังไม่ก้าวหน้าเท่าที่ควร เพราะผู้ป่วยที่มีอาการแสดงของ genital infection มักจะมีแอนติ้บอดี้ย์ ที่เป็น anamnestic response ต่อการสัมผัส *C. trachomatis* มาไม่นานก่อนหน้านี้ทั้งนั้น

สำหรับในประเทศไทยนั้น, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาลและคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ได้ set lab. ทำ Mc. Coy cell culture สำหรับ routine culture ต่อจุลินทรีย์ *C.trachomatis* เรียบร้อยแล้ว

ส่วน central lab. ที่อื่น ๆ เข้าใจว่าคงกำลังทดสอบเพื่อเปิดเป็น routine lab. เช่นเดียวกัน

อนึ่ง เมื่อไม่นานมานี้ได้ทราบว่า คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมีโครงการวิจัยเพื่อศึกษาการระบาดของ *C.trachomatis* โดยวิธีสีร์โรโลยี. (A seroepidemiological study of *C.trachomatis* infection) โดยร่วมมือกับ Dr. Per-Anders Mardh. ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญขององค์การอนามัยโลก เรื่อง sexually transmitted diseases การศึกษาทางด้านสีร์โรโลยีอาจเจริญก้าวหน้ากว่าที่ควร ฉะนั้น หนองในเทียมในประเทศไทยยังเป็นปัญหาที่น่าศึกษาและติดตามต่อไป

เมื่อเร็ว ๆ นี้ Dr.Walter Stamm* แห่งมหาวิทยาลัย Washington Seattle ทดลองวิธีทำ microassay เพื่อหา titer ของ chlamydia infection ใน serum ได้ผลทาง laboratory diagnosis แม่นยำมาก วิธีการนี้อาจนำไปสู่ความก้าวหน้าในการวินิจฉัยโรคทางแล็บ ของโรค non specific urethritis ต่อไป

อ้างอิง

1. Bowie WR, Wang SP, Alexander ER, Floyd J, Forsyth PS. Etiology of nongonococcal urethritis; evidence for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum. J Clin Invest 1977 May ; 59 (5) : 735-742
2. Caldwell HD, Kuo CC. Purification of a Chlamydia trachomatis antigen by immunoadsorption with monospecific antibody. J Immunol 1977 Feb; 118 (2) : 437-440
3. Caldwell HD, Kuo CC. Serologic diagnosis of lymphogranuloma venereum by counterimmunoelectrophoresis with a chlamydia trachomatis protein antigen. J Immunol 1977 Feb; 118 (2) : 442-447
4. Christoffersen G, Manire GP. The toxicity of meningopneumonitis organisms (Chlamydia psittaci) at different stage of development. J Immunol 1969 Nov; 103 (5) : 1085-1087
5. Grayson JT, Wang SP. New knowledge of chlamydia and the diseases they cause. J Infect Dis 1975 Jul; 132 (1) : 87-90
6. Holmes KK. Etiology of nongonococcal urethritis. N Engl J Med 1975; 292 : 1199-1205
7. Jawetz E. Chemotherapy of chlamydia infection. Adv Pharmacol Chemother 1969; 7 : 253-256
8. Schachter J. Hanna L, Hill EC, Massad S, Sheppard CW. Are chlamydial infections the most prevalent venereal disease? JAMA 1975 Mar 24; 231 (12) : 1252-1256
9. Wang SP, Grayston JT, Kuo CC, Alexander ER, Holmes KK. Serodiagnosis of Chlamydia trachomatis infection with the Micro immunofluorescence test. In : Hobson D, Holmes KK, eds. Nongonococcal Urethritis and Related Infections. Washington : American Society for Microbiology, 1977. 237
10. Beem MO, Saxon EM. Chlamydia trachomatis infections of infants. In : Mordh PA, Holmes KK, Oriel JD, Piot P, Schachter J., eds. Amsterdam : Elservier Biomedical Press, 1982. 199
11. Mardh PA, Zeeberg B. Toxic effect of sampling swabs and transportation test tubes on the formation of intracytoplasmic inclusions of Chlamydia trachomatis in McCoy cell cultures. Br J Vener Dis 1981 Aug; 57 (4) : 268-270
12. Tang FF, Chang HL, Huang YT, Wang, KC. Studies on the etiology of trachoma with soecial reference to isolation of the virus chick embryo. Chin Med J 1957; 75: 492-432
13. Gordon FB, Quan AL. Isolation of

* Personal interview กับ Dr. L.J. Eron จาก Georgetown University Medical School, Fairfax, Virginia, U.S.A. ที่เมื่อครั้งมาบรรยายเรื่อง antibiotics 1983. ณ Hyatt Central Plaza Hotel 10 พ.ย. 2526.

trachoma agent in cell culture. Proc Soc Exp Biol Med 1965 Feb; 118 (2) : 354-357

14. Wentworth BB, Alexander ER. Isolation of Chlamydia trachomatis by use of 5 iodo 2 deoxyuridine treated cells. Appl Microbiol 1974; 27 : 912-914
15. Sompolinsky D, Richmond S. Growth of Chlamydia trachomatis in McCoy cells treated with cytohalasin B. Appl Microbiol 1974; 28: 912-916
16. Ripa KT, Mardh PA, Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximidetreated McCoy cells J Cill Microbiol 1977 Oct; 6 (4) : 328-331
17. Sisler HD, Siegel MR. Cycloheximide and other glutaramide antibiotics: In: Gottlieb D, Shaw PD. eds. Antibiotics, Vol I. New York : Springer Verlag, 1967. 283
18. Kuo CC, Wang SP, Wentworth BB, Grayston JT. Primary isolation of TRIC organism in Hela 229 cells treated with DEAE-dextran. J Infect Dis 1972 Jun; 125 (6) : 665-667
19. Evans RT, Taylor-Robinson D. Comparison of various McCoy cell treatment procedures used for detection or Chlamydia trachomatis. J Clin Microbiol 1979 Aug; 10 (2) : 198-201
20. La Scolea LJ Jr., Keddell JE. Efficacy of various cell culture procedures for detection of chlamydia of Chlamydia trachomatis and applicability to diagnosis of pediatric infection. J Clin Microbiol 1981 Apr; 13 (4) : 705-708
21. Ripa KT. Biological principles of the culture of Chlamydia trachomatis in cell monolayers. In : Mordh PA, Moller BR, Paavonen J, eds. Chlamydia Trachomatis in Genital and Related Infections. 1981. 25
22. Evans RT. Suppression of Chlamydia trachomatis inclusion formation by fetal calf serum in cycloheximide-treated McCoy cells. J Clin Microbiol 1980 Apr; 11 (4): 424
23. Reeve P, Owen J, Oriel JD. Laboratory procedures for the isolation of chlamydia trachomatis from the human genital tract. J Clin Pathol 1975 Nov; 28 (11) : 910-914
24. Rota TR, Nichols RL. Chlamydia trachomatis in cell culture, I Comparison of efficiencies of infection in several chemically defined media at various pH and temperature values and after exposure to diethylamino ethyl dextran. Appl Microbiol 1973; 26: 560-564
25. Thomas BJ, Evans RT, Hutchinson GR, Taylor-Robinson D. Early detection of chlamydial inclusion combining the use of cycloheximide-treated McCoy cells and immunofluorescence staining. J Clin Microbiol 1977 Sep; 6 (3) : 285-288
26. Stephens RS, Kuo CC, Tam Mr. Sensitivity of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of Chlamydia trachomatis inclusions in cell culture. J Clin Microbiol 1982 Jul; 16 (1): 4-7
27. Tam MR, Stephens RS, Kuo CC, Holmes KK, Stamm WE, Nowinski RC. Use of monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis as immunodiagnostic reagents. In : Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Piot P, Schachter J, eds. Chlamydia infections. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. 317
28. Kjos PA, Yu PKW, Washington JA, Ostgaard LK, Weed LA, Evaluation of an enzyme immunoassay (EIA) for detection of Neisseria gonorrhoeae. In : Abstract of 22 nd Interscience. Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. October 4-6 Miami, 1982. 147
29. Stephens RS, Kuo CC, Tam MR, Nowinski RC. Monoclonal antibodies

to Chlamydia trachomatis. In : Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Schachter J, eds. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. 329

30. Wang SP, Grayston JT. Micro immunofluorescence antibody response in Chlamydia trachomatis infection, a review. In : Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Schachter J, eds. Chlamydial Infections. Amsterdam : Elsevier Biomedical Press, 1982. 301
31. Treharne JD, Darougar S, Jones BR. Modification of the micro immunofluorescence test to provide a routine serodiagnostic test for chlamydia infection. J Clin Pathol 1977 Jun; 30 (6) : 510-514
32. Wang SP, Grayston JT, Kuo CC, Alexander ER, Holmes KK. Serodiagnosis of Chlamydia trachomatis infection with the micro immunofluorescence test. In: Hobson D, Holmes KK, eds. Nongonococcal Urethritis and Realted Infections. Washington : American Society for Microbiology, 1977. 237.
33. Saikku P, Paavonen J. Single antigen immunofluorescence test for chlamydial antibodies. J Clin Microbiol 1978 Jul ; 8 (1) : 119-122
34. Levy NJ, McCormack WM. Detection of serum antibody to chlamydia with ELISA. Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Piot P, Schachter J, eds. Chlanydial Infections. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. 1982. 341
35. Helin I, Mardh PA, Persson K. IgA antibody response to Chlamydia trachomatis in lactating women. In: Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Schachter J, eds. Chlamydial Infections. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. 333

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 15 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2527