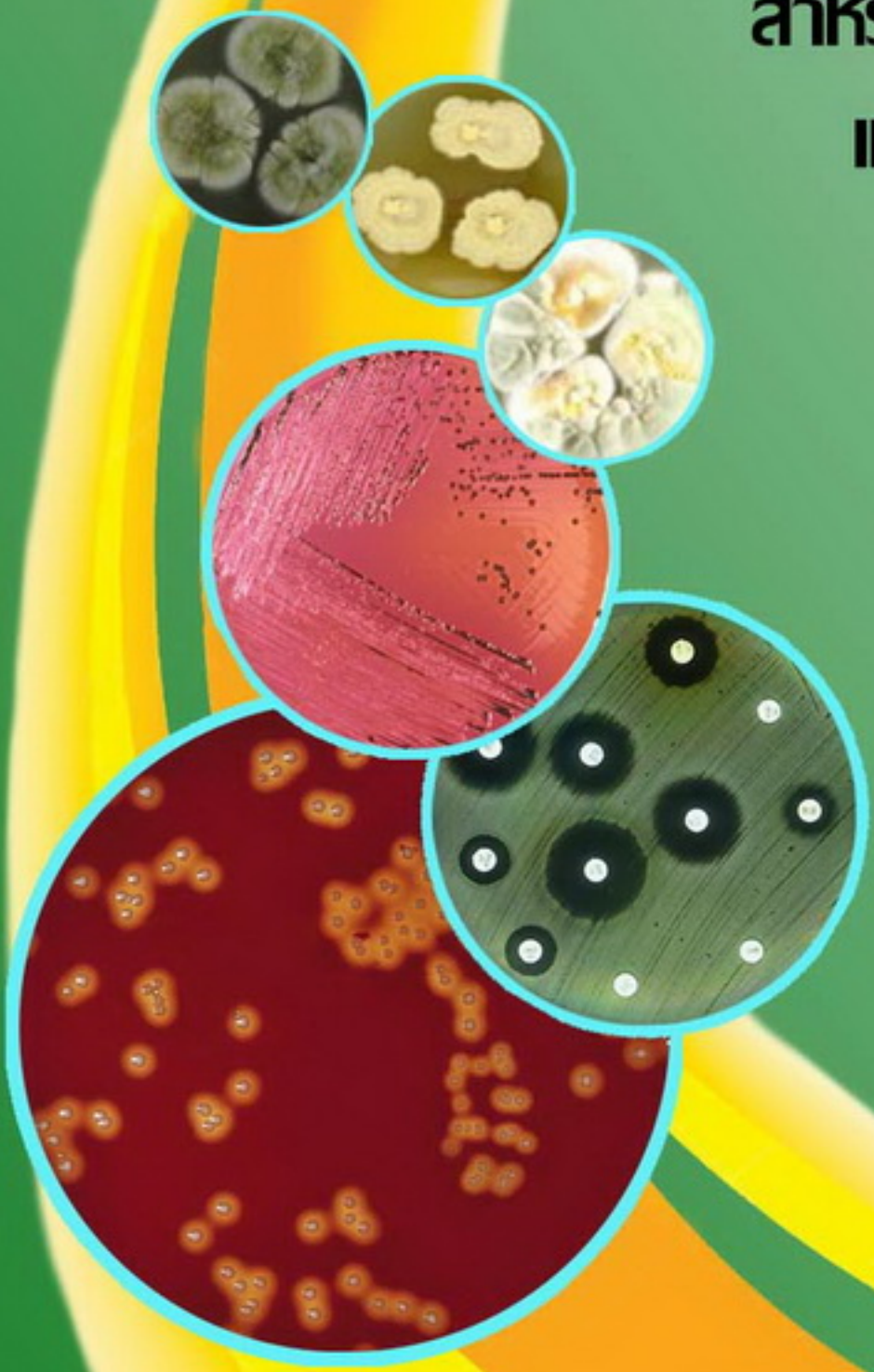
คู่มือการปฏิบัติงาน

แบคทีเรียและรา

สำหรับโรงพยาบาลศูนย์ และโรงพยาบาลทั่วไป



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

CDC
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

คู่มือ

การปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา

สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป

ศ.เกียรติคุณ ดร.มาลัย วรจิตร

ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร

ดร.สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์

นางสุรางค์ เดชศิริเลิศ

14-0992(000)new130158.indd 1 1/14/58 BE 10:26 AM

คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป

จัดทำโดย
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข

ที่ปรึกษา
นพ.อภิชัย มงคล
ศ.นพ.สมหวัง ด่านชัยวิจิตร
นพ.สมชาย แสงกิจพร

บรรณาธิการ
ศ.เกียรติคุณ ดร.มาลัย วรจิตร
ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร
ดร.สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
นางสุรางค์ เดชศิริเลิศ

สงวนสิขสิทธิ์ตามพระราชบัญญัติการพิมพ์
ห้ามมิให้ทำซ้ำ ทำสำเนา หรือลอกเลียนแบบโดยมิได้รับอนุญาต

พิมพ์ครั้งที่ 1 ธันวาคม 2557
จำนวน 2,000 เล่ม

ISBN 978-616-11-2370-3

ออกแบบปกโดย เอกวัฒน์ อุณหเลขกะ และ สุรางค์ เดชศิริเลิศ
รูปและภาพประกอบในเล่มโดย ผู้นิพนธ์

พิมพ์ที่
บริษัท ธนาเพรส จำกัด
เลขที่ 9 ซอยลาดพร้าว 64 แยก 14
แขวงวังทองหลาง เขตวังทองหลาง กรุงเทพฯ 10310
โทรศัพท์ 0 2530 4114
โทรสาร 0 2108 8950, 0 2108 8951

ผู้นิพนธ์

ผศ.นพ.กำธร มาลาธรรม
ประธานคณะกรรมการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อในโรงพยาบาล
รองผู้อำนวยการโรงพยาบาลรามาธิบดี
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
kmalathum@hotmail.com

นางสาวฉันทนา อรัญญะ
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ
โรงพยาบาลพระนั่งเกล้า
abi.kung@hotmail.com

ดร.ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านเชื้อราและพาราสิตวิทยา
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
natteewan.p@dmsc.mail.go.th

นางสาวนิตยา ธีระวัฒนกุล
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์
nidteeraw@gmail.com

นายบุญช่วย เอี่ยมโภคลาภ
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สถาบันบำราศนราดูร
boon.eam@gmail.com

นางปทุมพิศ วิมลวัตรเวที
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านสอบเทียบการวิเคราะห์
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
partoompit.w@dmsc.mail.go.th

14-0992(000)new130158.indd 3 1/14/58 BE 10:26 AM

ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
piyada.w@dmsc.mail.go.th

นางเพ็ญแข รัตนพิริยกุล
เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญงาน
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
penkhare.r@dmsc.mail.go.th

ศ.เกียรติคุณ ดร.มาลัย วรจิตร
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งศาสตราจารย์
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ.ดร.วรดา สโมสรสุข
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
sworada@hotmail.com

นางวรรณา เพ่งเรืองโรจนชัย
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
โรงพยาบาลราชบุรี
clinpath1251@hotmail.com

ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
wantana.p@dmsc.mail.go.th

นางสาววิภา ตรีรัตน์วีรพงษ์
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี
vipasoiy@hotmail.com

14-0992(000)new130158.indd 4 1/14/58 BE 10:26 AM

นายสมชัย หลกภิชาติ
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สำนักโรคเอดส์ กรมควบคุมโรค
lokpichat@yahoo.com

นายสมศักดิ์ ราหุล
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
โรงพยาบาลราชวิถี
somsakr@yahoo.com

นายสมศักดิ์ เหรียญทอง
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค
dhanida2547@yahoo.com

ศ.เกียรติคุณ พญ.สยมพร ศิรินาวิน
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งศาสตราจารย์
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
rassr@mahidol.ac.th

นางสุจิตรา มานะกุล
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี
sujitra2008@gmail.com

พ.อ.หญิง ผศ.สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร
อาจารย์วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า/ผู้ช่วยศาสตราจารย์
กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า
tanmicro@gmail.com

14-0992(000)new130158.indd 5 1/14/58 BE 10:26 AM

นางสุรางค์ เดชศิริเลิศ
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ผู้ทรงคุณวุฒิด้านชีววิทยา
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
surang_dej@yahoo.com

ดร.สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
อาจารย์ประจำมหาวิทยาลัยรังสิต
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
suwanna.tra@mahidol.ac.th; suwanna.tra@rsu.ac.th

นางหัทยา ธัญจรูญ
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
โรงพยาบาลตากสิน
blacky_magic@hotmail.com

นายอนุชาติ จ๋อมแปง
นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ
สำนักโรคเอดส์ กรมควบคุมโรค
anuchart_jom@hotmail.com

ดร.อนุศักดิ์ เกิดสิน
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
noksak99@gmail.com

14-0992(000)new130158.indd 6 1/14/58 BE 10:26 AM

คำนิยม

ประเทศไทยจะเข้าสู่วาระประชาคมเศรษฐกิจอาเซียนอย่างเป็นรูปธรรม สำหรับภาคสาธารณสุขนั้นอาจเป็นภาวการณ์ที่โรคติดเชื้อและเชื้อก่อโรคที่สำคัญแพร่เข้าสู่ประเทศได้ง่ายขึ้น ดังนั้นบทบาทของห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญมาก กล่าวคือต้องมีความพร้อมในการรองรับโรคระบาด และเป็นกำลังสำคัญในการเป็นเครือข่ายของระบบเฝ้าระวังโรคของประเทศ การจัดทำหนังสือคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป จึงนับเป็นเรื่องที่น่าสนับสนุนและส่งเสริมอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นการปรับปรุงคู่มือวิธีปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาให้ทันต่อยุคสมัย และสอดคล้องกับแผนพัฒนาระบบและสมรรถนะของห้องปฏิบัติการทุกระดับทั้งในและนอกกระทรวงสาธารณสุขที่จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หนังสือเล่มนี้มีความครอบคลุมตั้งแต่วิธีการเก็บตัวอย่าง วิธีทดสอบ การควบคุมคุณภาพ รวมทั้งความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของกฎอนามัยระหว่างประเทศ พ.ศ. 2548 (International Health Regulations 2005) จึงนับเป็นประโยชน์ต่อบุคลากรสาธารณสุขเป็นอย่างยิ่ง

ขอชื่นชมความตั้งใจและความอุตสาหะของคณะผู้จัดทำคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป และคาดหวังว่าหนังสือเล่มนี้จะได้รับการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล สมเจตนารมณ์ของคณะผู้จัดทำทุกประการ

(นายอภิชัย มงคล)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

14-0992(000)new130158.indd 7 1/14/58 BE 10:26 AM

Preface

The Division of Global Health Protection at the Thai Ministry of Public Health-US CDC Collaboration is proud to partner with the Department of Medical Sciences in the publication and distribution of this laboratory manual for bacteriology. Microbiology laboratories at regional and general hospitals are essential resources for detecting emerging and re-emerging infectious diseases, as well as long-standing threats to public health. In this age of increasing antimicrobial resistance and rapid disease spread across borders, the need for optimal procedures for specimen collection, transportation, testing and reporting are more important than ever. The guidelines in this manual, which reflect both many years of practical experience and the most current scientific knowledge, can help hospital laboratories throughout Thailand provide the best microbiological services possible. Prompt and accurate identification of bacteria and fungi and determination of antimicrobial susceptibility are essential not only for optimal clinical care, but are the cornerstone of public health surveillance for serious invasive diseases. The US CDC is gratified to share a long partnership with the Thailand Ministry of Public Health on laboratory-based surveillance for invasive and vaccine-preventable bacterial infections. The guidance provided in this manual on quality assurance and biosafety techniques will further strengthen the capacity of microbiological laboratories throughout Thailand to safely, rapidly and confidently diagnose serious diseases. High quality laboratory diagnosis is the key to detecting, preventing and controlling disease including outbreaks of potentially vaccine-preventable diseases. We congratulate the editors and authors of this manual for providing a resource that will be valuable for many years in protecting the health of the Thai people.

John R. MacArthur, MD, MPH

Director, Thailand MOPH - US CDC Collaboration

14-0992(000)new130158.indd 8 1/14/58 BE 10:26 AM

คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและเชื้อราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปที่จัดทำนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานย้อมสี เพาะ แยก และวินิจฉัยแบคทีเรียและเชื้อราจากสิ่งตรวจผู้ป่วย และการทดสอบความไวของแบคทีเรียก่อโรคต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย โดยเน้นวิธีดำเนินงานเป็นหลักเพื่อให้ห้องปฏิบัติการทั่วประเทศมีแนวทางการทำงานที่มีมาตรฐาน เป็นไปในทิศทางเดียวกันและคงเส้นคงวา นอกจากนี้ยังกล่าวถึงหลักการของการทดสอบต่างๆซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจและทำให้ปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เนื้อหาในคู่มือนี้ครอบคลุมทุกขั้นตอนของการปฏิบัติงานตั้งแต่การเลือกเก็บและนำส่งสิ่งตรวจซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลการทดสอบที่ได้ การดำเนินการตรวจวิเคราะห์และการวินิจฉัยชนิดของเชื้อก่อโรคจากสิ่งตรวจต่างๆ การทดสอบความไวของแบคทีเรียก่อโรคกับสารต้านจุลชีพ การทวนสอบผลที่ได้ก่อนรายงานผล การรายงานผล การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการ ความปลอดภัยในการปฏิบัติงานของบุคลากรและสิ่งแวดล้อม ผู้เขียนทุกคนมีความตั้งใจในการจัดทำคู่มือนี้โดยรวบรวมความรู้จากตำราต่างๆ และประสบการณ์จากการทำงานมาไว้ในแต่ละบท และพยายามเขียนให้กระชับเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ จึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ปฏิบัติงานแบคทีเรียและเชื้อราในโรงพยาบาลทั่วประเทศไทย

มาลัย วรจิตร

14-0992(000)new130158.indd 9 1/14/58 BE 10:26 AM

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	การป้องกันการติดเชื้อจากการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ	1
บทที่ 2	การเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา	13
บทที่ 3	การวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากสิ่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์	43
บทที่ 4	ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ	
	4.1 การเพาะเชื้อจากเลือด	63
	4.2 การเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังและน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกาย	73
	4.3 การเพาะเชื้อจากปัสสาวะ	80
	4.4 การเพาะเชื้อจากอุจจาระ/rectal swab	86
	4.5 การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินหายใจ	94
	4.6 การเพาะเชื้อจากระบบสืบพันธุ์	103
	4.7 การเพาะเชื้อจากหนอง แผล ฝี ต่างๆ	108
บทที่ 5	การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย	
	5.1 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียชนิด Gram-Positive Cocci	117
	5.2 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียชนิด Gram-Positive Bacilli	132
	5.3 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียชนิด Gram-Negative Cocci	136
	5.4 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย Family *Enterobacteriaceae*	139
	5.5 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย Family *Vibrionaceae*	159
	5.6 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Glucose Nonfermentative Gram-Negative Bacilli	164
	5.7 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Higher Bacteria	191
	5.8 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Miscellaneous Gram-Negative Bacteria	196
	5.9 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Anaerobic Bacteria	205
	5.10 การวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ	217
	5.11 การวินิจฉัยเชื้อราที่พบบ่อย	229
บทที่ 6	การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ	239
บทที่ 7	การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย	291
บทที่ 8	การทวนสอบผล	313
บทที่ 9	บทบาทของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในด้านการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล	327
บทที่ 10	การติดเชื้อแบคทีเรียในชุมชน: บทบาทของหน่วยงานการปฏิบัติการด้านแบคทีเรีย	331
ภาคผนวก		335

14-0992(000)new130158.indd 10 1/14/58 BE 10:26 AM

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
ภาพที่ 1-1	แสดงตัวอย่างห้องปฏิบัติการระดับต่างๆ	3
ภาพที่ 3-1	การย้อมสี acid-fast ในการตรวจหามัยโคแบคทีเรีย	44
ภาพที่ 3-2	เครื่อง cytospin slide centrifuge	47
ภาพที่ 3-3	ลักษณะการติดสีและการเรียงตัวของเชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพการย้อมแกรม	51
ภาพที่ 4.3-1	วิธีการเพาะปัสสาวะบน BA	81
ภาพที่ 5.9-1	Rubber-stoppered collection vial containing an agar indicator system	206
ภาพที่ 5.9.2	Anaerobic transport system สำหรับสิ่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อ	207
ภาพที่ 5.9-3	Anaerobic transport system สำหรับตัวอย่าง swab	207
ภาพที่ 6-1	ตัวอย่างการทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution	271
ภาพที่ 6-2	ลักษณะของ D-test	287
ภาพที่ 6-3	Epsilometer test (E-test)	288

14-0992(000)new130158.indd 11 1/14/58 BE 10:26 AM

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
ตารางที่ 1-1	ความสัมพันธ์ระหว่าง risk groups, ระดับชีวนิรภัย, การปฏิบัติ และอุปกรณ์ต่างๆ	4
ตารางที่ 1-2	ลำดับความทนของจุลชีพต่อสารทำลายจุลชีพแต่ละชนิดเรียงจากมากไปหาน้อย และระดับของการทำลายเชื้อหรือน้ำยาทำลายเชื้อ	8
ตารางที่ 1-3	การจำแนกขยะและวิธีการกำจัดขยะ	10
ตารางที่ 2-1	การเก็บสิ่งตรวจจากระบบต่างๆในร่างกาย การนำส่งและการเก็บรักษา	17
ตารางที่ 2-2	สิ่งตรวจที่ควรเก็บและสิ่งตรวจที่ไม่ควรเก็บสำหรับการเพาะเชื้อ	18
ตารางที่ 2-3	การเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อ aerobic bacteria	20-37
ตารางที่ 2-4	การเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา	38-40
ตารางที่ 3-1	ลักษณะของเชื้อที่พบในสิ่งตรวจต่างๆและการรายงานผล	
	ก. แบคทีเรียแกรมบวกที่พบในสิ่งตรวจผู้ป่วย	52-55
	ข. แบคทีเรียแกรมลบที่พบในสิ่งตรวจผู้ป่วย	55-57
	ค. จุลชีพอื่นๆที่ตรวจได้จากการทำ direct smears สิ่งตรวจผู้ป่วย	57-58
ตารางที่ 4.1-1	แสดงแบคทีเรียที่แยกได้จากเลือดและโอกาสของการปนเปื้อน (false positive) หรือโอกาสของการก่อโรค (true positive)	69
ตารางที่ 4.3-1	การคำนวณจำนวนโคโลนีที่นับได้เมื่อใช้ loop เทียบมาตรฐาน 0.001 ml	81
ตารางที่ 4.3-2	การคำนวณจำนวนโคโลนีที่นับได้เมื่อใช้ Bacteruristrip	82
ตารางที่ 4.3-3	เกณฑ์พิจารณานำเชื้อไปแยกวินิจฉัยชนิดและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จากปัสสาวะ	84
ตารางที่ 4.4-1	เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกี่ยวข้อง	89
ตารางที่ 4.6-1	การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในระบบสืบพันธุ์	106
ตารางที่ 4.7-1	การแปลผลการย้อมแกรมเชิงปริมาณสำหรับตัวอย่างที่ไม่ใช่เสมหะ ไม่ใช่ตัวอย่างป้ายช่องคลอดที่ใช้วินิจฉัยช่องคลอดอักเสบ และไม่ใช่ตัวอย่าง น้ำคัดหลั่งที่ผ่านการปั่น	109
ตารางที่ 4.7-2	การแปลผลการย้อมแกรมเชิงปริมาณสำหรับการตรวจสิ่งตรวจหนองโดยตรง (direct examination) โดยการประเมินผลร่วมของปริมาณ neutrophil และ squamous cell เพื่อตรวจสอบคุณภาพสิ่งตรวจ	110
ตารางที่ 4.7-3	อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจากหนองจากแผลลึกและฝีปิด	111

14-0992(000)new130158.indd 12 1/14/58 BE 10:26 AM

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 4.7-4	อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจากหนองจากแผลเปิด ฝีเปิด และฝื่น	112
ตารางที่ 4.7-5	อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจาก conjunctival swab	113
ตารางที่ 4.7-6	อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจาก ear swab	114
ตารางที่ 5.1-1	การวินิจฉัยเชื้อ gram-positive cocci, catalase บวก ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ สีขาวหรือเหลือง ที่พบบ่อย	119
ตารางที่ 5.1-2	ปฏิกิริยาที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* group ต่างๆ	120
ตารางที่ 5.1-3	การวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* กลุ่ม pyogenic ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี	122
ตารางที่ 5.1-4	การวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* กลุ่ม non-pyogenic ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี	123
ตารางที่ 5.1-5	การวินิจฉัยเชื้อในกลุ่มของ *S. bovis* group ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี	124
ตารางที่ 5.1-6	การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย gram-positive cocci, catalase negative, PYR positive ที่ไม่ใช่ *Streptococcus* group A	126
ตารางที่ 5.1-7	การวินิจฉัยเชื้อ gram-positive cocci (excluding *Streptococcus pyogenes*), catalase negative or weakly positive, PYR positive	129
ตารางที่ 5.1-8	การวินิจฉัยเชื้อ gram-positive cocci, catalase negative and PYR negative	130
ตารางที่ 5.2-1	การวินิจฉัย aerobic non spore forming gram positive-bacilli ที่สำคัญ	133
ตารางที่ 5.2-2	การแยกชนิดของ *Corynebacterium*	133
ตารางที่ 5.2-3	การแยกเชื้อ *Bacillus cereus* group	134
ตารางที่ 5.3-1	Differentiation of *Neisseria* spp. and *M. catarrhalis*	138
ตารางที่ 5.4-1	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(+)	141
ตารางที่ 5.4-2	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(+)	142
ตารางที่ 5.4-3	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-)	144
ตารางที่ 5.4-4	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-), motility 25°C(-), DNase 25°C(-), red pigment(-), ODC(-)	146
ตารางที่ 5.4-5	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 2 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S+	148
ตารางที่ 5.4-6	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(+)	149
ตารางที่ 5.4-7	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(+), LDC(-), ODC(+)	150
ตารางที่ 5.4-8	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-), ODC(-)	152
ตารางที่ 5.4-9	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(+)	154

14-0992(000)new130158.indd 13 1/14/58 BE 10:26 AM

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 5.4-10 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 4 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S+ 156

ตารางที่ 5.5-1 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อ *Vibrio* และ *Plesiomonas* 162

ตารางที่ 5.5-2 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อ *Aeromonas* 163

ตารางที่ 5.6-1 การจำแนกชนิดเชื้อตามการอ่านผล oxidase, motility และ OF (glucose) 175

ตารางที่ 5.6-2 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose บวก, peritrichous flagella 175

ตารางที่ 5.6-3 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose บวก, polar flagella 176

ตารางที่ 5.6-4 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose ลบ, peritrichous flagella 177

ตารางที่ 5.6-5 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose ลบ, polar flagella 177

ตารางที่ 5.6-6 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose บวก, indole บวก 178

ตารางที่ 5.6-7 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose บวก, indole ลบ 178

ตารางที่ 5.6-8 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose ลบ, indole บวก 179

ตารางที่ 5.6-9 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose ลบ, indole ลบ 179

ตารางที่ 5.6-10 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase ลบ, motility บวก, OF glucose บวก 180

ตารางที่ 5.6-11 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase ลบ, motility ลบ, OF glucose บวก/ลบ 181

ตารางที่ 5.6-12 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก/ลบ, motility บวก, OF glucose บวก/ลบ, pink pigmented nonfermentater 182

ตารางที่ 5.6-13 Nomenclature of glucose nonfermentative gram-negative bacilli 183-188

ตารางที่ 5.7-1 ลักษณะของ grains หรือ granules ของเชื้อก่อโรค actinomycotic mycetoma 193

ตารางที่ 5.7-2 Morphologic characteristics of aerobic actinomycetes 193-194

ตารางที่ 5.8-1 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกลุ่ม miscellaneous gram-negative และแบคทีเรียอื่นที่ใกล้เคียง 199

ตารางที่ 5.8-2 การแยกพิสูจน์เชื้อ *Campylobacter* spp. 202-203

ตารางที่ 5.9-1 การอ่านผล anaerobic bacteria 214-216

ตารางที่ 5.10-1 แสดงวิธีรายงานผลการตรวจสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ grading วิธี Ziehl-Neelsen 220

ตารางที่ 5.10-2 แสดงวิธีรายงานผลการตรวจสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ grading วิธี Fluorescent acid-fast staining ด้วย objective lens x20 221

ตารางที่ 5.10-3 ลักษณะต่างๆที่ใช้สำหรับแยกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ (NTM) 225

ตารางที่ 5.10-4 วิธีเตรียมอาหารไข่ทั้งชนิด Lowenstein Jensen (LJ) และ 2% Ogawa medium 227

14-0992(000)new130158.indd 14 1/14/58 BE 10:26 AM

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 5.11-1	สีโคโลนีของ *Candida* species บน CHROMagar *Candida*	231
ตารางที่ 6-1	การเลือกสารต้านจุลชีพที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด	241-244
ตารางที่ 6-2	สรุปย่อการทดสอบความไวของเชื้อชนิดเจริญไวต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี Disk diffusion test	250
ตารางที่ 6-3	สรุปย่อการทดสอบความไวของเชื้อ fastidious แบคทีเรีย ต่อสารต้านจุลชีพ โดยวิธี Disk diffusion test	251-252
ตารางที่ 6-4	เชื้อที่ทดสอบและเชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ โดยวิธี Disk diffusion test (M100-S23)	253
ตารางที่ 6-5	เชื้อที่ทดสอบและเชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ (M45-A2)	254-255
ตารางที่ 6-6	คุณลักษณะของเชื้อมาตรฐานสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ	256-258
ตารางที่ 6-7	รายการตรวจคัดกรองการดื้อยาตามชนิดการดื้อยาที่แสดงออก (phenotype) หรือตามกลไกการดื้อยา	263-264
ตารางที่ 6-8	แสดงการหาค่า MIC ของเชื้อโดยวิธี Agar dilution	268
ตารางที่ 6-9	ตัวอย่างแสดงการเตรียม working solution	270
ตารางที่ 6-10	แสดงเชื้อแบคทีเรียที่ควรทดสอบความไวด้วยวิธี Broth microdilution	272-274
ตารางที่ 6-11	ตาราง inhibition zone ของเชื้อในการทดสอบ ESBL	276
ตารางที่ 6-12	β-lactamases และ carbapenemase activity	278
ตารางที่ 7-1	เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ	294-304
ตารางที่ 7-2	อายุการใช้งานของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว	305
ตารางที่ 7-3	เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพของสีและน้ำยาต่างๆ	306-307
ตารางที่ 7-4	การบำรุงรักษาอุปกรณ์เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ	310-311
ตารางที่ 8-1	Intrinsic resistance ของ *Enterobacteriaceae*	315
ตารางที่ 8-2	การดื้อสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ (intrinsic resistance)	318
ตารางที่ 8-3	การดื้อสารต้านจุลชีพที่เป็นไปไม่ได้	319
ตารางที่ 8-4	ตัวอย่างการดื้อสารต้านจุลชีพที่พบได้น้อย	319

14-0992(000)new130158.indd 15 1/14/58 BE 10:26 AM

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิ		หน้า
แผนภูมิที่ 4.2-1	ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยน้ำไขสันหลังและน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกาย	78
แผนภูมิที่ 4.4-1	ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัย เชื้อจากอุจจาระ/rectal swab	92
แผนภูมิที่ 4.5-1	ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก throat swab และ nasopharyngeal swab	96
แผนภูมิที่ 4.5-2	ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก sinus aspirate, tracheal suction, nasopharyngeal suction	97
แผนภูมิที่ 4.5-3	ขั้นตอนการเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก sputum และ bronchial wash	99
แผนภูมิที่ 4.5-4	ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก lung biopsy และ lung aspirate	101
แผนภูมิที่ 4.6-1	ขั้นตอนการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในระบบสืบพันธุ์	105
แผนภูมิที่ 4.7-1	ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากหนองต่างๆ	115
แผนภูมิที่ 5.2-1	ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัย *Bacillus*	135
แผนภูมิที่ 5.3-1	ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ gram-negative cocci	137
แผนภูมิที่ 5.4-1	เชื้อที่สงสัย family *Enterobacteriaceae*	139
แผนภูมิที่ 5.4-2	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(+)	141
แผนภูมิที่ 5.4-3	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(+)	143
แผนภูมิที่ 5.4-4	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-)	145
แผนภูมิที่ 5.4-5	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-), motility 25°C(-), DNase 25°C(-), red pigment(-), ODC(-)	147
แผนภูมิที่ 5.4-6	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 2 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S+	148
แผนภูมิที่ 5.4-7	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(+)	149
แผนภูมิที่ 5.4-8	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-), ODC(+)	151
แผนภูมิที่ 5.4-9	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(-), ODC(-)	153
แผนภูมิที่ 5.4-10	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA(-), LDC(+)	155
แผนภูมิที่ 5.4-11	การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 4 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S+	157
แผนภูมิที่ 5.6-1	ขั้นตอนการวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม nonfermentative gram-negative bacilli เบื้องต้น	174
แผนภูมิที่ 5.9-1	วิธีดำเนินการตรวจวินิจฉัย anaerobic bacteria เบื้องต้น	209
แผนภูมิที่ 5.9-2	แสดงการแบ่งกลุ่มของ anaerobic bacteria	211

14-0992(000)new130158.indd 16 1/14/58 BE 10:26 AM

คำย่อ

A/A	TSI ให้ลักษณะ slant สีเหลือง/butt สีเหลือง
A/AG, H_2S-	TSI ให้ลักษณะ slant สีเหลือง/butt สีเหลือง มีการสร้างแก๊ส แต่ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์
A/AG, H_2S+	TSI ให้ลักษณะ slant สีเหลือง/butt สีเหลือง มีการสร้างแก๊ส และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์
A/K	TSI ให้ลักษณะ slant สีเหลือง/butt สีแดง
Ana BA	Anaerobic blood agar
APW	Alkaline peptone water
BA	Blood agar
BBE	Bacteroides bile esculin agar
BG	Bordet Gengou medium
BPW	Buffer peptone water
BSC	Biological safety cabinet
BHI	Brain heart infusion
BSC	Biological safety cabinet
CA	Chocolate agar
CAMHB	Cation-adjusted Mueller Hinton broth
CAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CFU	Colony forming unit
CSF	Cerebrospinal fluid
CTBA	Cystine tellurite blood agar
cumm	cubic millimeter
DMST	Department of Medical Sciences Thailand
EMB	Eosin-methylene blue agar
EY	Egg-yolk agar
FTM	Fluid thioglycollate medium
GLC	Gas Liquid Chromatography
GN broth	Gram-negative broth
H.N.	Hospital number
K/A	TSI ให้ลักษณะ slant สีแดง/butt สีเหลือง
K/AG, H_2S-	TSI ให้ลักษณะ slant สีแดง/butt สีเหลือง มีการสร้างแก๊ส แต่ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์
K/AG, H_2S+	TSI ให้ลักษณะ slant สีแดง/butt สีเหลือง มีการสร้างแก๊ส และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

14-0992(000)new130158.indd 17 1/14/58 BE 10:26 AM

K/K	TSI ให้ลักษณะ slant สีแดง/butt สีแดง
K/N	TSI ให้ลักษณะ slant สีแดง/butt ไม่เปลี่ยนสี
LDC	Lysine decarboxylase
LDA	Lysine deaminase
LPF	Low power (microscopic) field
MAC	MacConkey agar
MHA	Mueller-Hinton agar
MR-VP	Methyl red & Voges-Proskauer
MSRV	Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium
MTM	Modified Thayer-Martin agar
NA	Nutrient agar
NF	Nonfermentative gram-negative bacilli
ODC	Ornithine decarboxylase
OF medium	Oxidation-fermentation medium
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside
PDA	Phenylalanine deaminase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Polymorphonuclear cells
PYR	Pyrrolidonyl arylamidase
RPM	Revolutions per minute
SDA	Sabouraud dextrose agar
SEPC	Squamous epithelial cells
SIM	Sulfur-indole-motility medium
SS	*Salmonella Shigella* agar
TCBS	Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
TSI	Triple sugar iron agar
UV	Ultraviolet light
VP	Voges-Proskauer
XLD	Xylose lysine deoxycholate agar

14-0992(000)new130158.indd 18 1/14/58 BE 10:26 AM

บทที่ 1
การป้องกันการติดเชื้อจากการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
บุญช่วย เอี่ยมโภคลาภ

หลักการป้องกันการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ อาจเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนของการปฏิบัติงาน ตั้งแต่การเก็บสิ่งตรวจจนถึงขั้นตอนการทำลายขยะติดเชื้อ ผู้ปฏิบัติงานจะต้องมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการแพร่กระจายเชื้อและวิธีปฏิบัติงานที่เหมาะสม ควรได้รับการฝึกอบรมด้านความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน บุคลากรทุกคนต้องตระหนักถึงความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน ต้องปฏิบัติตามมาตรฐานการปฏิบัติงานและมาตรฐานความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด โดยเฉพาะในการปฏิบัติงานกับเชื้อหรือสิ่งตรวจที่มีหรืออาจมีเชื้อ หน่วยงานต้องจัดสถานที่และจัดหาวัสดุอุปกรณ์ที่เหมาะสม ห้องปฏิบัติการจะต้องสะอาดและเป็นระเบียบอยู่เสมอ ควรแยกส่วนการปฏิบัติงานที่ติดเชื้อออกจากส่วนที่ไม่ติดเชื้อ ควรมีอ่างล้างมือและวัสดุเช็ดมือที่เหมาะสมให้พอเพียง ขยะติดเชื้อต้องใส่ถุงขยะสีแดงที่มีการบ่งชี้อย่างชัดเจนว่าเป็นขยะติดเชื้อและใส่ในถังขยะที่มีฝาปิดมิดชิด

ควรกำหนดมาตรฐานและวิธีการปฏิบัติงาน รวมทั้งฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ (โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ใหม่ หรือผู้มาฝึกปฏิบัติงาน) ให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง มีทักษะและความชำนาญในการปฏิบัติงาน สามารถปฏิบัติงานด้วยความปลอดภัย มีคู่มือเกี่ยวกับเรื่องต่างๆที่สำคัญ เช่น การแต่งกายและการใช้อุปกรณ์ที่ถูกต้องในการปฏิบัติงานเพื่อป้องกันอันตรายประเภทต่างๆ ข้อปฏิบัติที่ถูกต้องและข้อควรระวังในการทำงาน การป้องกันและแก้ไขเมื่อเกิดอุบัติเหตุ การจัดการกับสิ่งตรวจที่หกหรือกระเด็นเปื้อนบริเวณต่างๆ รวมถึงการใช้และบำรุงรักษาอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ เป็นต้น

ควรจัดหาอุปกรณ์ที่จำเป็นในการปฏิบัติงานให้พอเพียงกับความต้องการ บุคลากรทุกระดับควรทราบถึงวิธีการใช้อุปกรณ์ป้องกันต่างๆอย่างถูกต้องเหมาะสมกับลักษณะงานที่ปฏิบัติ ควรเตรียมเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆให้พร้อมและครบถ้วนก่อนปฏิบัติงาน ควรสวมเสื้อคลุมทุกครั้งขณะปฏิบัติงาน และสวมถุงมือเมื่อปฏิบัติงานที่ต้องสัมผัสกับเชื้อหรือสิ่งตรวจที่อาจมีเชื้ออันตราย กรณีที่อาจมีการกระเด็นของสิ่งตรวจควรสวมแว่นตา และผ้าปิดปาก-จมูก ตามความเหมาะสม

การแบ่งห้องปฏิบัติการตามระดับการติดเชื้อ

องค์การอนามัยโลกได้กำหนดการจัดกลุ่มเชื้อก่อโรคตามกลุ่มของความเสี่ยง (risk group) ต่างๆดังนี้

Risk Group 1 เชื้อที่ไม่ทำให้เกิดอันตรายหรือเกิดอันตรายแต่ไม่รุนแรงต่อคนและชุมชน (no or low individual and community risk) เช่น แบคทีเรียที่ไม่มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคในคนหรือสัตว์

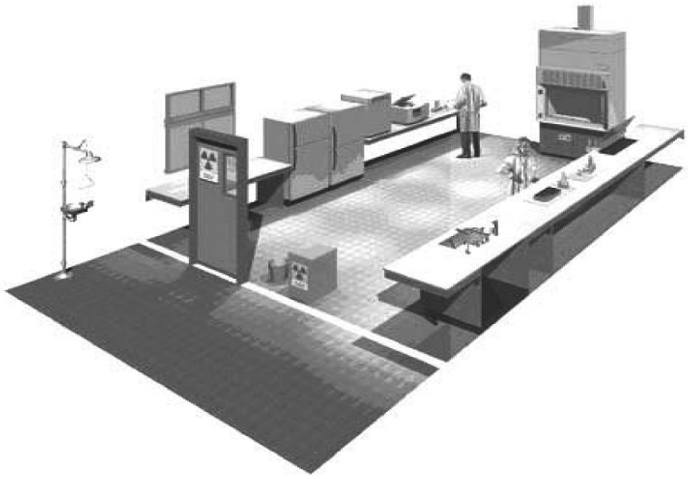
Risk Group 2 เชื้อที่ทำให้เกิดอันตรายปานกลางต่อคน แต่เกิดอันตรายที่ไม่รุนแรงต่อชุมชน (moderate individual risk, low community risk) เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ แต่ไม่เกิดอันตรายรุนแรงต่อบุคลากรทางห้องปฏิบัติการ, ชุมชน, สัตว์ทดลอง หรือสิ่งแวดล้อม บุคลากรผู้ที่ได้รับเชื้ออาจเกิดการติดเชื้อรุนแรง แต่มีการรักษาและการป้องกันที่มีประสิทธิภาพ และความเสี่ยงในการแพร่กระจายเชื้อต่ำ

Risk Group 3 เชื้อที่ทำให้เกิดอันตรายสูงต่อคน แต่เกิดอันตรายที่ไม่รุนแรงต่อชุมชน (high individual risk, low community risk) เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่ร้ายแรงในคนหรือสัตว์ แต่โดยทั่วไปจะไม่แพร่กระจายไปยังบุคคลอื่น และมีการรักษาและการป้องกันที่มีประสิทธิภาพ

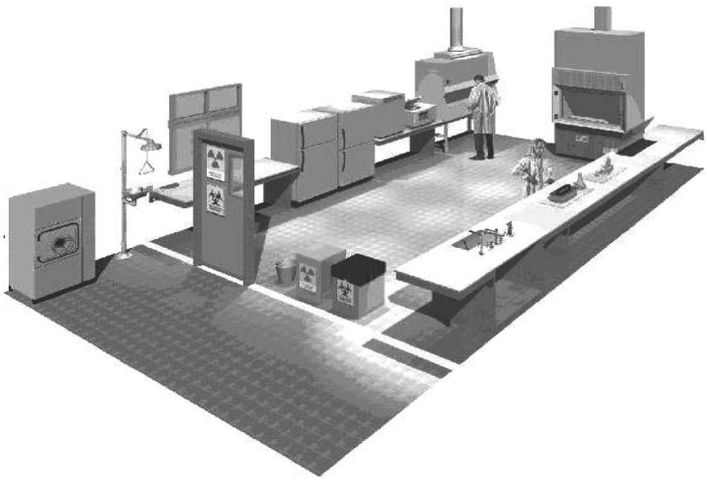
Risk Group 4 เชื้อที่ทำให้เกิดอันตรายสูงต่อคนและต่อชุมชน (high individual and community risk) เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่ร้ายแรงในคนหรือสัตว์ และสามารถแพร่กระจายไปยังบุคคลอื่น ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม ยังไม่มีการรักษาและการป้องกันที่มีประสิทธิภาพ

เมื่อทราบว่างานที่กำลังปฏิบัตินั้นเกี่ยวข้องกับเชื้อในกลุ่มเสี่ยงกลุ่มใด ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องทราบถึงแนวทางการแบ่งระดับของห้องปฏิบัติการ และการเลือกใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายที่เหมาะสม ดังรายละเอียดในตารางที่ 1-1

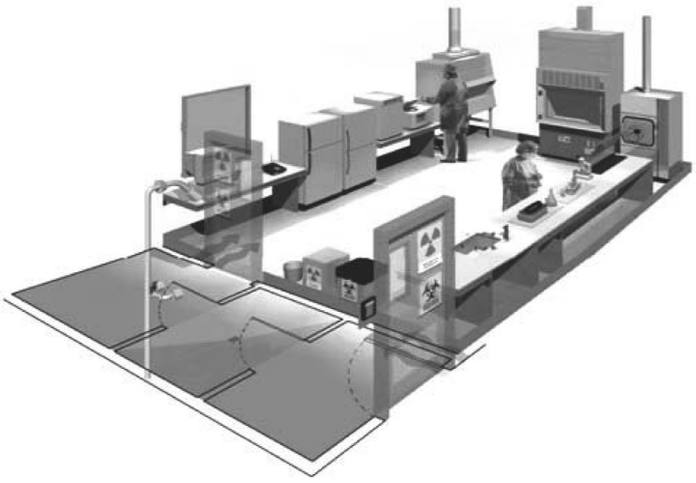
14-0992(001-354)editnew130158.indd 2 1/14/58 BE 3:50 PM



Biosafety level 1



Biosafety level 2



Biosafety level 3

ภาพที่ 1-1 แสดงตัวอย่างห้องปฏิบัติการระดับต่างๆ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 3 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 1-1 ความสัมพันธ์ระหว่าง risk groups, ระดับชีวนิรภัย, การปฏิบัติ และอุปกรณ์ต่างๆ

Risk group	Biosafety level	Laboratory type	Laboratory practices	Safety equipment
1	Basic – Biosafety Level 1	Basic teaching, research	GMT	None; open bench work
2	Basic – Biosafety Level 2	Primary health services; diagnostic services; research	GMT plus protective clothing, biohazard sign	Open bench plus BSC for potential aerosols
3	Containment – Biosafety Level 3	Special diagnostic services, research	As level 2 plus special clothing, controlled access, directional air flow	BSC and/or other primary devices for all activities
4	Maximum Containment – Biosafety Level 4	Dangerous pathogen units	As level 3 plus airlock entry, shower exit, special waste disposal	Class III BSC or positive pressure suits in conjunction with Class II BSCs, double-ended autoclave (through the wall), filtered air

BSC, biological safety cabinet; GMT, Good Microbiological Technique

จากตารางที่ 1-1 จะเห็นว่าโดยทั่วไปการปฏิบัติงานกับเชื้อใน risk group ใด ก็จะเลือกใช้ระดับของห้องปฏิบัติการ (biosafety level) ในระดับเดียวกัน แต่ห้องปฏิบัติการจะต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงของลักษณะงานที่ปฏิบัติและเลือกใช้ระดับของห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม เช่น เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) เป็นเชื้ออันตรายที่จัดไว้ใน risk group 3 แต่ลักษณะการปฏิบัติงานย้อมสีโดยตรงจากเสมหะ และมีเทคนิคการปฏิบัติงานที่เหมาะสม ก็อาจไม่เกิดการฟุ้งกระจาย จึงสามารถทำงานในห้องปฏิบัติการระดับ 2 (BSL-2) ได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจนเพิ่มจำนวนมากขึ้น การปฏิบัติงานเพื่อวิเคราะห์เชื้อหรือทดสอบความไว จะต้องทำในห้องปฏิบัติการระดับ 3 (BSL-3) เป็นต้น

เครื่องมือสำคัญที่เกี่ยวข้อง

1. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)

ต้องมีการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของ autoclave อย่างสม่ำเสมอ เช่นทดสอบด้วย spore test อย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง หากสามารถทำได้ควรวัดอุณหภูมิภายใน autoclave (เช่นใช้ thermometer

14-0992(001-354)editnew130158.indd 4 1/14/58 BE 3:50 PM

หรือ data logger ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว) เพื่อให้มั่นใจว่าเครื่องสามารถให้อุณหภูมิที่เหมาะสมตามระยะเวลาที่กำหนดได้

2. ตู้ปราศจากเชื้อ (biological safety cabinet: BSC)

ในการปฏิบัติงานกับเชื้ออันตรายที่อาจมีการฟุ้งกระจาย ควรทำในตู้ BSC โดยทั่วไปนิยมใช้ชนิด class II ควรศึกษาคุณลักษณะและการตรวจสอบประสิทธิภาพของตู้ BSC เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างปลอดภัย ตู้ BSC ดังกล่าวต้องได้รับการสอบเทียบอย่างน้อยปีละครั้ง และควรตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานในเบื้องต้นทุกครั้งที่ใช้งาน เช่น ใช้เส้นด้ายติดไว้ที่แผ่นกระจกด้านหน้าตู้ เพื่อดูทิศทางการไหลของลม เส้นด้ายควรจะถูกลมดูดให้เอนเข้าในตู้ หากเส้นด้ายถูกลมเป่าออกด้านนอกควรหยุดการใช้และส่งซ่อมโดยเร็ว ในตู้ไม่ควรวางของจำนวนมาก เนื่องจากอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องและอาจกระทบต่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน

3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

ในการปฏิบัติงานที่ต้องปั่นตกตะกอนสิ่งตรวจที่อาจมีเชื้ออันตราย ควรชั่งน้ำหนักหลอดให้เท่ากันเพื่อป้องกันกรณีหลอดแก้วแตกขณะปั่น หากทำได้ควรใช้หลอดพลาสติกแทนหลอดแก้ว หากมีงบประมาณเพียงพอ ควรเลือกใช้ centrifuge ชนิดที่มี safety cup (ใส่หลอดบรรจุสิ่งตรวจในถ้วยปั่นที่มีฝาปิด) ซึ่งหากหลอดแตกขณะปั่น ก็จะไม่ฟุ้งกระจาย

การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของเครื่อง autoclave ด้วย spore test

สปอร์ของแบคทีเรียถูกทำลายยากที่สุด ถ้าสปอร์ถูกทำลาย เชื้ออื่นจะถูกทำลายหมด ดังนั้นจึงนำสปอร์มาเป็นเครื่องทดสอบประสิทธิภาพของการทำให้ปราศจากเชื้อ spore test ซึ่งเป็นหลอดเล็กๆ ภายในบรรจุด้วยสปอร์ *Geobacillus stearothermophilus* และมีหลอดแก้วบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายสีม่วง) ทำการทดสอบดังนี้

1. ใส่ spore test ใน autoclave พร้อมอุปกรณ์หรือวัสดุที่ต้องการฆ่าเชื้อ เมื่อเครื่องหยุดทำงานแล้ว ให้นำหลอด spore test ออกจากเครื่องแล้วใช้ที่หนีบบีบให้หลอดที่บรรจุอาหารแตกเพื่อให้ spore สัมผัสอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสารละลายสีม่วง
2. นำ spore test ในข้อที่ 1. ไปอบที่ 56 °C นาน 48 ชม. ดูการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
   - ถ้า spore ตายอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี (เป็นสีม่วงเหมือนเดิม) แสดงว่า autoclave มีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อได้ดี

14-0992(001-354)editnew130158.indd 5 1/14/58 BE 3:50 PM

- ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วง (เป็นสีเหลือง) คือสปอร์ยังไม่ตาย แสดงว่าเครื่อง autoclave ไม่มีประสิทธิภาพพอสำหรับฆ่าเชื้อ spore ของ *Bacillus* spp. ได้ ต้องทำการตรวจสภาพและแก้ไขโดยช่างและทำ spore test เพื่อทดสอบประสิทธิภาพใหม่

ข้อปฏิบัติสำหรับการใช้ biological safety cabinet

1. ก่อนและหลังการทำงานใน BSC ควรล้างมือด้วยสบู่หรือน้ำยาล้างมือที่มีน้ำยาฆ่าเชื้อ
2. ผู้ปฏิบัติงานควรสวมเสื้อกาวน์ ชนิดแขนยาวปลายรัดและสวมถุงมือเพื่อป้องกันการสัมผัสเชื้อ
3. ทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงานใน BSC โดยเช็ดด้วย 70% alcohol หรือน้ำยาฆ่าเชื้อ
4. ไม่ควรวางของจำนวนมาก เนื่องจากอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเครื่อง และอาจกระทบต่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน โดยเฉพาะส่วนหน้าและส่วนในที่เป็นช่องสำหรับถ่ายเทอากาศ และนำของออกจาก BSC ให้หมดเมื่อปฏิบัติงานเสร็จ
5. อุปกรณ์หรือวัสดุที่จำเป็นต้องใช้ให้วางในบริเวณปฏิบัติงานในตู้ก่อนเริ่มงาน ไม่ควรหยิบเข้าออกระหว่างปฏิบัติงานเพื่อไม่รบกวนทิศทางลมในตู้
6. ตำแหน่งที่ตั้ง BSC ควรอยู่ในที่ไม่มีการทำกิจกรรมอื่นๆ เช่น อยู่ส่วนท้ายของห้องห่างไกลจากประตูทางเข้าออก และห่างไกลเครื่องปรับอากาศหรือเครื่องดูดอากาศ เพื่อป้องกันไม่ให้มีกระแสลมรบกวนซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการไหลเวียนที่นำจุลชีพผ่าน air barrier
7. การปฏิบัติงานใน BSC ต้องไม่เคลื่อนไหวมือและแขนแรงๆแบบรีบด่วนเพราะอาจมีผลรบกวนทิศทางลมในตู้ที่เป็นสาเหตุให้มีจุลชีพหลุดออกนอกตู้หรือมี airborne contamination จากอากาศที่ไหลเข้าตู้
8. ในขณะใช้เครื่อง centrifuge ใน BSC ไม่ควรปฏิบัติงานอื่นๆ ในตู้ เนื่องจากลมที่เกิดจากเครื่องปั่นเหวี่ยงเช่น centrifuge ที่ทำในตู้ BSC สามารถรบกวนทิศทางการไหลเวียนอากาศในตู้อาจมีผลต่อการปล่อยเชื้อออกสู่อากาศในห้องปฏิบัติการ
9. ขณะทำงานในตู้ BSC ยังคงมีความจำเป็นต้องปฏิบัติตามกระบวนการควบคุมการปนเปื้อนจุลชีพและเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic techniques)
10. ต้องทำลายเชื้อส่วนผิวหน้า (surface decontamination) ของอุปกรณ์ที่สัมผัสจุลชีพโดยตรง ก่อนนำออกจากตู้ BSC ที่ทิ้งขยะติดเชื้อหรือภาชนะที่ใส่อุปกรณ์ที่เปื้อนเชื้อต้องปิดฝาก่อนนำออก
11. เมื่อมีอุบัติเหตุเชื้อหรือสิ่งตรวจหกหรือกระเด็นในพื้นที่ปฏิบัติงานใน BSC ต้องทำลายเชื้อบนผิวหน้าของพื้นในตู้ BSC ก่อนนำเชื้อหรือสิ่งตรวจนั้นออกจากตู้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 6 1/14/58 BE 3:50 PM

12. ไม่ควรใช้ตะเกียงบุนเสน ใน BSC เพราะเปลวไฟจะรบกวนการไหลเวียนของอากาศภายในตู้ และอาจทำลาย HEPA filter ถ้าจำเป็นให้ใช้ชนิดที่เปิด-ปิดได้เฉพาะเมื่อต้องการใช้งานหรือเป็นชนิดที่ใช้ไฟฟ้า
13. ควรเปิดเครื่องไว้อย่างน้อย 5 นาทีก่อนใช้งานเพื่อให้อากาศในตู้มีการไหลเวียน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของอากาศในพื้นที่ปฏิบัติงาน
14. ควรทำความสะอาดพื้นผิวภายในตู้ซ้ำอีกครั้งหลังจากเอาของออกหมดแล้ว เนื่องจากอาจมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปื้อนในตู้ทำให้เชื้อราเจริญและปล่อย spore ปนเปื้อนบริเวณปฏิบัติงานได้

การทำลายเชื้อ

การทำลายเชื้ออาจทำได้โดยหลักการใหญ่ๆ 2 วิธีคือ การทำลายเชื้อด้วยหลักการทางฟิสิกส์ เช่น การใช้ความร้อน ได้แก่ การเผา การ autoclave หรือการใช้ hot air oven และการใช้หลักการทางเคมี เช่น การใช้น้ำยาทำลายเชื้อชนิดต่างๆ ในการใช้น้ำยาทำลายเชื้อนั้น จะต้องคำนึงถึงระดับความคงทนของเชื้อต่อน้ำยาทำลายเชื้อ ความสามารถหรือความแรงของน้ำยาในการทำลายเชื้อ ระยะเวลาที่ใช้ทำลายเชื้อ และปริมาณสารอินทรีย์ที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำยา เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ความคงทนของเชื้อต่อน้ำยา ตั้งแต่ทำลายได้ยากจนถึงทำลายได้ง่ายตามลำดับ ได้แก่ สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย, เชื้อวัณโรค, ไวรัส non lipid หรือไวรัสขนาดเล็ก, เชื้อรา, เชื้อแบคทีเรียที่ไม่มีสปอร์, lipid หรือไวรัสขนาดกลาง ความสามารถหรือความแรงของน้ำยาในกรณีใช้เป็น disinfectant เช่น glutaraldehyde จัดอยู่ในระดับ high หรือ intermediate สำหรับ chlorine compounds และ alcohol จัดอยู่ในระดับ intermediate ส่วนสารประเภท quaternary ammonium compounds จัดอยู่ในระดับ low เป็นต้น ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับน้ำยาต้องนานเพียงพอที่เชื้อจะถูกทำลายได้ ปริมาณสารอินทรีย์ในสิ่งตรวจที่จะทำลายเชื้อ เช่น ถ้าใช้น้ำยาทำลายเชื้อกับสิ่งตรวจที่มีสารอินทรีย์มาก เช่น เสมหะ อุจจาระ น้ำยาส่วนมากจะถูกทำให้เสื่อมประสิทธิภาพโดยสารอินทรีย์ ทำให้การทำลายเชื้อลดลง เป็นต้น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 7 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 1-2 ลำดับความทนของจุลชีพต่อสารทำลายจุลชีพแต่ละชนิดเรียงจากมากไปหาน้อย และระดับของการทำลายเชื้อหรือน้ำยาทำลายเชื้อ

Bacterial Spores เช่น *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* (Sterilization) ▼
Mycobacteria เช่น *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, Non-tuberculous mycobacteria (High level disinfection) ▼
Non lipid or Small Viruses เช่น Poliovirus, Coxsackievirus, Rhinovirus (Intermediate level disinfection) ▼
Fungi เช่น *Trichophyton* spp., *Cryptococcus* spp., *Candida* spp. ▼
Vegetative Bacteria เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* choleraesuis, Enterococci (Low level disinfection) ▼
Lipid or Medium-size Viruses เช่น Herpes simplex virus, CMV, Respiratory syncytial virus, HBV, HCV, HIV, Hantavirus, Ebola virus

Modified from Russell and Favero

การดำเนินการเมื่อมีของติดเชื้อหก

กรณีสิ่งตรวจหกเปรอะเปื้อนผิวด้านนอกของภาชนะบรรจุและจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ ให้ทำความสะอาดผิวภาชนะด้านนอกด้วยน้ำยาทำลายเชื้อที่เหมาะสมก่อนที่จะนำมาตรวจตามปกติ ถ้าสิ่งตรวจตกแตกหรือหกหล่นลงพื้น ให้สวมถุงมือยางหนา ใช้กระดาษเช็ดสิ่งเปรอะเปื้อนออกให้มากที่สุด หรือใช้กระดาษแข็งตักสิ่งเปรอะเปื้อนหรือเศษแก้วออก แล้วทิ้งลงในถุงขยะติดเชื้อ ใช้ 0.5% hypochlorite ราดบริเวณที่เปรอะเปื้อนโดยรอบจากด้านนอกสู่ด้านใน ทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที ก่อนเช็ดถูตามปกติ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 8 1/14/58 BE 3:50 PM

ถ้าหลอดบรรจุสิ่งตรวจแตกในเครื่องปั่นตกตะกอนให้ปิดเครื่องและรอประมาณ 30 นาที สวมถุงมือ สวมแว่นตาและผ้าปิดปาก-จมูก แล้วจึงเปิดฝาเครื่อง ใช้ forceps เก็บเศษแก้วชิ้นใหญ่ๆออกก่อน ใช้ forceps จับเศษผ้าหรือกระดาษชำระซับของเหลวและเศษแก้วที่แตกออกให้มากที่สุด (เปลี่ยนกระดาษบ่อยๆ) ถ้าส่วนใดสามารถถอดออกแช่ในน้ำยาทำลายเชื้อได้ ควรถอดออกแช่ด้วยน้ำยาที่เหมาะสม และทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ส่วนที่ไม่สามารถถอดออกได้ให้คลุมด้วยกระดาษชำระแล้วราดด้วยน้ำยาทำลายเชื้อให้ชุ่ม ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จึงเอาออก ปล่อยไว้จนแห้งแล้วเช็ดซ้ำด้วยน้ำ เช็ดให้แห้งอีกครั้ง แล้วจึงใช้งานตามปกติ

แนวทางการทำความสะอาดเมื่อเกิดอุบัติเหตุมีสิ่งตรวจหรือของที่มีเชื้อหกหรือตกแตก

1. สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันตัวได้แก่ เสื้อกาวน์แขนยาว สวมทับด้วยเอี๊ยมพลาสติก, mark, แว่นตา, หมวกคลุมผม, สวมถุงมือบางหรือหนาสีส้ม, สวมถุงหุ้มรองเท้า (ตามความจำเป็น)
2. นำป้ายข้อความ “ระวัง เขตอันตราย” มาตั้งบริเวณที่เกิดอุบัติเหตุเพื่อเตือนผู้ปฏิบัติงานอื่น
3. เก็บเศษแก้วและของมีคมด้วยคีมคีบใส่ภาชนะสำหรับใส่ขยะติดเชื้อชนิดมีคม
4. ใช้กระดาษคลุมทับบริเวณที่มีของหกให้ทั่วถึง จากนั้นเท disinfectant ที่เตรียมไว้ (น้ำ 450 ml กับ 5% hypochlorite 50 ml ราดบริเวณที่เกิดอุบัติเหตุจากด้านนอกเข้าสู่ด้านใน ปล่อยทิ้งไว้นาน 30 นาที
5. รวบกระดาษทิชชูด้วยคีมคีบและไม้พาย (หรืออาจใช้กระดาษแข็งแทน) ไปทิ้งในถุงขยะติดเชื้อ
6. กวาดชิ้นส่วนที่เหลือด้วยไม้กวาดหรือที่ตักขยะไปทิ้งในถุงขยะติดเชื้อ
7. ใช้ผ้าก๊อซหรือกระดาษทิชชูชุบ disinfectant เช็คทำความสะอาดบริเวณที่เกิดอุบัติเหตุให้สะอาดอย่างทั่วถึง
8. ทิ้งผ้าก๊อซหรือกระดาษทิชชูที่ใช้แล้วรวมทั้งเศษแก้วที่แตกไว้ในถุงขยะติดเชื้อ
9. นำถุงขยะติดเชื้อใส่กล่องใส่ของมีคม เพื่อนำไปทำลาย

การกำจัดขยะติดเชื้อ

ขยะติดเชื้อต่างๆ ต้องทิ้งในถุงขยะติดเชื้อ (โดยทั่วไปนิยมถุงแดง) ซึ่งบรรจุในถังขยะปิดมิดชิด สำหรับของมีคมต่างๆ เช่น แผ่นกระจก slide เศษแก้ว ใบมีด ควรทิ้งในภาชนะชนิดหนาที่ไม่แทงทะลุ (เช่น กระป๋องพลาสติกอย่างหนา) ปิดฝาให้มิดชิดก่อนทิ้ง การทำลายขยะติดเชื้อควรใช้วิธี autoclave หรือเผา เพื่อให้มั่นใจว่าไม่แพร่กระจายเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม ตัวอย่างขยะติดเชื้อ เช่น เข็มทุกชนิดที่ใช้กับผู้ป่วยหรือสิ่งตรวจของผู้ป่วย สารคัดหลั่งและสิ่งตรวจอื่นๆจากผู้ป่วย อุปกรณ์หรือภาชนะที่บรรจุหรือสัมผัสสิ่งตรวจหรือเชื้อโรค ห้องปฏิบัติการควรมีแนวทางการปฏิบัติในการจำแนกชนิดของขยะและการกำจัดขยะแต่ละประเภท ดังแสดงในตารางที่ 1-3

14-0992(001-354)editnew130158.indd 9 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 1-3 การจำแนกขยะและวิธีการกำจัดขยะ

ประเภทของขยะ			ภาชนะบรรจุ/สีที่นิยม	วิธีการทำลาย
ขยะทั่วไป	ขยะเปียก	เศษอาหาร	ถุงสีดำ ถังสีเขียว	ขยะกทม.* ฝังกลบ
	ขยะแห้ง	ขยะแห้งไม่คืนสภาพ เช่น กล่องโฟม กระเบื้อง อิฐ ขยะแห้งบางชนิดสามารถนำมารีไซเคิลได้ เช่น กระดาษ แก้ว พลาสติก โลหะ	ถุงสีเหลือง ถังสีเหลือง	ขยะกทม.* ฝังกลบ หรือรีไซเคิล
ขยะอันตราย	ขยะติดเชื้อ	ชนิดไม่มีคม เช่น สิ่งตรวจผู้ป่วย หรือขยะที่สัมผัสสารคัดหลั่งผู้ป่วย สายยาง กระบอกฉีดยาหรือเจาะเลือด	ถุงสีแดง ถังสีแดง	เผาด้วยความร้อนสูง 800 ^{o}C หรือ autoclave
		ชนิดมีคม เช่น เข็ม ขวดแก้วหรือวัตถุมีคมที่สัมผัสสิ่งตรวจหรือสารคัดหลั่งผู้ป่วย	ภาชนะพิเศษของมีคมไม่ทะลุ เช่น กล่องพลาสติกชนิดหนา กระป๋องโลหะ ปิดแน่น ก่อนใส่ถุงสีแดง	
	ขยะไม่ติดเชื้อ	สารเคมีจากห้องปฏิบัติการ	ภาชนะพิเศษ	กำจัดตามชนิดของสารเคมี ทำโดยบริษัทกำจัดสารเคมี
		ยาปฏิชีวนะ วัคซีน ขยะเคมีบำบัด	ถุงและถังที่ระบุชนิดของขยะ	เผาด้วยความร้อนสูง 1200 ^{o}C
		ขยะอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม กระป๋องสเปรย์ แบตเตอรี่ หลอดฟลูออเรสเซนต์ ถ่านไฟฉาย	ถุงและถังที่ระบุชนิดของขยะ	ขยะกทม. ฝังกลบด้วยวิธีพิเศษ

*ขยะกทม. หมายถึงขยะที่กำจัดโดย กทม. รวมทั้งขยะที่กำจัดโดยเทศบาลของแต่ละท้องที่

วิธีปฏิบัติการทิ้งเข็มหรือของมีคมในกล่องทิ้งเข็มและการทิ้งกล่อง

1. ใช้มือจับกระบอกเข็มใช้แล้วที่มีเข็มอยู่มายังกล่องปลดเข็มโดยไม่ต้องใส่คืนปลอกเข็ม
2. นำเข็มใส่เข้าในรูของกล่องปลดเข็มเพื่อทำการปลดเข็มออกจากกระบอกเข็ม
3. ขณะใช้กล่องปลดเข็มหรือกล่องใส่ขยะมีคม ต้องตั้งในที่ปลอดภัยเพื่อป้องกันการล้มหรือหล่นหก เช่น วางส่วนในของโต๊ะหรือมีที่ยึดกล่อง ไม่ควรวางริมโต๊ะ หรือใต้โต๊ะ ทางเดินหรือใต้เครื่องมือ
4. หลังบรรจุเข็มหรือของมีคมที่ติดเชื้อได้สองในสามส่วนของภาชนะ ให้ปิดฝาให้แน่น ภาชนะที่ปิดไม่แน่นต้องพันด้วยเทปให้แน่น กล่องจะเปิดอีกไม่ได้
5. นำกล่องไปกำจัดเป็นขยะติดเชื้อทั้งกล่อง โดยไม่เปิดกล่องถ่ายขยะออก

14-0992(001-354)editnew130158.indd 10 1/14/58 BE 3:50 PM

การห่อและจัดส่งตัวอย่างติดเชื้อ

เพื่อป้องกันหรือลดการแพร่กระจายของเชื้อ ควรจัดให้มีที่เก็บเสมหะเป็นสัดส่วนอยู่ในที่โปร่งโล่ง มีแดดส่อง อากาศถ่ายเทดี และห่างไกลบริเวณที่มีคนเดินจำนวนมาก มีป้ายบ่งชี้ มีอ่างล้างมือ มีที่ทิ้งขยะติดเชื้อ มีอุปกรณ์และน้ำยาล้างมือชนิดที่ฆ่าเชื้อได้ เช่น 4% Chlorhexidine มีรายละเอียดวิธีปฏิบัติแสดงขั้นตอนการเก็บเสมหะ ไม่ควรมีประตูเพราะลูกบิดประตูอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อจากการจับลูกบิดประตูได้และมีการทำความสะอาดสถานที่ทุกวัน

การส่งสิ่งตรวจมาห้องปฏิบัติการต้องมีการป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ ใบขอส่งตรวจต้องแยกออกจากสิ่งตรวจเพื่อไม่ให้สัมผัสภาชนะใส่สิ่งตรวจ เพราะด้านนอกของภาชนะอาจมีการปนเปื้อนได้จากกระบวนการเก็บสิ่งตรวจและใบส่งตรวจเป็นเอกสารคุณภาพที่ต้องเก็บไว้ ควรใส่ภาชนะสิ่งตรวจในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงได้ ภาชนะบรรจุสิ่งตรวจต้องมีความคงทนไม่แตกง่าย ฝาปิดแน่นโดยเฉพาะการส่งแบบกระสวย ควรขนส่งในถังหรือกระติกที่ปิดแน่นสามารถป้องกันการหกเลอะออกสู่ภายนอก กรณีสิ่งตรวจหกเลอะต้องทำการปฏิเสธสิ่งตรวจ และปฏิบัติตามแนวทางการทำความสะอาดเมื่อเกิดอุบัติเหตุมีสิ่งตรวจหกหรือตกแตก

เอกสารอ้างอิง

1. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th ed. Washington DC: U.S. Department of Health and Human Services; 2010.
2. Favero MS, Bond WW. Chemical disinfection of medical surgical material. In: Block SS, editor. Disinfection, sterilization and preservation, 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 881-917.
3. International Standard. ISO 15190: Medical laboratories-Requirements for safety. 2003.
4. Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. J Hosp Infect. 1999; 43:57-68.
5. บุญช่วย เอี่ยมโภคลาภ. ตู้ชีวนิรภัย: การใช้งานและการตรวจสอบประสิทธิภาพ. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2557; 42(1): 4778-4792.
6. โรงพยาบาลศิริราช. คู่มือบริหารจัดการขยะมูลฝอยของโรงพยาบาลศิริราช. กรุงเทพมหานคร: โรงพยาบาลศิริราช; 2550.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 11 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 2
การเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
วรรณา เพ่งเรืองโรจนชัย

บทที่ 2

หลักการสำคัญของการเก็บสิ่งตรวจเพื่อการเพาะเชื้อ

1. ต้องหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่นที่อยู่รอบๆบริเวณที่เก็บสิ่งตรวจ เช่น ผิวหนังหรือ mucous membranes ใกล้ตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ จึงต้องใช้น้ำยาทำลายเชื้อทำความสะอาดผิวหนังบริเวณที่จะเก็บหรือเจาะดูดสิ่งตรวจ สำหรับตำแหน่งที่ปรกติมีเชื้อประจำถิ่นปนเปื้อนมากกว่าหนึ่ง species ต้องใช้ selective methods ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคที่จำเพาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อประจำถิ่นที่ไม่ใช่เชื้อก่อโรค
2. เก็บสิ่งตรวจเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ขณะเริ่มมี onset ของโรคเพื่อให้ได้สิ่งตรวจที่เป็นตัวแทนที่ดีของการติดเชื้อ
3. มีการปฏิเสธสิ่งตรวจและต้องเก็บสิ่งตรวจใหม่ เมื่อสิ่งตรวจที่เก็บครั้งแรกมีคุณภาพไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจทางจุลชีววิทยา หรือมีปริมาณไม่พอเพียง การนำส่งที่ไม่หมาะสมด้านอุณหภูมิ การนำส่งล่าช้า กำหนดเกณฑ์รับหรือเกณฑ์ปฏิเสธตัวอย่าง
4. เลือกวิธีการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับสิ่งตรวจแต่ละชนิดดังนี้

   <u>Swab</u> ต้องป้ายหรือถูแรงๆ และต้องทำให้เปียกชุ่มก่อนเพื่อให้ swab ดูดซับสิ่งตรวจได้มาก swab ไม่สามารถใช้เพาะเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด ไม่เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อราเพราะเก็บ mycelium ไม่ได้ ใช้เพาะเชื้อ *Mycobacterium* ไม่ได้ต้องใช้สารน้ำหรือชิ้นเนื้อ

   <u>Aspirates</u> สิ่งตรวจที่ได้จากการดูดมีคุณภาพดีกว่า swab ใช้ 70% alcohol ทำความสะอาดผิวหนังก่อนเจาะ แล้วตามด้วย providone iodine หรือ 2% chlorhexidine in alcohol

   <u>Tissue</u> ชิ้นเนื้อที่ใช้เพาะเชื้อ เช่น ต้องทำ biopsied tissue โดย aseptic technique เช่น tissue จาก draining sinus, curetting deep within interior wall, bone biopsy เป็นต้น

   <u>Sputum</u> เสมหะเป็นสิ่งตรวจที่ดีสำหรับการวินิจฉัยโรค pneumonia แต่ต้องไม่มีน้ำลายปนเปื้อนจึงควรตรวจคุณภาพโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ microscopy evaluations ก่อนการเพาะเชื้อ

   <u>Urine</u> ปัสสาวะควรเพาะเชื้อจาก midstream collection, catheterization สำหรับ Foley catheter tip ไม่เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อเพราะมีการปนเปื้อนของเชื้อจาก urethral micro flora ไม่ต้องทำ colony count

Feces/Stool อุจจาระเหมาะสำหรับเพาะเชื้อมากว่า rectal swabs มีโอกาสได้เชื้อก่อโรคมากกว่า สำหรับ rectal swabs ต้องใส่ใน transport media เสมอ

เชื้อที่ไวต้อง ambient condition ตายง่ายได้แก่ *Shigella* spp., *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, และ anaerobes จึงห้ามเก็บ CSF ในตู้เย็น

5. นำส่งในภาชนะหรือใน transport media ที่เหมาะสม เช่น

   Carry Blair สำหรับ stool หรือ rectal swab

   Stuart's/ Amies w/o charcoal สำหรับสิ่งตรวจทุกชนิด

   Thioglycolate สำหรับการเพาะเชื้อ anaerobe bacteria

   Hemoculture media สำหรับเลือด

   ภาชนะมีฝาปิดแน่นไม่มีการรั่วไหล บรรจุภาชนะเก็บสิ่งตรวจในถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ

6. ต้องระบุทั้งชนิดของสิ่งตรวจและตำแหน่งของร่างกายหรืออวัยวะที่เก็บสิ่งตรวจชัดเจน เช่น ไม่ระบุว่าหนองแต่ต้องระบุว่า หนองจากนิ้วชี้มือซ้ายเป็นต้น การชี้บ่งตัวอย่างตรงกับข้อมูลในใบนำส่ง เก็บจากผู้ป่วยที่ถูกคน การเก็บสิ่งตรวจจากผู้ป่วยผิดคนอาจทำให้ไม่ได้รับการรักษา หรือได้รับการรักษาที่ผิดวิธีเป็นอันตรายกับผู้ป่วยทั้งสองคนได้ ผู้เก็บสิ่งตรวจจึง ต้องระบุตัวตนของผู้ป่วยก่อนเก็บสิ่งตรวจเสมอ ในใบนำส่งควรมีข้อมูลดังนี้ **Demographic information ของผู้ป่วย** เช่น Patients ID, Age (Date of birth), Sex, Health cares facility (OPD, ICU, อายุรศาสตร์), Patient location (ward), Admission date, Clinical diagnosis และ **Specimen information** เช่น Specimen no, Specimen type, Body site, Date/time of specimen collection
7. มีคู่มือการเก็บสิ่งตรวจสำหรับเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นแนวปฏิบัติในการเก็บสิ่งตรวจให้มีคุณภาพ
8. สิ่งตรวจแบ่งออกเป็นสองประเภทคือ ชนิดที่เก็บจากตำแหน่งที่ปกติปราศจากเชื้อและสิ่งตรวจจากตำแหน่งที่มีเชื้อประจำถิ่น

ชนิดของสิ่งตรวจจากตำแหน่งที่ปกติปราศจากเชื้อ ได้แก่

1. Blood
2. Bone marrow aspirate
3. Cerebral spinal fluid
4. Pleural fluid
5. Pericardial fluid

14-0992(001-354)editnew130158.indd 14 1/14/58 BE 3:50 PM

6. Peritoneal fluid
7. Joint fluid
8. Bile
9. Ascitic fluid
10. Vitreous fluid
11. น้ำหล่อเลี้ยงอวัยวะภายในอื่น ๆ
12. Tissue

สิ่งตรวจจากตำแหน่งที่มีเชื้อประจำถิ่น ได้แก่

1. สิ่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เช่น เสมหะ throat swab
2. สิ่งตรวจจากระบบทางเดินปัสสาวะ
3. สิ่งตรวจจากระบบทางเดินอาหาร
4. สิ่งตรวจจากระบบสืบพันธุ์
5. แผล และหนอง

เชื้อประจำถิ่นของพื้นผิวส่วนต่างๆของร่างกาย

ผิวหนัง	*S. epidermidis*, streptococci, *Corynebacterium*, *Candida*
คอ	Viridans streptococci, diphtheroids
ปาก	Viridans streptococci, *Moraxella catarrhalis*, actinomyces, spirochaetes
ระบบทางเดินอาหาร	Viridans streptococci, *M. catarrhalis*, diphtheroids, micrococci
ช่องคลอด	Lactobacilli, diphtheroids, streptococci, yeasts
ทางเดินอาหาร	*Bacteroides*, anaerobic streptococci, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp.

การเก็บสิ่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี throat swab

ทำโดยใช้ไม้กดลิ้นพร้อมกับให้ผู้ป่วยร้อง “อา...า..า..” ยาวๆแล้วใช้ไม้พันสำลี (swab) ที่ปราศจากเชื้อป้ายบริเวณต่อมทอนซิลทั้งสองข้างและ posterior pharynx หรือตรงบริเวณที่มีการอักเสบและมีหนอง พยายามอย่าให้ swab ถูกน้ำลายในปากจากนั้นใส่ swab ลงใน Stuart’s medium แล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชม.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 15 1/14/58 BE 3:50 PM

ขั้นตอนการการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ

1. เตรียมอุปกรณ์การเจาะเลือดให้พร้อมก่อนเจาะเลือด ขวดเพาะเชื้อตั้งที่อุณหภูมิห้อง
2. หาตำแหน่งหลอดเลือดที่เหมาะสม ควรเจาะบริเวณหลอดเลือดดำส่วนปลาย (peripheral vein)
3. ก่อนเจาะเลือดให้ทำความสะอาดมือด้วยการล้างมือด้วย antiseptic หรือใช้ alcohol hand rub และสวมถุงมือแบบสะอาด (clean glove)
4. การทำความสะอาดผิวหนังเป็นขั้นตอนสำคัญในการลดการปนเปื้อน ให้ใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol รอให้แห้งและออกฤทธิ์ได้สูงสุดใช้เวลาเพียง 30 วินาที แต่ถ้าใช้ povidone-iodine ต้องรอทิ้งให้แห้งจนกว่าจะออกฤทธิ์ถึง 2 นาที
5. การเช็ดผิวหนังให้เช็ดวนจากด้านในออกด้านนอกเป็นวงกว้างอย่างน้อย 5 cm ถูแรงพอควรเป็นเวลา 30 วินาที และรอจนแห้งไม่น้อยกว่า 30 วินาที กรณีใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol หรือ 2 นาที กรณีใช้ povidone-iodine หลีกเลี่ยงการสัมผัสบริเวณผิวหนังที่จะเจาะเลือดหลังทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
6. ทำความสะอาดจุกยางขวดเพาะเชื้อด้วย 70% alcohol หรือ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ไม่ควรใช้สารที่มี iodine เป็นองค์ประกอบเนื่องจากอาจทำให้จุกยางมีการเปลี่ยนสภาพได้ ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อได้
7. ใส่เลือด 3 ml ลงในขวดเพาะเชื้อ โดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนเข็ม เนื่องจากไม่มีความแตกต่างของโอกาสการปนเปื้อนเชื้อของการเปลี่ยนเข็ม
8. ส่งห้องปฏิบัติการทันที เพื่อป้องกันไม่ให้มีผลกระทบต่อระยะเวลาการรอผล เนื่องจากต้องรายงานผลรีบด่วนเป็นค่าวิกฤติ ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง: กรณีเจาะเลือดเพื่อส่งตรวจรายการทดสอบอื่นๆด้วย ต้องใส่เลือดในขวดเพาะเชื้อก่อนเสมอเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลชีพและสารเคมีอาจมีในหลอดที่ใส่เลือด

การเก็บสิ่งตรวจจากระบบทางเดินปัสสาวะเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การเก็บปัสสาวะเพื่อเพาะเชื้อให้เก็บแบบ clean-voided midstream urine โดยทำดังนี้

1. ล้างทำความสะอาดช่องเปิดของท่อปัสสาวะและอวัยวะรอบข้างด้วยน้ำยาทำลายเชื้อ หรือน้ำสะอาดแล้วซับแห้งด้วยสำลีหรือผ้าก๊อซที่สะอาด โดยในเพศหญิงให้ใช้นิ้วแยกส่วน labia ออกให้กว้างและดึงส่วนผิวหนังให้รั้งขึ้นบน ส่วนในเพศชายให้ดึงหนังหุ้มอวัยวะเพศให้พ้นส่วนปลายออกให้มากที่สุด
2. ถ่ายปัสสาวะส่วนแรกทิ้งไปก่อน เพื่อเป็นการชะล้างสิ่งที่อาจจะปนเปื้อน จากนั้นเก็บปัสสาวะลงในภาชนะปากกว้างปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ ปัสสาวะที่เก็บได้ต้องส่งเพาะเชื้อโดยเร็วที่สุด

14-0992(001-354)editnew130158.indd 16 1/14/58 BE 3:50 PM

ไม่ควรเกิน 2 ชม. เนื่องจากเชื้อในปัสสาวะสามารถเพิ่มจำนวนได้ จำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้แปลผลผิดได้ กรณีที่ส่งตรวจไม่ได้ทันที ให้เก็บไว้ที่ 4 ^{o}C แต่ไม่เกิน 24 ชม.

ตารางที่ 2-1 การเก็บสิ่งตรวจจากระบบต่างๆในร่างกาย การนำส่งและการเก็บรักษา

System	Specimen	Storage temperature/Transport media
1. Upper respiratory tract	Throat swab	Sterile tube or Stuart transport medium transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at RT
2. Lower respiratory tract	Sputum	Sterile container transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at RT
3. Genital tract	Vaginal swab	Sterile tube or Stuart transport medium transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at RT
4. Open wound	Pus, wound	Sterile tube or Stuart transport medium transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at RT
5. Urinary tract	1. Voided midstream urine	Sterile container transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at 4 ^{o}C
	2. Catheterized urine	Sterile container transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at 4 ^{o}C
	3. Suprapubic aspiration	Sterile container transport ≤ 2 h at RT, storage ≤ 24 h at 4 ^{o}C

RT = Room Temperature; h = Hour

เกณฑ์การปฏิเสธสิ่งตรวจสำหรับการเพาะเชื้อ

- Improper or no label
- Prolong transportation
- Improper container (non sterile)
- Leaking container
- Oropharyngeally contaminated
- Obvious foreign contamination
- Duplicate specimens submitted at the same day/time
- Specimen unsuitable for culture request
- Quantity not sufficient

14-0992(001-354)editnew130158.indd 17 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 2-2 สิ่งตรวจที่ควรเก็บและสิ่งตรวจที่ไม่ควรเก็บสำหรับการเพาะเชื้อ

สิ่งตรวจ	สิ่งตรวจที่ควรเก็บ (Appropriate)	สิ่งตรวจที่ไม่ควรเก็บ (Inappropriate)
เลือด	Separate 2 or 3 venipunctures, before initiation of antibiotics	Clotted blood, 1 or >3 specimens within 24 h, antisepsis with alcohol only
ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง	Freshly expectorated mucus and inflammatory cells (pus, sputum)	Saliva, oropharynegeal, secretions, sinus, drainage, nasopharynx
Sinus	Direct aspiration, washes, curettage and biopsy from sinus	Nasal/nasopharyngeal swab, sputum, saliva
ระบบทางเดินปัสสาวะ	Midstream urine; urine from catheterization, suprapubic aspiration, cystoscopy or surgical procedure	Urine from Foley catheter collection bag
Superficial wound	Aspiration of pus or irrigation fluid, swab of purulence from beneath dermis	Swab/specimen contaminated with surface material, irrigation fluid with preservative
Deep wound	Purulence, necrosis, or tissue from deep subcutaneous site	Specimen contaminated with surface material
ระบบทางเดินอาหาร	Freshly pass stool	Rectal swab

การจัดการสิ่งตรวจ

- ตรวจสอบ หมายเลขขอตรวจ, ชื่อ-นามสกุล, H.N. บนใบนำส่งกับบนภาชนะให้ตรงกัน จากนั้นจึงตรวจสอบรายละเอียดดังกล่าวข้างต้นบนใบนำส่งให้ตรงกัน
- สิ่งตรวจที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจะถูกนำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C เป็นเวลา 18-24 ชม.
- สิ่งส่งตรวจจะถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ
  1. กลุ่มที่ต้องรายงานผล microscopic examination เบื้องต้น ได้แก่ เสมหะ, หนอง, น้ำหล่อเลี้ยงอวัยวะภายใน
  2. กลุ่มที่ไม่ต้องรายงานผล microscopic examination ได้แก่ ปัสสาวะ อุจจาระ
- Microscopic examination รายงานผลเบื้องต้น preliminary report
- Final report for microscopic examination, identification and antimicrobial susceptibility test

14-0992(001-354)editnew130158.indd 18 1/14/58 BE 3:50 PM

การเก็บสิ่งตรวจตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์

ขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์

- มีคู่มือจัดเก็บตัวอย่างแจกให้หน่วยงานที่เก็บตัวอย่างมาส่งห้องปฏิบัติการ ควรมีรายละเอียดครบถ้วนและต้องทบทวนทุกปี
- คู่มือระบุ วิธีการตรวจ เวลาที่ให้บริการ การจัดเก็บตัวอย่าง การปฏิเสธตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม การรับตรวจวิเคราะห์เพิ่ม
- มีการชี้บ่งตัวอย่าง/ใบนำส่ง/ตัวอย่างที่แบ่งมาให้สามารถสอบกลับไปยังผู้ป่วยแต่ละคนในแต่ละวัน/เวลา และตัวอย่างเริ่มต้นได้ ชื่อ นามสกุล และ H.N. หรือ Lab no.
- มีการควบคุมวิธีการนำส่งตัวอย่างภายในเวลาและอุณหภูมิเหมาะสม ปลอดภัยต่อผู้นำส่งและสิ่งแวดล้อม
- หลักฐานระบุรายละเอียดสภาพตัวอย่างหรือใบนำส่งที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ บันทึกการรับตัวอย่างในสมุด/ระบบคอมพิวเตอร์/ระบบอื่น ๆ (วัน/เวลา/ชนิดตัวอย่าง/ผู้รับ)
- กรณีที่ยังไม่ทำการวิเคราะห์ในทันที มีวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างเหมาะสม

ขั้นตอนการรายงานผล

- กำหนด “ค่าวิกฤติ” หรือ “ช่วงของค่าวิกฤติ” โดยทำความตกลงกับแพทย์ผู้ส่งตรวจ กรณีพบค่าวิกฤติ มีวิธีการรายงานผล บันทึกค่าวิกฤติที่พบ/วัน/เวลา/ผู้รายงาน นำมาทบทวนระบบคุณภาพ
- กรณีจำเป็นต้องวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การรับตัวอย่าง มีการระบุสภาพปัญหา/ข้อควรระวังในการแปลผลในใบรายงานผล

14-0992(001-354)editnew130158.indd 19 1/14/58 BE 3:50 PM

วิธีปฏิบัติการเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ตารางที่ 2-3 การเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อ aerobic bacteria

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Blood	ขวด hemoculture - ผู้ใหญ่ 5-10 ml - เด็ก 1-5 ml - ทารกแรกเกิด 1-2 ml จำนวนขวด 1. กรณีไม่เร่งด่วนเจาะอย่างน้อย 2 ขวด ภายใน 24 ชม. แต่ไม่ควรเกิน 4 ขวด 2. กรณีเร่งด่วนต้องรีบให้ยาปฏิชีวนะให้เจาะ 2 ขวดพร้อมกันแต่ละคนละตำแหน่ง	1. เตรียมอุปกรณ์การเจาะเลือดให้พร้อม 2. ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่หรือน้ำยาฆ่าเชื้อและใส่ถุงมือ 3. เลือกตำแหน่งของหลอดเลือดดำส่วนปลาย (peripheral vein) ที่จะเจาะเลือด 4. เช็ดด้วย 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol แต่สำหรับเด็กแรกเกิดให้ใช้ 70% alcohol เช็ดแทนโดยเช็ดวนจากด้านในออกด้านนอกเป็นวงกว้างอย่างน้อย 5 cm รอไม่น้อยกว่า 30 วินาที จนน้ำยาที่เช็ดซ้ำนั้นแห้ง	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง **<u>ห้ามเก็บในตู้เย็น</u>**	1. ขวด hemoculture ที่ต้องเก็บในตู้เย็นให้นำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะใส่เลือด 2. ควรหลีกเลี่ยงการเจาะเลือดจากหลอดเลือดที่ขาหนีบ (inguinal vessels) 3. หลีกเลี่ยงการสัมผัสบริเวณผิวหนังที่จะเจาะเลือดหลังจากที่ทำความสะอาดแล้ว 4. ควรเจาะเลือดก่อนที่ผู้ป่วยจะได้รับสารต้านจุลชีพถ้าผู้ป่วยได้รับสารต้านจุลชีพแล้วให้เจาะเลือด 15 นาที ก่อนที่จะให้สารต้านจุลชีพครั้งถัดไป 5. ไม่ควรเจาะเลือดเพื่อใช้ในการทดสอบอื่นในคราวเดียวกันเพราะอาจเกิด clot หรือ contamination ได้ง่าย

14-0992(001-354)editnew130158.indd 20 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Blood	3. ผู้ป่วยเด็กให้เจาะเลือดเพียงครั้งเดียว แต่ถ้าสงสัย ภาวะติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ ต้องเจาะอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกันไม่เกิน 24 ชม.	5. ใช้เข็มและ syringe เจาะเลือดออกจากหลอดเลือดดำ 6. ทำความสะอาดจุกยางที่ฝาขวด hemoculture ด้วย 70% alcohol และรอให้แห้ง 7. แทงเข็มลงตรงกลางจุกยางของขวด hemoculture ฉีดเลือดลงในขวดเบาๆ 8. เขย่าขวดเป็นวงกลมบนพื้นโต๊ะประมาณ 5 รอบ และซ้ายขวาข้างละ 5 ครั้ง 9. ใช้ 70 % alcohol เช็ดจุกยางด้านบนของขวดอีกครั้ง			6. การเจาะเลือด 2 ครั้งห่างกัน 15 หรือ 30 นาที กับการเจาะเลือดจากตำแหน่งที่ต่างกัน 2 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน พบว่าความไวในการเพาะเชื้อไม่แตกต่างกัน 7. กรณีที่สงสัยการติดเชื้อจากสายสวนหลอดเลือดดำและใช้เครื่องเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ ให้ดูดเลือดจากสายสวน 1 ขวด และเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำส่วนปลายอีก 1 ขวดพร้อมๆกัน ถ้าขวดที่มาจากสายสวนมีเชื้อขึ้นก่อนขวดที่เจาะมาจากหลอดเลือดดำส่วนปลาย เท่ากับหรือมากกว่า 2 ชม. บ่งชี้ถึงการการติดเชื้อมาจากสายสวนหลอดเลือด 8. กรณีผู้ป่วยเด็กที่เจาะเลือดยากและมีสายสวนหลอดเลือด เช่น central line คาอยู่ อนุโลมให้ดูดเลือดจากสายสวนได้แต่หากผลการเพาะเชื้อจากสายสวนมีเชื้อขึ้นและต้องการยืนยันว่าเป็นผลบวกปลอมหรือไม่ ให้เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำส่วนปลายเพื่อเพาะเชื้อซ้ำอีกครั้ง

14-0992(001-354)edittnew130158.indd 21 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Blood					9. ถ้าต้องการเพาะเชื้อวัณโรคให้เลือกขวด hemoculture ที่เหมาะสมและปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต
Bone marrow	ขวด hemoculture	แพทย์เป็นผู้เจาะเก็บ	เหมือนกับ blood	เหมือนกับ blood	
CSF	1 ml/ขวดปราศจากเชื้อ	เจาะเก็บโดยใช้ sterile technique โดยเก็บเป็น 3 ขวด และใช้ขวดที่ 2 ส่งเพาะเชื้อ	ภายใน 15 นาที ห้ามแช่เย็น	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	1. ถ้าเจาะได้ขวดเดียวให้นำส่งห้องจุลชีววิทยาเพื่อเพาะเชื้อก่อนที่เหลือจึงส่งไปตรวจทางเคมีและ cell count

14-0992(001-354)editnew130158.indd 22 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Mid stream urine					
1. ผู้ป่วยหญิง (female)	10-15 ml/ ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ทำความสะอาดบริเวณรอบๆ ท่อปัสสาวะ (urethra) ด้วยสบู่ 2. ล้างสบู่ออกและเช็ดให้แห้ง 3. ใช้นิ้ว 2 นิ้วแยก labia ให้ห่างออกจากกัน ถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไป 4. ถ่ายปัสสาวะช่วงกลางลงในภาชนะปราศจากเชื้อ	ควรส่งทันที ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	1. ควรใช้ภาชนะปากกว้าง
2. ผู้ป่วยชาย (male)	10-15 ml/ ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ร่นหนังหุ้มปลาย gland penis แล้วทำความสะอาดด้วยสบู่ 2. ล้างสบู่ออกและเช็ดให้แห้ง 3. ถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไป 4. ถ่ายปัสสาวะช่วงกลางลงในภาชนะปราศจากเชื้อ	ควรส่งทันที ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	1. ควรใช้ภาชนะปากกว้าง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 23 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Catheterized urine					
1. straight catheter	ประมาณ 15 ml/ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ทำความสะอาดบริเวณรอบๆ urethra ด้วยสบู่ 2. ล้างสบู่ออกและเช็ดให้แห้ง 3. สอด catheter เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ 4. ปล่อยน้ำปัสสาวะทิ้งไปประมาณ 15 ml 5. เก็บปัสสาวะใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ	ควรส่งทันทีภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	1. ไม่ควรใช้วิธีนี้สำหรับ routine urine culture ยกเว้นผู้ป่วยถ่ายปัสสาวะเองไม่ได้หรือมีการอุดตันของท่อปัสสาวะ
2. indewelling catheter	5-10 ml/ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ใช้สำลีชุบ 70% alcohol ทำความสะอาด ส่วนต่อระหว่าง catheter กับสาย drain 2. ใช้เข็มและกระบอกฉีดยาแทงแล้วดูดปัสสาวะออกมาใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ 5-10 ml	ควรส่งทันทีภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 24 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Fluids					
abdominal ascitic, bile, joint, pericardial, peritoneal, pleural synovial และ amniotic fluid	1. ≥ 1 ml สำหรับ PDF (peritoneal dialysis fluid) 2. ≥ 50 ml/ภาชนะปราศจากเชื้อ	แพทย์เป็นผู้เจาะโดยใช้ sterile technique	ภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ยกเว้น pericardial fluid เก็บที่ 4 ^{o}C	1. ห้ามใช้ sterile swab จุ่ม fluids ต่างๆ แล้วใส่ในภาชนะบรรจุ transport medium 2. ในกรณีที่ต้องการทำ cell count ควรส่งทันที 3. ถ้าต้องการเพาะหาเชื้อรา ให้เก็บที่ 4 ^{o}C ได้ ไม่เกิน 24 ชม.
gastric : wash หรือ lavage fluid	25-50 ml/ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. เก็บตอนเช้าเมื่อผู้ป่วยตื่นนอนก่อนรับประทานอาหารเช้า 2. ใส่สาย nasogastric tube เข้าทางปาก หรือทางจมูกลงไปในกระเพาะ 3. ล้างกระเพาะโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 20-50 ml 4. เก็บน้ำล้างกระเพาะใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หรือ neutralize ด้วย 1.5 ml ของ 40% Na_2HPO_4 ภายใน 1 ชม. หลังเก็บ	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	1. ควรทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารให้เร็วที่สุด เนื่องจากเชื้อวัณโรคใน gastric wash ตายเร็ว

14-0992(001-354)editnew130158.indd 25 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Fluids					
IV catheter	ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ทำความสะอาดผิวหนังรอบๆ catheter ด้วย 70% alcohol 2. ใช้ sterile technique ดึงสาย catheter ออกมา 3. ตัดปลายด้านที่อยู่ในตัวผู้ป่วยประมาณ 5 cm ใส่ลงภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	1. อย่าให้สายแห้งก่อนทำการเพาะเชื้อ 2. ไม่ควรทำ culture จาก Foley catheter เพาะเชื้อที่ขึ้นเป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณปลาย urethra

14-0992(001-354)editnew130158.indd 26 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Abcess					
1. open	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ทำความสะอาดผิวส่วนบนของแผลโดยใช้น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 2. เช็ดหนองที่อยู่ส่วนบนของแผลทิ้ง 3. ใช้ sterile swab ป้ายหนองบริเวณแผลที่อยู่ลึกลงไปและบริเวณขอบแผล 4. จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	1. ถ้าจะย้อมแกรมด้วยควร swab เพิ่มอีก 1 อัน ป้ายลงบน slide สะอาดปราศจากไขมัน
2. close	1-2 ml ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ทำความสะอาดผิวส่วนบนของแผลโดยใช้ 70% alcohol 2. ใช้เข็มและ syringe เจาะดูดหนองออกมา 3. ฉีดใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	-	1. ควรนำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด

14-0992(001-354)edit new130158.indd 27 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Upper respiratory tract					
1. nasal	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ใช้ sterile swab จุ่มน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 2. สอดเข้าไปในรูจมูกลึกประมาณ 2 cm 3. หมุน swab ให้สัมผัสกับผนังด้านในของรูจมูก จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	1. การเพาะหาเชื้อจากรูจมูกส่วนใหญ่ใช้ ในการค้นหาผู้ที่เป็นพาหะของ *Staphylococcus*
2. nasopharynx	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ใช้ sterile nasopharynx swab วัดปลาย swab จากรูจมูกถึงคิ้วแล้วงอลวดให้โค้ง หรือหักเป็นมุม 90 องศา 2. ให้ผู้ป่วยเงยหน้าประมาณ 45 องศา หายใจเข้าลึกๆ และหายใจออกจนสุด แล้วกลั้นหายใจ 3. สอด swab เข้าไปทางรูจมูกจนสุด แล้วหมุนโดยรอบประมาณ 3 วินาที 4. จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium หรือ ป้ายลงบนอาหารเพาะเลี้ยงโดยตรง	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	1. กรณีที่นำ swab เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงต้องนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 28 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Upper respiratory tract					
3. throat	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ใช้ไม้กดลิ้นผู้ป่วยไว้ 2. นำ sterile swab ป้ายบริเวณ tonsil ทั้งสองข้าง หรือบริเวณที่มีการอักเสบ 3. จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 29 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Lower respiratory tract					
1. - bronchoalveolar lavage - bronchial wash - tracheal aspirate	> 1 ml ภาชนะปราศจากเชื้อ	แพทย์เป็นผู้เก็บโดยใช้ sterile technique	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	
2. sputum	1. > 1 ml ภาชนะปราศจากเชื้อ 2. สำหรับ acid fast stain ใช้ภาชนะสะอาดแห้ง มีฝาปิดสนิท	ให้ผู้ป่วยบ้วนปากหลายครั้งด้วยน้ำสะอาด แล้วไอลึกๆ ขากเสมหะใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	- ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C - ไม่เกิน 3 วัน ที่ 4 ^{o}C สำหรับ acid fast stain	1. เสมหะที่ดีควรมี squamous epithelial cells เท่ากับหรือน้อยกว่า 10 ตัว/low power field 2. ควรเก็บเสมหะตอนเช้าหลังตื่นนอน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 30 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Eye					
1. conjunctiva	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	ใช้ sterile swab จุ่มน้ำเกลือหมาดๆ ป้ายที่ conjunctiva โดยหมุนไม้ swab ไปให้ทั่ว นำ swab จุ่มลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ควรทำการป้ายจากตาทั้งสองข้าง ทั้งข้างที่ปกติและเป็นโรค เพื่อใช้ผลของการเพาะเชื้อจากข้างปกติเป็น control (indigenous microflora)
2. cornea	-	1. ใช้ sterile swab จุ่มน้ำเกลือหมาดๆ ป้ายที่ cornea 2. นำ swab ป้ายลงบน CA และ BA	ส่งทันทีภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	-	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 31 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Ear					
1. inner	1. ภาชนะปราศจากเชื้อ 2. ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ล้างช่องหูให้สะอาด โดยใช้สบู่และน้ำ 2. ใช้เข็มและ syringe ดูดน้ำในช่องหูออกมาใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ 3. ในกรณีที่ ear drum แตก ให้เก็บโดยใช้ sterile swab ป้ายน้ำในช่องหู จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	
2. outer	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ใช้ sterile swab จุ่มน้ำเกลือหมาดๆ เช็ดรอบๆ ช่องหูเพื่อขจัดเศษเซลล์ต่างๆ ออก 2. แล้วใช้ swab อันใหม่ป้ายโดยกดให้แรงและหมุนให้ทั่วช่องหู (outer canal) 3. จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 32 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Feces	1. ≥ 2 กรัม/ภาชนะปราศจากเชื้อ	ถ่ายอุจจาระใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	ควรใช้ภาชนะปากกว้าง
	2. ภาชนะบรรจุ Carry Blair medium	1. ถ่ายอุจจาระลงในภาชนะที่แห้งและสะอาด ไม่ปนเปื้อนปัสสาวะ 2. ใช้ sterile swab ป้ายอุจจาระที่ถ่ายออกมา โดยเลือกป้ายบริเวณที่มีมูกหรือเลือดปน จุ่ม swab ลงใน Carry Blair medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน48 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	
Rectal swab	ภาชนะบรรจุ Carry Blair medium	1. ใช้ sterile swab สอดเข้าช่องทวารหนักให้ลึกประมาณ 1-2 นิ้ว 2. หมุน swab 2-3 รอบ 3. ดึงออกจุ่ม swab ลงใน Cary Blair medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 48 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 33 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Genital tract					
1. female					
1.1 vagina	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ทำความสะอาดบริเวณรอบๆ ช่องคลอด ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 2. เช็ดให้แห้งด้วยสำลี 3. ใช้ sterile swab สอดเข้าไปในช่องคลอด 4. ป้าย secretion หรือ discharge 5. จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง **ห้ามเก็บในตู้เย็น**	
1.2 urethra	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ทำความสะอาดบริเวณรอบๆ urethra 2. นวดรอบๆ urethra หัวเหน่าไปจนถึงช่องคลอด 3. ใช้ sterile swab ป้าย discharge ที่ไหลออกมา	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง **ห้ามเก็บในตู้เย็น**	ในกรณีที่ไม่มี discharge ให้ปฏิบัติดังนี้ 1. ทำความสะอาดรอบๆ urethra ด้วยสบู่และน้ำสะอาด 2. ใช้ sterile swab สอดเข้าไปใน urethra ลึกประมาณ 2-4 cm 3. หมุน swab ประมาณ 2 วินาที 4. ดึงออกแล้วจุ่ม swab ลงใน Stuart's medium

14-0992(001-354)editnew130158.indd 34 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Genital tract					
1. female					
1.3 cervix	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ใช้ speculum ในการตรวจ cervix โดยไม่ใช้สารหล่อลื่น 2. ใช้ sterile swab เช็ดพวก mucus และ secretion บริเวณ cervix แล้วทิ้งไป 3. ใช้ sterile swab อันใหม่ ป้ายบริเวณ endocervical canal 4. จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง **<u>ห้ามเก็บในตู้เย็น</u>**	
1.4 intrauterine devices	ภาชนะปราศจากเชื้อ	นำอุปกรณ์ทั้งหมดใส่ลงในภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	-	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 35 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Genital tract					
2. male					
2.1 prostate	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ทำความสะอาด prostate gland โดยใช้สบู่และน้ำ 2. นวด prostate gland ไล่ไปจนถึงทวารหนัก 3. ใช้ sterile swab ป้ายของเหลวที่ไหลออกมา แล้วจุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ถ้าเก็บปัสสาวะโดยเก็บทันทีก่อนและหลังนวด prostate gland จะให้ผลการเพาะเชื้อที่ดีกว่า
2.2 urethra	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ร่นหนังหุ้ม gland penis 2. ทำความสะอาดรอบๆ ด้วยสบู่และน้ำ แล้วเช็ดให้แห้ง 3. ใช้ sterile swab ขนาดเล็ก หรือใช้ sterile loop สอดเข้าไปในท่อปัสสาวะ หมุนเบาๆ และคาไว้ประมาณ 2 วินาที 4. นำ swab จุ่มลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง **ห้ามเก็บในตู้เย็น**	กรณีที่ใช้ sterile loop ให้ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงหรือจะป้ายลงบน slide เพื่อทำ smear ก็ได้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 36 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
Genital tract					
3. female or male lesion	ภาชนะบรรจุ Stuart's medium	1. ทำความสะอาดแผลโดยใช้ sterile saline 2. ใช้ใบมีดปราศจากเชื้อขูดที่ผิวบนของแผลทิ้งไป 3. ใช้ sterile swab กดซับเอา exudates ที่แผลออกมา จุ่ม swab ลงใน Stuart's medium	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 37 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 2-4 การเก็บสิ่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อรา

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
ผิวหนัง	แผ่น slide สะอาด ปราศจากไขมัน	1. ใช้ 70% alcohol เช็ด lesion บริเวณที่สงสัย 2. ใช้ใบมีดขูดผิวหนังบริเวณขอบของ lesion ใส่บน slide 3. ใช้ใบมีดเขี่ยผิวหนังที่ขูดได้ให้มารวมกันตรงกลาง slide 4. นำ slide อีกแผ่นปิดทับ แล้วใส่ซองกระดาษหรือซองพลาสติกหรือห่อด้วยกระดาษ	ภายใน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ Dermatophytes และไม่เกิน 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ Candida	
ผม	แผ่น slide สะอาด ปราศจากไขมัน หรือ petridish	1. ดึงผมจากบริเวณศีรษะรอบๆ lesion ใส่ลงบน slide หรือ petridish 2. นำ slide อีกแผ่นปิดทับ แล้วใส่ซองกระดาษหรือซองพลาสติกหรือห่อด้วยกระดาษ	ภายใน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง	

14-0992(001-354)edit new130158.indd 38 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
เล็บ	แผ่น slide สะอาด ปราศจากไขมัน	1. ขูดบริเวณรอยต่อระหว่างเล็บส่วนที่ดีกับส่วนที่เสียใส่ slide 2. ใช้ใบมีดเขี่ยเล็บที่ขูดได้ให้มารวมกันตรงกลาง slide 3. นำ slide อีกแผ่นปิดทับแล้วใส่ซองกระดาษหรือซองพลาสติกหรือห่อด้วยกระดาษ	ภายใน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง	
cornea	-	1. ใช้ sterile swab จุ่มน้ำเกลือหมาดๆ ป้ายที่ cornea 2. นำ swab ป้ายลงบน mycobiotic agar	ส่งทันทีภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	-	ถ้าต้องการทำ KOH preparation ด้วย ให้ทำ swab อีกอัน และป้าย swab ลงบน slide
CSF	1 ml ภาชนะปราศจากเชื้อ	เก็บโดยใช้ sterile technique	ส่งทันทีภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	-	
vaginal secretion	1 ml ภาชนะสะอาดที่มีน้ำเกลือ	swab จาก vagina ใส่ลงในน้ำเกลือ	ส่งทันทีภายใน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	-	1. ใช้ตรวจหาเชื้อราโดยทำ saline wet mount 2. กรณีที่ต้องการเพาะหาเชื้อราให้ทำ swab อีก 1 อัน ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อราโดยตรง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 39 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดสิ่งตรวจ/ตำแหน่งที่เก็บ	ปริมาณ/ภาชนะบรรจุ	วิธีเก็บ	เวลาและอุณหภูมิของ		ข้อแนะนำหรือข้อควรระวัง
			การนำส่ง	การเก็บรักษา	
tissue	≥ 1 cumm ภาชนะปราศจากเชื้อ	1. ทำ biopsy โดยตัดชิ้นเนื้อมาประมาณอย่างน้อย 1 cumm 2. ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 8 ชม. ที่ 4 ^{o}C	ควรหยด sterile saline ลงไปเพื่อป้องกันชิ้นเนื้อแห้ง
urine	10-15 ml ภาชนะปราศจากเชื้อ	เก็บโดยใช้วิธีสวนใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่ 4 ^{o}C	
blood	5-10 ml ขวด hemoculture สำหรับเพาะเชื้อรา	เหมือนกับการเจาะเก็บเพื่อเพาะเชื้อแบคทีเรีย	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	
bone marrow	ขวด hemoculture สำหรับเพาะเชื้อรา	แพทย์เป็นผู้เจาะโดยใช้ sterile technique	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ควรทำ smear ด้วยถ้าต้องการตรวจหา histoplasma หรือ *Penicillium marneffei*
body fluids - pleural, synovial - ascitis, bile - pericardial	10-15 ml ภาชนะปราศจากเชื้อ	แพทย์เป็นผู้เจาะโดยใช้ sterile technique	ภายใน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	ไม่เกิน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 40
1/14/58 BE 3:50 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Baron EJ, Thomson RB. Specimen Collection, Transport , and Processing : Bacteriology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.228-271.
2. Linscott AJ. Specimen Collection, Transport, and Acceptability. In : Garcia LS. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010. P 2.1.1-2.1.26.
3. Miller JM, Holms HT. Specimen Collection, Transport and Storage. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH editors. Manual of Clinical Microbiology 6th ed. Washington, DC: ASM Press; 1995. p. 33-63.
4. NCCLS. Quality control of Microbiological transports Systems; Approved standard. NCCLS document M40-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayene, Pennsylvania 19087-1898,USA 2003.
5. สุรางค์ เดชศิริเลิศ, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, กาญจนา คชินทร. แนวปฏิบัติ การเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อและการเพาะเชื้อก่อโรคจากเลือด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. หน้า 1-10.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 41 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 3
การวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากสิ่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

มาลัย วรจิตร
ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน

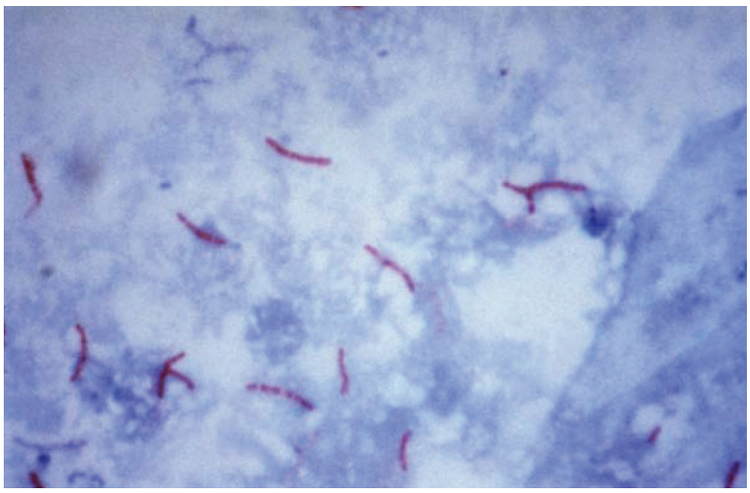
หลักการ

การตรวจสิ่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีการวินิจฉัยโรคติดเชื้ออย่างรวดเร็ว จัดเป็น point of care test การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์อาจดูสด หรือทำการย้อมสีต่างๆตามความเหมาะสม เช่น ย้อมแกรมเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรีย ย้อม acid fast bacilli (AFB) เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ย้อม modified acid fast bacilli เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *Nocardia* กับ *Rhodococcus* การใช้ india ink เพื่อดู yeast cells ที่มี capsule หนาๆ และการใช้ KOH ช่วยย่อย keratin จะช่วยให้เห็นเส้นใยเชื้อราได้ชัดขึ้น

การย้อมแกรมเมื่อย้อมแบคทีเรียด้วย crystal violet สีจะซึมเข้าภายในเซลล์ของแบคทีเรียและเมื่อย้อมทับด้วย gram iodine ซึ่งจะซึมเข้าภายในเซลล์ของแบคทีเรียเช่นกัน สี crystal violet และ iodine จะรวมกันเป็น crystal iodine complex ซึ่งมีโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นจึงไม่สามารถหลุดออกจากเซลล์ได้เมื่อล้างน้ำ แต่เมื่อล้างด้วย alcohol/acetone ซึ่งเป็นสารที่ละลายไขมันได้จึงไปล้างไขมันที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียที่มีไขมันที่ผนังเซลล์มากจะเกิดรูขนาดใหญ่ที่ผนังเซลล์ทำให้ crystal iodine complex หลุดออกจากเซลล์แบคทีเรียได้ จึงย้อมติดสี safranin เป็นสีแดงเรียกแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียที่มีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าขนาดของรูที่เกิดขึ้นเมื่อล้างด้วย alcohol/acetone ในลักษณะเดียวกันจะมีขนาดเล็กกว่า crystal iodine complex จึงไม่หลุดออกจากเซลล์และไม่ติดสี safranin จึงย้อมติดสีม่วงเรียกแบคทีเรียแกรมบวก การติดสีแกรมจะผิดพลาดได้ถ้าล้างด้วย alcohol/acetone มากหรือน้อยเกินไป

การย้อมแกรมเป็นวิธีการที่ใช้แยกแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โดยอาศัยรูปร่าง ขนาด ลักษณะเซลล์และการติดสีแกรม ใช้ในการวินิจฉัยสาเหตุการติดเชื้อเบื้องต้นอย่างรวดเร็วและช่วยในการประเมินคุณภาพของสิ่งตรวจ การย้อมแกรมเป็นวิธีที่ Christian Gram เป็นผู้คิดขึ้นในปี ค.ศ. 1884 วิธีที่ใช้ในปัจจุบันเป็นวิธีที่ Hucker ได้ปรับปรุงจากวิธีเดิมให้น้ำยามีความคงที่มากขึ้นและแยกเชื้อได้ดีกว่าเดิม (ปีค.ศ. 1921) นอกจากนี้ยังมีวิธีที่พัฒนาให้เหมาะสมกับการย้อมแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น anaerobic bacteria เชื้อ *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp. เป็นต้น การแปลผลการย้อมแกรมต้องคำนึงถึงการติดสี ขนาด รูปร่างของเซลล์และการเรียงตัว ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติเหล่านี้ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ การอบเชื้อ วิธีการย้อมสีและสารยับยั้งเชื้อที่มี ในการแปลผลการย้อมแกรมจากสิ่งตรวจนอกจากจะใช้คุณสมบัติดังกล่าวมาใช้ในการแปลผลยังต้องนำการตรวจพบเซลล์ชนิดต่างๆของร่างกายมาพิจารณาประกอบด้วย

AFB stain เชื้อมัยโคแบคทีเรียทนต่อการล้างด้วยสารละลายกรด + แอลกอฮอล์ เมื่อย้อมด้วย carbol fuchsin เนื่องจากมีส่วนประกอบไขมัน (mycolic acid) ที่ผนังเซลล์มาก การย้อมสี acid fast เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เร็วที่สุด สามารถใช้ในการดูผลการรักษาผู้ป่วยโดยเจือจาง sediments ที่ทดสอบความไวและย้อมหาเชื้อที่ติดสี acid fast ใน culture วิธี acid fast ที่ใช้กว้างขวางที่สุดคือวิธีของ Kinyoun และ fluorochrome วิธี fluorochrome เป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้ตรวจในสิ่งตรวจเพราะมีความไวสูงและทำได้รวดเร็ว เพราะสามารถตรวจดูด้วยกำลังขยายต่ำ เมื่อได้ผลบวกจึงทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี Kinyoun ในการย้อม AFB ต้องใช้สไลด์ใหม่และสะอาดเสมอ



ภาพที่ 3-1 การย้อมสี acid-fast ในการตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรีย

Modified acid fast stain เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาเชื้อ partially acid fast เช่น *Nocardia*, *Rhodococcus* เป็นต้น โดยเปลี่ยนสีล้างจากกรด HCl ในแอลกอฮอล์เป็น H_2SO_4 ในแอลกอฮอล์

India ink จะไม่ถูก absorbed โดยเซลล์หรือแคปซูลของยีสต์ เมื่อนำยีสต์ที่มีแคปซูลมาผสมกับ india ink จะเห็นแคปซูลเป็นสีใสวาวๆ รอบเซลล์ของยีสต์และมีพื้นหลังสีดำของ india ink สำหรับยีสต์ที่มีแคปซูลที่พบในสิ่งตรวจส่วนใหญ่เป็น *Cryptococcus neoformans* จึงใช้วิธีนี้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อ *C. neoformans* ในระบบประสาทส่วนกลาง

การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์โดยไม่คำนึงถึงว่าจะใช้สีย้อมใด โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์ของการตรวจ คือ เพื่อตรวจคุณภาพของสิ่งตรวจ ช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ เป็นแนวทางสำหรับแปลผลการเพาะเชื้อ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ว่าควรทำการทดสอบใดเพิ่มเติม และใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 44 1/14/58 BE 3:50 PM

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อโดยการตรวจสิ่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

เป็นการดำเนินการในขั้นแรกเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อนับว่าเป็นสิ่งสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อรา เชื้อเจริญเติบโตช้าบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ควรรายงานผลเบื้องต้นให้แพทย์ทราบก่อน แพทย์อาจจะใช้ข้อมูลในขั้นตอนนี้เตรียมทำการรักษาผู้ป่วยได้ การวินิจฉัยโรคติดเชื้อราจากสิ่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ การตรวจสดในสารละลาย 10-30% potassium hydroxide การตรวจสดใน india ink preparation การย้อมแกรม การย้อมสี modified acid-fast และวิธีย้อมสีพิเศษต่างๆ

วิธีการที่ใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อราจากสิ่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขึ้นกับชนิดของสิ่งตรวจ และชนิดของโรคที่สงสัย สิ่งตรวจส่วนมากจะทำการตรวจสดในสารละลาย potassium hydroxide สิ่งตรวจที่เหมาะสมกับการตรวจวิธีนี้ ได้แก่ ผิวหนัง ผม เล็บ และมิวคัสเมมเบรนที่สงสัยโรคเกลื้อน (tinea versicolor) โรคกลาก (dermatophytosis) และ candidiasis นอกจากนี้ยังเหมาะสมกับการตรวจหา dematiaceous fungi ในสะเก็ดแผลแห้งที่ผิวหนังที่สงสัยโรคติดเชื้อราที่มีสาเหตุจากราดำ (chromomycosis) สารละลายผสม potassium hydroxide และ dimethyl sulfoxide เหมาะกับการตรวจสด สิ่งตรวจเล็บ สิ่งตรวจหนองจากแผลหรือชิ้นเนื้อจากแผลที่สงสัยโรค eumycotic mycetoma สารละลายผสมนี้จะย่อย keratin ได้ดี ไม่ต้องลนไฟ นำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ทันที

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมแกรมสิ่งตรวจผู้ป่วย

สิ่งตรวจผู้ป่วยที่เก็บมาใหม่ๆจะได้ผลถูกต้องที่สุด

วิธีปฏิบัติงาน

1. สีย้อม Hucker's modification

1.1 stock crystal violet ประกอบด้วย

crystal violet	20	g
ethanol 95%	200	ml

1.2 stock oxalate solution ประกอบด้วย

ammonium oxalate	8	g
น้ำกลั่น	800	ml

ผสมสารละลาย 1.1 และ 1.2 เข้าด้วยกัน ตั้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนกรองและนำไปใช้เป็น working solution

1.3 Gram iodine solution ประกอบด้วย

iodine crystals	1	g
potassium iodide	2	ml
น้ำกลั่น	240	ml

14-0992(001-354)editnew130158.indd 45 1/14/58 BE 3:50 PM

บด iodine และ potassium iodide ในโกร่ง เติมน้ำ 2 - 3 ml บดจนละลายหมดแล้ว เติมน้ำกลั่นจนครบ 240 ml แล้วเติม sodium bicarbonate 5% aqueous solution 60 ml (sodium bicarbonate 3 g ในน้ำกลั่น 60 ml) ผสมให้เข้ากัน และเก็บในขวดสีน้ำตาล

ข้อควรระวัง iodine เป็นสารกัดกร่อน (corrosive) จึงต้องระวังไม่หายใจเข้าไป ห้ามรับประทานหรือถูกกับผิวหนัง

1.4 decolorizer ที่ล้างได้ช้าคือ ethanol 95% ที่ล้างได้ปานกลางคือ สารผสมของ acetone-alcohol (ethanol 95% : reagent grade acetone = 1:1) สารที่ล้างได้เร็วที่สุดคือ acetone (reagent grade)

ข้อควรระวัง ethanol และ acetone เป็นสารไวไฟ

decolorizer ที่ใช้ในการย้อมแกรมแบบรวดเร็วคือ acetone-iodine solution ประกอบด้วย

strong iodine solution

iodine	10	g
potassium iodide	6	g
น้ำกลั่น	10	ml

บด iodine, potassium iodide ในน้ำกลั่นให้ละลายแล้วเติม 10% ethanol ให้ครบ 100 ml ผสมให้เข้ากัน

working solution :

strong iodine solution	3.5	ml
acetone	96.5	ml

1.5 counterstain ประกอบด้วย

stock solution :

safranin O	2.5	ml
ethanol 95%	100	ml

working solution :

stock solution	10	ml
น้ำกลั่น	100	ml

2. การเตรียมตัวอย่าง

การ smear ที่ดีควรได้เป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) ของเชื้อและเซลล์ มีการกระจายสม่ำเสมอและสามารถดูลักษณะการเรียงตัวของเชื้อได้ชัดเจน ควรใช้สไลด์ที่สะอาด ปราศจากไข การย้อมจากสิ่งตรวจที่ต้องทำการเพาะเชื้อด้วย ถ้าใช้ไปเปตหรือไม้พันสำลี (swab) อันเดียวกันต้องทำการเพาะเชื้อก่อนเสมอ การ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 46 1/14/58 BE 3:50 PM

ทำ smear สิ่งตรวจผู้ป่วยต้องสวมถุงมือและเครื่องป้องกันอื่นที่เหมาะสมตามหลักของ universal precaution

2.1 สิ่งตรวจที่เป็น swab ควรแยก swab สำหรับเพาะเชื้อและย้อมแกรม ให้หมุน swab ไปตามยาวของสไลด์ ไม่ต้องกดแรงๆเพราะจะทำให้เซลล์แตกและการเรียงตัวของเชื้อเสียไป ในกรณีที่ได้รับ swab เพียงอันเดียว ให้ใส่ swab ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อเล็กน้อย แล้วนำไป vortex บิด swab กับผนังด้านในหลอด และนำไป smear บนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ ส่วนที่เหลือในหลอดใช้ในการเพาะเชื้อ

2.2 สิ่งตรวจที่ไม่ได้เป็น swab เช่น หนอง เสมหะ อุจจาระ ถ้าเป็นหนองที่เจาะใส่ syringe มา ให้ถ่ายหนองทั้งหมดลงในหลอดปราศจากเชื้อ vortex สิ่งตรวจให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ ไม่รับสิ่งตรวจที่อยู่ใน syringe ที่มีเข็มติดมาด้วย ควรให้ปลดเข็มออกจาก syringe ก่อนส่งสิ่งตรวจ ใช้ swab ไปเปตหรือ loop ปราศจากเชื้อเขี่ยส่วนของสิ่งตรวจที่มีหนองหรือเลือด ถ้าสิ่งตรวจเหนียวมากอาจหยดน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 1 หยดบนสไลด์เพื่อเจือจางจะทำให้ smear ได้ง่ายขึ้น เกลี่ยสิ่งตรวจให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ปล่อยให้แห้งในอากาศ

2.3 น้ำไขสันหลัง และสิ่งคัดหลั่งอื่นๆ การใช้เครื่อง cytospin slide centrifuge จะช่วย concentrate สิ่งคัดหลั่งที่ smear ซึ่งจะช่วยเพิ่มความไวของการย้อมแกรมและลดเวลาที่ใช้ในการปั่น ให้หาบริเวณที่มีสิ่งตรวจได้ง่ายขึ้น ในกรณีที่ไม่ได้ใช้เครื่อง cytospin slide centrifuge ให้ปั่นน้ำไขสันหลัง/สิ่งคัดหลั่งด้วย centrifuge ใช้ไปเปตปราศจากเชื้อดูดส่วนข้างบนออก ให้เหลือประมาณ 0.5 ml แล้ว vortex เพื่อให้ตะกอนแตกออก จากนั้นใช้ไปเปตปราศจากเชื้อดูดมาหยดบนสไลด์สะอาดปราศจากไข 1 หยด **ไม่ต้องเกลี่ยสิ่งตรวจให้กระจาย** ปล่อยให้แห้งในอากาศ

ภาพที่ 3-2 เครื่อง cytospin slide centrifuge

14-0992(001-354)editnew130158.indd 47 1/14/58 BE 3:50 PM

2.4 ปัสสาวะที่จะย้อมแกรม ห้ามปั่น เขย่าขวดให้ปัสสาวะกับตะกอนเข้ากันดี ใช้ไปเปตปราศจากเชื้อดูดปัสสาวะมาหยดลงบนสไลด์สะอาดปราศจาก **ไม่ต้องเกลี่ยให้กระจาย** ปล่อยให้แห้งในอากาศ

2.5 สิ่งตรวจที่แห้งหรือสิ่งตรวจที่มีขนาดเล็กมาก ให้ละลายสิ่งตรวจในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.5 ml ใช้ไปเปตปราศจากเชื้อดูดมาหยดบนสไลด์สะอาดปราศจากไข 1 หยด ใช้ปลายไปเปตเกลี่ยสิ่งตรวจให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ปล่อยให้แห้งในอากาศ

2.6 ชิ้นเนื้อ (biopsy) อาจทำแบบ touch หรือ ground specimen preparation ก็ได้ โดยใช้กรรไกรหรือใบมีดที่ปราศจากเชื้อตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใช้ forceps หยิบชิ้นเนื้อมากดบนสไลด์สะอาดปราศจากไข ให้ทำหลายๆครั้งโดยให้อยู่ใกล้ๆกันเพื่อจะได้อ่านสไลด์ได้ง่ายหรือบดชิ้นเนื้อให้ละเอียด ใช้ไปเปตปราศจากเชื้อดูดมาหยดบนสไลด์สะอาดปราศจากไข 1 หยด ใช้ปลายไปเปตเกลี่ยสิ่งตรวจให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 cm ปล่อยให้แห้งในอากาศ

3. การ fix smear (อาจใช้ความร้อนหรือ methanol ก็ได้)

3.1 การใช้ความร้อน นำสไลด์มาวางบน electric slide warmer 60 ^{O}C จนแห้งหรือผ่านสไลด์ที่แห้งในเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หรือเอาสไลด์มาอังไว้หน้า เครื่องเผา loop 5 ถึง 10 วินาที อย่าใช้ความร้อนมากไปหรือ fix สไลด์ขณะที่ยังไม่แห้ง และปล่อยให้สไลด์เย็นก่อนนำไปย้อมสี

3.2 การใช้ methanol จะช่วยป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดแดงและเซลล์อื่นๆของร่างกายแตก และทำให้มีพื้นหลัง (background) ที่ดูสะอาด การ fix ด้วย methanol เป็นวิธีที่ใช้ได้ดีกับสิ่งตรวจผู้ป่วยโดยเฉพาะปัสสาวะเพราะจะช่วยป้องกันไม่ให้หลุด วิธีทำปล่อยให้สไลด์ที่ smear แห้งในอากาศ แล้วหยด methanol 2-3 หยดบนสไลด์ ปล่อยไว้นาน 1 นาที **เท methanol ออกโดยไม่ต้องล้างน้ำ** ปล่อยให้สไลด์แห้ง ไม่ต้องใช้ความร้อน

4. วิธีการย้อมสี

4.1 หยด working crystal violet solution ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วล้างน้ำสะอาด

4.2 หยด Gram iodine บน slide ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วล้างน้ำสะอาด

4.3 Decolorize ด้วย acetone iodine แล้วล้างน้ำสะอาดทันที

4.4 ย้อมทับด้วย Safranin 30 วินาที ล้างน้ำสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจด้วยกำลังขยาย 10 x 10 เท่า จากนั้นดูรายละเอียดด้วยกำลังขยาย 10 x 100 เท่า

14-0992(001-354)editnew130158.indd 48 1/14/58 BE 3:50 PM

การรายงานผลและแปลผลการย้อมแกรมสิ่งตรวจต่างๆ

1. ผลและการแปลผล ให้ดูคุณภาพทั่วๆไปก่อนด้วยกำลังขยาย 10 x 10 เท่าโดยดูว่า decolorized ดีหรือไม่ ถ้าย้อมได้ดีพื้นหลังต้องสะอาด ถ้ามีเม็ดเลือดขาวต้องย้อมติดสีแกรมลบ ระวังไม่อ่านตะกอนสีเป็นเชื้อแบคทีเรีย ดูความหนาของ smear ว่าเซลล์ไม่ทับซ้อนกันและจะไม่ทำให้แปลผลผิด
2. การตรวจดูด้วยกำลังขยาย 10 X 10 เพื่อดูว่ามีการอักเสบหรือไม่ โดยดู
   - จำนวนของ PMNs, mononuclear cells
   - จำนวนของ squamous epithelial cells แบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่น
   - ตำแหน่งและการเรียงตัวของแบคทีเรีย
3. ตรวจด้วยกำลังขยาย 10 x 100 โดยดูหลายๆ fields เพื่อดูว่ามีเชื้อหรือไม่
   - ถ้าไม่เห็นเชื้อให้รายงานว่า “No organism seen”
   - ถ้าพบเชื้อให้รายงานคร่าวๆ และบอกลักษณะของเชื้อที่พบ ในกรณีที่แบคทีเรีย ติดสีม่วง อ่านผลเป็นแกรมบวก ในกรณีที่แบคทีเรียติดสีแดงอ่านผลเป็นแกรมลบ บอกรูปร่างลักษณะ เช่น cocci, bacilli หรือ coccobacilli และการเรียงตัว เช่น เป็น chain หรือ clusters เป็นต้น
4. ดูรูปร่างของแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่
   - รูปร่างโดยรวมเป็น coccus, coccoid, coccobacilli, bacilli, fragment, yeast-like
   - ลักษณะปลายเซลล์ กลม แบน ป่องออก เว้าเข้า การบวมออกข้างๆแสดงว่าอาจมีสปอร์แต่อาจเกิดจาก vacuole ก็ได้ มีรูปร่างไม่แน่นอน หรือติดสีไม่แน่นอนเป็นต้น
   - ลักษณะด้านข้าง เป็นลักษณะขนาน ทรงรี เว้า หรือไม่แน่นอน
   - รูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphism) ซึ่งอาจใช้คำว่า diphtheroid หรือ coryneform ในการบรรยายลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งที่มีรูปร่างไม่แน่นอน หรือติดสีไม่สม่ำเสมอ เรียงตัวเป็นซี่รั้ว(palisade) หรือเป็นมุม(V และ L shape)
5. การรายงานผล ควรรายงานให้ผู้ที่อ่านรายงานเกิดความสนใจ หรือถ้าผลที่ได้มีความสำคัญควรรายงานให้แพทย์ทราบทางโทรศัพท์
   - การรายงานผลจากสิ่งตรวจผู้ป่วย ปัสสาวะให้ตรวจอย่างน้อย 20 fields ให้รายงานผลว่าพบเชื้อเมื่อเห็นเชื้อเฉลี่ย 1 เซลล์หรือมากกว่า per oil immersion field ซึ่งแสดงว่ามีเชื้อ $\geq 10^5$ CFU/ml
   - รายงานจำนวนเชื้อที่พบคร่าวๆ โดยรายงานเป็นตัวเลข (numerical) หรือบรรยายว่ามากน้อย (descriptive) ก็ได้โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

     5.1 การรายงานเป็นตัวเลข

     1+ (<1 per oil immersion field)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 49 1/14/58 BE 3:50 PM

2+ (1 per oil immersion field)

3+ (2 ถึง 10 per oil immersion field)

4+ (predominant หรือ >10 per oil immersion field)

5.2 การบรรยายว่ามากหรือน้อย

rare (< 1 per oil immersion field)

few (1 ถึง 5 per oil immersion field)

moderate (5 ถึง 10 per oil immersion field)

many (>10 per oil immersion field)

6. การตรวจสอบการย้อมแกรม หลังจากรายงานผลแล้วให้เก็บสไลด์ไว้นานพอที่จะนำกลับมาดูใหม่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ผลการเพาะเชื้อหรือผลการทดสอบอื่นๆไม่ไปด้วยกัน การเก็บสไลด์ให้ทำดังนี้

- ซับ oil ออก ในกรณีที่ต้องการเก็บเป็นสไลด์ที่ใช้ในการสอน อาจใช้ xylene ล้าง oil ออก และปิดสไลด์ด้วย permount และ cover slip เพื่อป้องกันไม่ให้สีซีด สไลด์ที่ไม่ใช้แล้วให้ทิ้งเป็นมูลฝอยติดเชื้อและมีคม
- ถ้าเห็นว่าควรจะทำการย้อมสีอื่น เมื่อดูผลการย้อมแกรมแล้วแต่ไม่มีสิ่งตรวจที่จะนำมาย้อมได้ อาจทำการย้อมสไลด์ที่ทำการย้อมแกรมแล้วนี้ได้ โดยล้าง oil ออกด้วย xylene ล้างสไลด์ด้วย acetone-alcohol จนไม่มีสี แล้วดำเนินการย้อมสีใหม่

การควบคุมคุณภาพ

1. ตรวจดูสีที่ใช้ย้อมทุกวันว่าไม่มีตะกอนสี ถ้ามีควรกรองก่อนใช้ การระเหยจะมีผลต่อคุณภาพของสีที่ใช้จึงไม่ควรเทสีใส่ขวดครั้งละมากๆ

2. ทำการย้อมเชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 หรือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ทุกวันและทุกครั้งที่เปลี่ยนสีใหม่ ผลที่ควรได้คือ *Escherichia coli* เป็นแกรมลบรูปแท่ง

Staphylococcus epidermidis เป็นแกรมบวกรูปกลม

Staphylococcus aureus เป็นแกรมบวกรูปกลม

หรืออาจใช้สิ่งที่ขูดมาจากซอกฟันมาย้อมเพื่อควบคุมคุณภาพก็ได้เพราะจะได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

3. ปัจจัยที่ทำให้ผลการย้อมแกรมไม่ดี

ก. ใช้สไลด์ที่ไม่ได้ทำความสะอาดก่อน การแช่สไลด์ใน 95% ethanol จะทำให้สไลด์สะอาดปราศจากไข เวลาใช้ให้หยิบสไลด์มาเช็ดหรือลนไฟก่อน

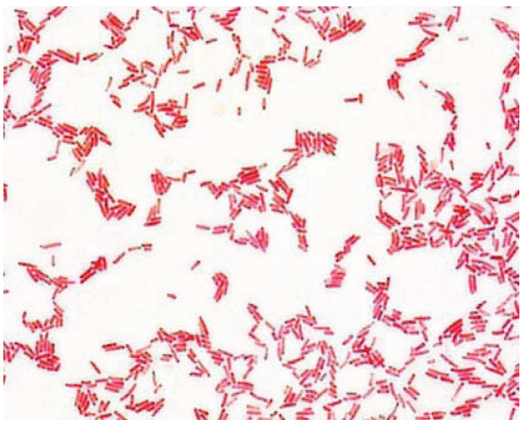
ข. smear หนาเกินไป

14-0992(001-354)editnew130158.indd 50 1/14/58 BE 3:50 PM

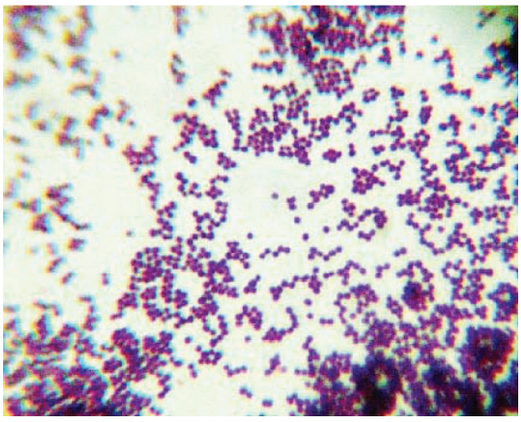
ค. ใช้ความร้อนมากไปขณะที่ fix สไลด์

ง. ล้างน้ำมากเกินไปขณะที่ย้อมสี

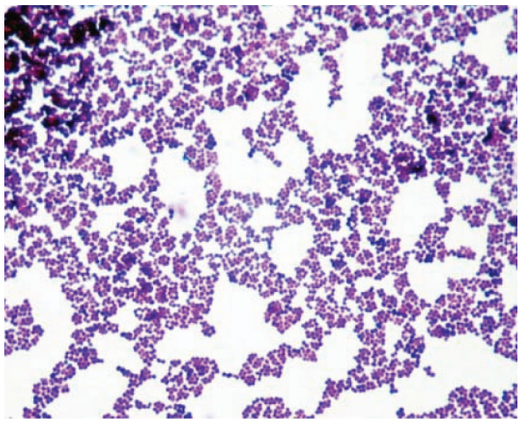
จ. เพื่อควบคุมคุณภาพของการย้อมแกรมจึงควรมีระบบการตรวจสอบการรายงานผลการย้อมแกรม โดยหัวหน้าห้องปฏิบัติการทำการสุ่มสไลด์ที่รายงานแล้วมาตรวจซ้ำ หรือเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับผลการย้อมแกรมที่รายงานว่ามีความขัดแย้งกันหรือไม่ และควรจัดเก็บตัวอย่างสไลด์ที่สวยๆไว้เพื่อใช้ในการสอน



Escherichia coli



Staphylococcus epidermidis



Staphylococcus aureus

ภาพที่ 3-3 ลักษณะการติดสีและการเรียงตัวของเชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพการย้อมแกรม

14-0992(001-354)editnew130158.indd 51 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 3-1 ลักษณะของเชื้อที่พบในสิ่งตรวจต่างๆและการรายงานผล

ก. แบคทีเรียแกรมบวกที่พบในสิ่งตรวจผู้ป่วย

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Actinomyces spp.	Thin, beaded, branched gram-positive filaments; may be within sulfur granules with peripheral clubs	Cervicofacial, ทรวงอก ช่องท้องและอุ้งเชิงกราน น้ำจากปอดหรือน้ำล้างปอด	ถ้ามี sulfur granules ล้างและบดบนสไลด์และย้อม modified AFB stain
Nocardia spp.	Long, thin, branching, beaded, gram-positive or irregularly staining bacilli	เสมหะ น้ำล้างปอด ชิ้นเนื้อ หนอง เลือด และน้ำไขสันหลัง	ย้อม modified AFB stain การเพาะเชื้อที่ 45 ^{O}C จะช่วยให้เชื้อเจริญได้เร็วขึ้น
Mycobacterium spp.	Gram-positive beaded or gram-neutral bacilli; found inside macrophage; bacilli may be short to long, banded or beaded, and/or slightly curved; some species appear pleomorphic and coccoid	ทางเดินหายใจ ปัสสาวะ ชิ้นเนื้อ น้ำไขสันหลัง	ย้อม AFB stain
Corynebacterium spp. *C. jeikeium*	Gram-positive pleomorphic, club-shaped, irregularly staining bacilli or coccobacilli with palisading and/or angular arrangements Small coccobacilli resembling streptococci	เลือด ชิ้นเนื้อ แผลที่ผิวหนัง indwelling catheters ลิ้นหัวใจเทียม ทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง	หากสงสัยว่าติดเชื้อ *C. diphtheriae* ในการเพาะเชื้อให้เพิ่มอาหารพิเศษ
Propionibacterium spp.	Gram-positive, very pleomorphic “diphtheroid” forms that may branch	เลือด น้ำไขสันหลัง สิ่งคัดหลั่งอื่นๆ แผลจากผิวหนัง	การหา propionic acid โดย GLC มักพบเป็นเชื้อปนเปื้อนจากผิวหนังในขณะเก็บสิ่งตรวจ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 52 1/14/58 BE 3:50 PM

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Listeria monocytogenes	Gram-positive small to medium coccobacilli that may be pleomorphic; occur in short chains or palisades; อาจสับสนกับเชื้อ *Corynebacterium* หรือ enterococci	น้ำไขสันหลัง เลือด น้ำคร่ำ รก ชิ้นเนื้อจาก fetal	ดู wet mount จากสิ่งตรวจโดยตรงเพื่อดู tumbling motility; ถ้ามีเชื้อหลายชนิดปนกัน การใช้วิธี cold enrichment อาจช่วยให้แยกเชื้อนี้ได้
Erysipelothrix rhusiopathiae	ในชิ้นเนื้อรายงานเป็น long, slender, gram-positive bacilli ในเลือดรายงานเป็น small "coryneforms"	ชิ้นเนื้อจากผิวหนัง เลือด	เกี่ยวข้องกับอาชีพที่สัมผัสสัตว์
Lactobacillus spp.	Medium, straight, uniform gram-positive bacilli with rounded ends; may form chains or spirals; sometimes short and coccobacillary	มักพบเป็น mixed infection ไม่ค่อยพบจากเลือดหรือน้ำไขสันหลัง	การเพาะเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจนจะช่วยให้เชื้อเจริญได้ดียิ่งขึ้น
Bacillus spp.	Medium to large square-ended gram-positive bacilli with parallel sides with or without spores; some species have spores that swell sides; may stain gram variable or gram negative with age	อาจพบในสิ่งตรวจหลายชนิด ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่ฉีดยาเสพติด และพบเป็นสาเหตุการติดเชื้อที่ตา	มักพบปนเปื้อนในการเพาะเชื้อ อาจพบเป็นสาเหตุการติดเชื้อที่ตา
Clostridium perfringens	Gram-positive large "boxcars" with no spore; may stain gram-negative	เลือด แผล หนองจากช่องท้อง	ทำการเพาะเชื้อบน EY และอบในภาวะที่ไร้ O_2 การไม่พบ PMNs อาจใช้เป็นเครื่อง บ่งชี้ว่าเป็น clostridial myonecrosis; เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 53 1/14/58 BE 3:50 PM

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Clostridium spp.	Gram-positive, gram-variable, or gram-negative bacilli, with or without spores; bacilli may be large, slender and short, or long; sometimes form coils; often small than *Bacillus* spp.	เลือด แผลในช่องท้อง ฝี	เป็นเชื้อประจำถิ่นของทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์
Streptococcus pneumoniae	Gram-positive cocci in pairs, lancet shapes, short chains	ทางเดินหายใจส่วนล่าง เลือด น้ำไขสันหลัง สารคัดหลั่งอื่นๆ	อาจใช้ Quellung test หรือการตรวจหา antigen ในสิ่งตรวจบางชนิด
Enterococcus spp.	Gram-positive cocci in pairs, short chains; อาจมีลักษณะที่คล้ายกับ *S. pneumoniae*	ปัสสาวะ แผลติดเชื้อ เลือด ฝีในช่องท้อง	เชื้อประจำถิ่นของทางเดินอาหาร พบเป็นสาเหตุการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย expanded-spectrum cephalosporins
Streptococcus viridans	Gram-positive cocci in pairs tetrads, clusters	เลือด น้ำไขสันหลัง	อาจแยกได้ยากกับ *Corynebacterium* และ lactobacilli อาจใช้ antigen detection สำหรับ *Streptococcus* group A และ B การพบ *S. bovis* ในเลือดมีความสัมพันธ์กับมะเร็งของ colon (ลำไส้) การเพาะเชื้อ nutritionally variant streptococci อาจเพาะบน BA และทำ cross streak ด้วย *S. aureus*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 54 1/14/58 BE 3:50 PM

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Staphylococcus spp.	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	ฝี แผลติดเชื้อ ทางเดินหายใจ ชิ้นเนื้อ สารคัดหลั่งต่างๆ indwelling catheters	เชื้อประจำถิ่นของผิวหนังและโพรงจมูก
Stomatococcus mucilaginosus	Large gram-positive cocci in pairs, tetrad	เลือด (ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง) peritoneal dialysates	เชื้อประจำถิ่นในช่องปาก

ข. แบคทีเรียแกรมลบที่พบในสิ่งตรวจผู้ป่วย

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Enterobacteriaceae	Straight thick bacilli; short to medium length with rounded ends; antimicrobial-agent-affected microorganisms may be pleomorphic, filamentous, and/or irregular staining	ทางเดินปัสสาวะ แหล่งอื่นๆ	เชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล มักดื้อสารต้านจุลชีพหลายชนิด
Haemophilus spp., *Pasteurella* spp., fastidious gram-negative bacilli	Small coccoid to bacillary forms; pleomorphic; often with filamentous forms อาจติดสีซีด	เลือด น้ำไขสันหลัง ทางเดินหายใจส่วนล่าง ฝี แผลติดเชื้อ ตา ระบบสืบพันธุ์	อาจใช้วิธี direct antigen detection เพื่อหา *Haemophilus* type b จากสิ่งตรวจผู้ป่วยโดยตรง
Legionella spp.	Pleomorphic slender bacilli of variable lengths that may stain pale ในสิ่งตรวจผู้ป่วยเชื้ออาจย้อมสีไม่ติด	ทางเดินหายใจส่วนล่าง	ในการเพาะเชื้อต้องใช้อาหารพิเศษ การย้อมจากสิ่งตรวจที่มีเชื้อหลายชนิดอาจใช้ Gimenez stain จะพบเชื้อได้ดีขึ้น
Vibrio spp.	Slightly curved to straight bacilli	อุจจาระ แผลติดเชื้อ	ถ้ามีเชื้อหลายชนิดปนกัน การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเช่น TCBS จะแยกเชื้อได้ดีขึ้น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 55 1/14/58 BE 3:50 PM

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Pseudomonas spp.	Thin bacilli; medium length to long with rounded to pointy ends; often in pairs; antimicrobial-agent-affected microorganisms may appear filamentous, coiled, and/or pleomorphic	ปัสสาวะ ทางเดินหายใจส่วนล่าง แผลติดเชื้อ ตา แหล่งอื่นๆในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง	ถ้าเป็น mixed infection ใช้อาหารจำเพาะสำหรับเชื้อนี้ เชื้อที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อในโรงพยาบาลมักดื้อสารต้านจุลชีพหลายชนิด
Fusobacterium nucleatum, *Capnocytophaga* spp.	Long slender bacilli, with tapered to pointed ends; "needle-like"; may be in pairs, end to end, or filamentous	ทางเดินหายใจ แผลติดเชื้อ เลือด ฝี	เป็นเชื้อที่อยู่ในร่างกาย
Fusobacterium necrophorum, *F. mortiferum*, or *F. varium*	Highly pleomorphic bacilli with rounded to tapered ends; pale and irregularly staining, with bizarre forms and round bodies	แผล เลือด ฝี	เป็นเชื้อที่อยู่ในร่างกาย
Bacteroides spp.	Pleomorphic straight bacilli with possible irregular to bipolar staining	แผล เลือด ฝี	อาจใช้วิธี direct fluores-cent-antibody stain เป็นเชื้อที่อยู่ในร่างกาย
Neisseria spp., *Moraxella catarrhalis*, *Veillonella* spp.	Medium to large cocci in pairs and tetrads, coffee bean shaped; no bacilli seen	ระบบสืบพันธุ์ ปัสสาวะ ทางเดินหายใจส่วนล่าง เลือด สารคัดหลั่ง แผลติดเชื้อ ฝี	การหา *N. meningitidis* บาง serotype อาจใช้วิธี direct antigen detection ได้ ใช้ selective medium ในการเพาะเชื้อที่อยู่ปนกันหลายชนิด
Campylobacter spp. *Helicobacter* spp.	Thin, curved bacilli included S shapes, gull wings, long spiral forms	อุจจาระ เลือด ชิ้นเนื้อจากกระเพาะ	การเพาะเชื้อในภาวะที่มี CO_2 เพิ่มขึ้น และการใช้ 42 ^{o}C จะแยกเชื้อได้ดีขึ้น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 56 1/14/58 BE 3:50 PM

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Acinetobacter spp.	Medium to large cocci in pairs; occasionally coccoid, bacillary, and filamentous forms ติดสีค่อนไปทางแกรมบวก	ปัสสาวะ ทางเดินหายใจส่วนล่าง เลือด สารคัดหลั่ง แผลติดเชื้อ ฝี ชิ้นเนื้อ อุจจาระ แหล่งอื่นในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง	

ค. จุลชีพอื่นๆที่ตรวจได้จากการทำ direct smears สิ่งตรวจผู้ป่วย

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Pneumocystis carinii	Gram-negative spherical cysts (5-7 μm) often containing rosette of eight gram-negative intracystic bodies; or cluster of gram-negative cysts surrounded by halos in background of amorphous gram-negative material	ปอด และ transtracheal biopsies, bronchial washings and lavage sputum	ยืนยันด้วยการย้อมสี Grocott metenamine-silver, toluidine blue O, Gram-Weigert, หรือการย้อม fluorescent stain
Candida spp.	Gram-positive budding yeast cell with or without pseudohyphae; may appear stippled or gram neutral	เสมหะ ปัสสาวะ เลือด ชิ้นเนื้อ สิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอด ทางเดินหายใจส่วนบน	เป็นเชื้อที่อยู่ในร่างกาย
Cryptococcus neoformans	Partially or completely gram-positive round yeast cell with clear or red-orange halo; yeast cells may appear stippled or gram neutral	น้ำไขสันหลัง เลือด ชิ้นเนื้อ เสมหะ bronchial washings แผลที่ผิวหนัง	ยืนยันโดยการทำ india ink; direct antigen detection กับสิ่งตรวจโดยตรง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 57 1/14/58 BE 3:50 PM

เชื้อ	การรายงานผล	สิ่งตรวจ	ข้อเสนอแนะ
Blastomyces dermatitidis	Gram-variable, broad-based, thick-walled yeast cell with figure-eight appearance	Bronchial washings, เสมหะ หนอง แผลที่ผิวหนัง	
Malassezia furfur	Bottle-shaped yeast cells in compact clusters, usually with short hyphal elements	ขูดจากผิวหนัง เลือดที่เจาะผ่าน catheter lines	เพาะในอาหาร lipid-riched medium

ข้อจำกัดของการย้อมแกรมเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

1. ควรใช้ผลการตรวจร่างกายและผลการตรวจอื่นๆเพื่อช่วยสนับสนุนสิ่งที่ได้จากการย้อมแกรม
2. ผลการทดสอบจะถูกต้องมากน้อยเพียงใดขึ้นกับความแม่นยำในการทดสอบ และประสบการณ์ของผู้ที่ทำการทดสอบและอ่านผล
3. ควรทำการย้อมวิธีอื่นร่วมด้วยในกรณีที่สิ่งตรวจเห็นเป็นหนองแต่ย้อมแกรมแล้วไม่พบเชื้อ
4. สิ่งตรวจที่ย้อมแกรมแล้วพบเชื้อแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้น อาจเนื่องจากมีเชื้อปนเปื้อนในน้ำยาที่ใช้ มีสารต้านจุลชีพในสิ่งตรวจ หรือวิธีการเพาะเชื้อที่ใช้ไม่เหมาะสม เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ บรรยากาศที่ใช้ในการเพาะเชื้อ เป็นต้น
5. สิ่งตรวจน้อยเกินไปอาจทำให้ผลการย้อมแกรมไม่ถูกต้อง

ข้อจำกัดของการย้อมแกรม

1. ผลการย้อมแกรมควรใช้ร่วมกับผลการทดสอบอื่น เช่น การย้อมพิเศษ การเพาะเชื้อ การหา antigen
2. ทำการทดสอบอย่างถูกต้องและทำตามข้อกำหนดของการแปลผลเพื่อให้ผลที่ได้ถูกต้อง
3. ทำการย้อมสีอื่นๆเพิ่มเติมในกรณีที่ไม่พบเชื้อจากการย้อมแกรม
4. การพบเชื้อจากการย้อมแกรมแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้นอาจเกิดจากมีการปนเปื้อนเชื้อในสีย้อม หรือเชื้อไม่สามารถขึ้นบนอาหารและบรรยากาศที่ใช้ในการเพาะเชื้อ
5. ผลการย้อมแกรมที่ผิดพลาดอาจเกิดจากการเก็บสิ่งตรวจมาน้อยเกินไป

การวินิจฉัยการติดเชื้อราโดยการตรวจสดในสารละลาย potassium hydroxide

การตรวจสดในสารละลาย potassium hydroxide ไม่เหมาะกับการตรวจหา histoplasma yeast cells เนื่องจากเชื้อมีขนาดเล็กดูได้ยาก ดังนั้นถ้าแพทย์สงสัยโรค histoplasmosis ให้ตรวจสิ่งตรวจโดยการย้อม

14-0992(001-354)editnew130158.indd 58 1/14/58 BE 3:50 PM

แกรมหรือย้อมสี Giemsa หรือย้อมสี Wright ถ้ามีสีย้อมทั้ง 2 ชนิดนี้พร้อมใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่สงสัย cryptococcosis ในสิ่งตรวจน้ำไขสันหลัง ให้ทำการตรวจสดใน india ink การย้อมแกรมมีประโยชน์ในการตรวจหาแกรมบวก aerobic actinomycetes แกรมบวกยีสต์ในสกุล *Candida* และยังช่วยให้เห็นการปนเปื้อนของแบคทีเรียในสิ่งตรวจได้ชัดเจนขึ้น การย้อมสี modified Kinyoun acid fast มีประโยชน์ในการตรวจหา acid-fast aerobic actinomycetes

วิธีปฏิบัติงาน

1. **การตรวจสดในสารละลาย potassium hydroxide**

   การวินิจฉัยราในกลุ่ม Dermatophytes ที่ก่อโรคกลาก

   สิ่งตรวจ ผิวหนัง ผม

   สารละลาย potassium hydroxide (KOH) ใช้ความเข้มข้น 10-30 % โดยชั่ง KOH ละลายในน้ำกลั่น 100 ml ใช้กับผิวหนัง และผม

   การปฏิบัติ หยดสารละลาย KOH 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้เข็มเขี่ยแตะสิ่งตรวจ (สำหรับเส้นผมใช้คีมคีบ) จุ่มลงในหยดสารละลาย KOH บนแผ่นสไลด์แก้วที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วย cover glass ลนผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง ซับน้ำยาส่วนเกินออก ทิ้งไว้ 5-30 นาที นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เริ่มจากกำลังขยาย 10 X และตามด้วยกำลังขยาย 40 X

2. **การตรวจสดในสารละลายผสม potassium hydroxide และ dimethyl sulfoxide**

   สิ่งตรวจ เล็บ

   สารละลาย dimethyl sulfoxide 40 ml ผสมกับน้ำกลั่น 60 ml เติม KOH 20 g คนให้เข้ากันจน KOH ละลายหมด บรรจุใส่ขวดที่มีจุกหยด

   การปฏิบัติ ใช้กรรไกรตัดตัวอย่างเล็บเป็นชิ้นเล็กและบางเท่าที่จะทำได้ ใช้คีมคีบชิ้นส่วนของเล็บจุ่มลงในหยดสารละลายผสม potassium hydroxide และ dimethyl sulfoxide ที่หยดไว้ก่อนแล้ว 1 หยดบนแผ่นสไลด์แก้ว ปิดทับด้วย cover glass ไม่ต้องลนไฟ นำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์เริ่มจากกำลังขยาย 10 X และตามด้วยกำลังขยาย 40 X

การอ่านผลและรายงานผล

การตรวจสดโดยสารละลาย potassium hydroxide สำหรับสิ่งตรวจผิวหนังและเล็บ จะเห็นลักษณะของราในกลุ่ม Dermatophytes เป็นแบบเส้นใยใสมีผนังกั้นแตกกิ่งก้าน (hyaline branching septate hyphae) หรือพบลักษณะ arthroconidia บนอีพิทีเลียลเซลล์

รายงานผล “hyaline branching septate hyphae, arthroconidia suggesting dermatophytosis”

14-0992(001-354)editnew130158.indd 59 1/14/58 BE 3:50 PM

สิ่งตรวจ เส้นผมจะพบลักษณะที่แตกต่างกัน 3 แบบคือ

1. เชื้อสร้างโคนิเดีย รูปร่างกลมเกาะอยู่ภายนอกเส้นผม (ectothrix) เป็นลักษณะการก่อโรคของ รา ในกลุ่ม Dermatophytes สกุล *Microsporum*

   รายงานผล "ectothrix infection suggesting dermatophytosis"

2. เชื้อสร้างโคนิเดีย รูปร่างกลมเจริญอยู่ภายในเส้นผม (endothrix) เป็นลักษณะการก่อโรคของ รา ในกลุ่ม Dermatophytes สกุล *Trichophyton*

   รายงานผล "endothrix infection suggesting dermatophytosis"

3. เชื้อสร้างเส้นใยเป็นท่อนยาวเรียงตัวอยู่ในเส้นผมเป็นลักษณะเฉพาะของรากลุ่ม Dermatophytes เชื้อ *Trichophyton schuenleinii.*

   รายงานผล "favic infection suggesting dermatophytosis"

3. การตรวจสดสิ่งตรวจที่สงสัยโรค cryptococcosis ใน india ink preparation

สิ่งตรวจ น้ำไขสันหลัง

การปฏิบัติ หยด india ink 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์แก้วและตามด้วย 1 loop เต็มของสิ่งตรวจ ผสมเข้าด้วยกันและปิดทับด้วย cover glass กดทับเบาๆให้เป็นแผ่นบาง ไล่ฟองอากาศออก นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เริ่มจากกำลังขยาย 10 X และตามด้วยกำลังขยาย 40 X

การอ่านผลและรายงานผล

พบเซลล์ยีสต์รูปร่างกลม ผนังเซลล์หนา มีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ 3-20 μm และพบเซลล์ยีสต์แตกหน่อ (budding yeasts) รอยต่อของเซลล์เป็นฐานแคบ พื้นสีดำที่เห็นในกล้องจุลทรรศน์เป็นสีดำของ india ink ซึ่งไม่สามารถซึมผ่านเข้าส่วนของแคปซูลได้ จึงเห็นแคปซูลเป็นส่วนใส วาว อยู่รอบนอกของเซลล์ ความหนาแน่นของเชื้อมีมากขึ้น ความแตกต่างของขนาดของเซลล์ และความหนาของแคปซูลก็มีมากขึ้น encapsulated cryptococci สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนกับ oval blastospores ของ *Candida*

การรายงานผลการตรวจสดสิ่งตรวจที่สงสัยโรคคริปโตคอกโคซีสในอินเดียอิงค์ และตรวจพบ encapsulated yeast cells

รายงานผล "Yeast, presumptive *Cryptococcus neoformans* based on capsule production." หรือ "presence of budding, encapsulated yeast cells presumptive diagnosis of cryptococcosis"

14-0992(001-354)editnew130158.indd 60 1/14/58 BE 3:50 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Ayers LW. Microscopic Examination of Infected Materials. In: Mahon CR, Manuselis G editors. Textbook of Diagnostic Microbiology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. 261-310.
2. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 9th ed. St. Louis: C.V. Mosby Co.; 1994.
3. Bartholomew JW. Variables influencing results, and the precise definition of steps in gram staining as a means of standardizing the results obtained. Stain Technol. 1962; 37:139-155.
4. Clarridge JE, Mullins JM. Microscopy and staining. In: Howard BJ editor. Clinical and Pathogenic Microbiology. St. Louis: C.V. Mosby Co.; 1987. p. 87-103.
5. Engelkirk PG, Engelkirk DJ. Laboratory Diagnosis of Selected Fungal Infections. In: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Baltimore: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 507-540.
6. Hazen KC, Howell SA. Mycology and Antifungal Susceptibility Testing (Microscopic Clinical Specimen Examination). In: Garcia LS editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. Vol 2. Washington, DC: ASM Press; 2007. p.8.3.1.1-8.3.1.9.
7. Howell SA, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 2. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.1793-1821.
8. Isenberg HI. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p.39-50.
9. Mangels JI, Cox ME, Lindberg LH. Methanol fixation. An alternative to heat fixation of smears before staining. Diagn Microbiol Infect Dis. 1984; 2:129-137.
10. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of sputum. Mayo Clin. Proc. 1975; 50:339-344.
11. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Gram stain. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 39-50.
12. Preston NW, Morrell A. Reproducible results with the Gram stain. J Path Bact. 1962;84:241-243.
13. Shanholtzer CJ, Schaper P, Peterson L. Concentrated Gram stain smears prepared with a cytospin centrifuge. J Clin Microbiol. 1982; 16:1052-1056.
14. Washington JA. Rapid diagnosis by microscopy. Clin Microbiol Newls. 1986; 8:135-137.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 61 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.1 การเพาะเชื้อจากเลือด

สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
วิภา ตรีรัตน์วีรพงษ์
ฉันทนา อรัญญะ

หลักการ

การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia) ถือเป็นภาวะวิกฤติที่อาจทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ septic shock และเสียชีวิตได้ค่อนข้างสูง การติดเชื้ออาจมาจากการที่เชื้อเข้าสู่เลือดโดยตรงหรือมาจากตำแหน่งต่างๆ ของร่างกายที่มีการติดเชื้อชนิดนั้นๆอยู่แล้ว เช่น การติดเชื้อจากแผลผ่าตัด ระบบทางเดินหายใจ ระบบปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น

เชื้อที่เป็นสาเหตุก่อโรคที่พบบ่อย ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* group A และ group อื่นๆ, *Streptococcus* viridans, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., *Neisseria meningitidis* และ *Vibrio* spp. เป็นต้น เชื้อประจำถิ่นเช่น coagulase negative staphylococci อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ใส่สายต่างๆเข้าไปในร่างกาย ผู้ป่วยมะเร็ง เบาหวาน ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ เป็นต้น

การพิจารณาว่าเป็นเชื้อก่อโรคหรือปนเปื้อน จะพิจารณาร่วมกับอาการทางคลินิกของคนไข้ ระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อที่ให้ผลบวกในแต่ละขวด จำนวนขวดที่ให้ผลบวก และแบบแผนความไวของสารต้านจุลชีพของแต่ละขวด การเพาะเชื้อจากเลือดจึงเป็นการวินิจฉัยที่ต้องคำนึงถึงความถูกต้อง การรายงานผลที่รวดเร็วเป็นแนวทางสำหรับแพทย์ในการเลือกใช้สารต้านจุลชีพที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วย

ขอบเขต

การเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ การตรวจรับสิ่งตรวจ การเพาะเชื้อจากเลือดด้วยวิธีทั่วไป (conventional method) หลักการเพาะเชื้อจากเลือดด้วยระบบกึ่งอัตโนมัติ การอ่านผลการเพาะเชื้อ การรายงานผลเมื่อพบเชื้อจากการย้อมแกรม การรายงานผลเมื่อเสร็จสมบูรณ์ การแปลผลและการควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อจากเลือด

วิธีการปฏิบัติงาน

ขั้นตอนการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ

1. ก่อนเจาะเลือดควรทำความสะอาดมือโดยการล้างมือด้วยน้ำยาทำลายเชื้อเช่น 4% Chlorhexidine gluconate หรือใช้ alcohol hand rub และสวมถุงมือสะอาด
2. ทำความสะอาดผิวหนังตำแหน่งที่จะเจาะเลือดด้วย 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ซึ่งมีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีเทียบเท่า povidone-iodine แต่แห้งเร็วกว่าและมีระยะเวลาในการรอคอยให้มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อสูงสุดสั้นกว่า ใช้เวลารอให้แห้งและออกฤทธิ์สูงสุดเพียง 30 วินาที ขณะที่ povidone-iodine ใช้เวลานานถึง 2 นาที ผู้ปฏิบัติงานมักไม่รอถึง 2 นาที นอกจากนี้ Chlorhexidine gluconate มีฤทธิ์คงเหลือหลังทาน้ำยาด้วย จึงเป็นน้ำยาที่ควรใช้เพื่อลดการปนเปื้อนในการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ
3. การเช็ดผิวหนังให้วนจากด้านในออกด้านนอกอย่างน้อย 5 cm เช็ดด้วยความแรงนาน 30 วินาที และรอแห้งไม่น้อยกว่า 30 วินาที เด็กแรกเกิดใช้ 70% alcohol หรือ povidone-iodine
4. เจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อเมื่อผู้ป่วยมีข้อบ่งชี้สงสัยการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราในเลือด ควรเจาะช่วงที่มีการแบ่งตัวของเชื้อในเลือดจำนวนมาก ระยะเริ่มมีไข้
5. ควรเจาะเลือดก่อนรับยาปฏิชีวนะ กรณีได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อนควรเจาะเร็วที่สุดหลังรับยา หรือเจาะที่ 15 นาทีก่อนรับยาปฏิชีวนะครั้งต่อไป กรณีไม่เร่งด่วน เจาะเลือดสองครั้งห่างกัน 15-30 นาที กรณีต้องรีบให้ยาปฏิชีวนะสามารถเจาะเลือดพร้อมกันจากตำแหน่งที่ต่างกัน ถ้าสงสัยการติดเชื้อลิ้นหัวใจเจาะอย่างน้อยสองขวดห่างกัน 12 ชม.
6. เจาะจากเส้นเลือดดำบริเวณที่ไม่มีแผลหรือรอยโรค ปริมาณเลือดต้องให้ได้ตามกำหนดของขวดเพาะเชื้อ กรณีไม่สามารถเจาะเลือดได้ตามกำหนดต้องบันทึกในใบส่งตรวจ
7. ทำความสะอาดจุกของขวดเพาะเชื้อด้วย 70% alcohol หรือ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol
8. ใส่เลือดลงขวดเพาะเชื้อโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนเข็ม หมุนขวดเบาๆเพื่อให้เลือดผสมกับน้ำยาเพาะเชื้อ
9. นำส่งห้องปฏิบัติการทันที ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันทีหลังเจาะเลือดควรเก็บที่อุณหภูมิห้อง และต้องบันทึกระยะเวลาที่รอคอยก่อนส่งตรวจเป็นข้อมูลเพิ่มเติมของสิ่งตรวจในใบนำส่ง และควรคำนึงถึงผลกระทบที่ทำให้เพิ่มระยะเวลารอคอยผลและมีผลต่อความปลอดภัยของผู้ป่วยเนื่องจากต้องรายงานผลเป็นค่าวิกฤติ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 64 1/14/58 BE 3:50 PM

ขั้นตอนการตรวจรับสิ่งตรวจ ให้ตรวจสอบสิ่งต่อไปนี้

1. ชื่อ นามสกุลผู้ป่วยกับใบนำส่งถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์
2. สภาพขวดหากพบมีรอยแตกร้าว ต้องปฏิเสธตัวอย่าง
3. ปริมาตรของเลือดที่เจาะ ถ้าไม่เหมาะสมต้องระบุในใบรายงานผล
4. การเก็บขวดเลือดหลังจากการเจาะ ต้องมีวิธีการเก็บที่ถูกต้องเหมาะสมก่อนทำการเพาะเชื้อ เช่น เก็บในอุณหภูมิที่ถูกต้องเหมาะสม ห้ามนำเข้าตู้เย็น
5. ไม่มีสำลีปิดทับบนจุกยาง หรือมีสีของ iodine บนจุกยาง ถ้ามีควรแจ้งผู้ใช้บริการให้แก้ไข
6. ระยะเวลานำส่งหลังเจาะเลือด ถ้านานเกินกำหนดควรบันทึกในใบรายงานผล

การเพาะเชื้อจากเลือดด้วยวิธีทั่วไป (conventional method)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออาจใช้ BHI broth, TSB ที่เติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.05% sodium polyanethol sulfonate (SPS) ปริมาณเลือดที่เก็บสำหรับผู้ป่วยผู้ใหญ่ 5-10 ml ต่ออาหาร 45 ml สำหรับผู้ป่วยเด็กปริมาณเลือด 1-2 ml ต่ออาหาร 9 ml โดยอัตราส่วนระหว่างเลือดและปริมาณอาหารประมาณ 1:5 ถึง 1:10 นำขวด hemoculture อบที่ 35-37 ^{O}C นาน 7 วัน ทำการเพาะเชื้อหลังอบขวดข้ามคืน และรายงานผลเบื้องต้น หากเชื้อยังไม่ขึ้นให้สังเกตดูการเจริญของเชื้อทุกวัน ขวดที่มีการเจริญของเชื้อจะมีลักษณะต่อไปนี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นบริเวณผิวหน้า หรือขุ่นทั้งขวด มีการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง มีเม็ดสีขาวเล็กๆ อยู่บนผิวหน้า หรืออยู่เหนือชั้นเม็ดเลือด ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อมีฟองก๊าซ หรือก้อน clot หรือมีก้อนคล้ายสำลี ในกรณีที่พบลักษณะดังกล่าวให้เพาะเชื้อทันทีบน CA, BA และ MAC อบ plate CA ในบรรยากาศ 5-10% CO_2 ที่ 35-37°C นาน 2-3 วัน สำหรับ BA และ MAC อบที่ 35-37°C นาน 2-3 วัน พร้อมกับป้ายลงสไลด์ทำการย้อมแกรม

การเพาะเชื้อจากเลือดด้วยระบบกึ่งอัตโนมัติ (continuously monitored automated blood culture system)

ปริมาณเลือดต่อขวดประมาณ 5-8 ml ปริมาณที่เหมาะสมจะมีคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตบ่งชี้ไว้ข้างขวด นำขวดใส่เครื่องเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 ^{O}C เครื่องจะทำการตรวจอัตโนมัติอย่างต่อเนื่องตามหลักการที่แตกต่างกันไปของแต่ละบริษัท ระยะเวลาในการอบขวดเพาะเชื้อภายใน 5 วัน ไม่มีความจำเป็นที่ต้องอบเพาะเชื้อเกิน 5 วัน สำหรับเชื้อที่สงสัยในกลุ่ม HACEK, *Brucella*, *Capnocytophaga* และ *Campylobacter* และไม่มีความจำเป็นในการทำ blind subculture เมื่อพบการเจริญของเชื้อระบบจะมีการแจ้งเตือน (alarm) ผ่านหน้าจอ monitor นำขวดที่ให้ผลบวกออกมาทำการ subculture และย้อมแกรม พร้อมทั้งโทรแจ้งผลเบื้องต้น และออกใบรายงานผลเป็นลายลักษณ์อักษรตามไปด้วยทุกครั้ง

<u>หมายเหตุ</u> เพื่อลดอัตราการปนเปื้อนควรใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ทำความสะอาดบริเวณจุกยาง หรืออาจใช้ 70% alcohol ในการเช็ดจุกขวดเพาะเชื้อ ไม่แนะนำให้ใช้สารที่มี iodine เป็นส่วนประกอบเช็ดจุกยางเพราะอาจทำให้จุกยางเปลี่ยนสภาพได้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 65 1/14/58 BE 3:50 PM

การอ่านผล

อ่านผลการเพาะเชื้อ ทำการแยกชนิดเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเพาะเชื้อที่ subculture ไว้ พร้อมทั้งทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

การรายงานผล

การรายงานผลเบื้องต้น

1. กรณีไม่มีเชื้อเจริญ (no growth) ให้รายงานระยะเวลาที่อบขวด (no growth at 24 hours, no growth at 48 hours หรือ no growth after x days) ทั้งนี้จำนวนวัน (x) ขึ้นอยู่กับนโยบายของห้องปฏิบัติการที่ทำความตกลงกับแพทย์ในแต่ละโรงพยาบาล
2. กรณีมีเชื้อเจริญ (positive culture) ทำการรายงานผลแกรม การติดสี รูปร่าง และลักษณะการเรียงตัวเพื่อเป็นประโยชน์กับแพทย์ในการพิจารณาเลือกใช้สารต้านจุลชีพที่เหมาะสมต่อผู้ป่วย การย้อมแกรมถือเป็นค่าวิกฤติที่ต้องรีบรายงานทันที การรายงานผลทางโทรศัพท์ต้องบันทึกชื่อผู้รับแจ้ง วัน-เวลา และผู้ที่ทำการแจ้ง พร้อมออกใบรายงานผลตามหลังจากการแจ้งทางโทรศัพท์ด้วยทุกครั้ง

การรายงานผลที่เสร็จสมบูรณ์

1. กรณีไม่มีเชื้อเจริญ (no growth) ให้ระบุระยะเวลาที่เพาะเชื้อด้วยเช่น no growth after 7 days สำหรับการเพาะเชื้อด้วยวิธี conventional method และ no growth after 5 days สำหรับการเพาะเชื้อด้วยวิธี continuously monitored automated blood culture system
2. กรณีมีเชื้อเจริญ (positive culture) รายงานผลการวินิจฉัยเชื้อ และผลความไวต่อสารต้านจุลชีพ ระบุจำนวนขวดที่ให้ผลบวกในชุดนั้น
3. กรณีที่เพาะเชื้อโดยเครื่องตรวจอัตโนมัติ การรายงานเวลาขวดเลือดที่ให้ผลบวก (time to detection) ในขวดที่เจาะจากเส้นเลือดดำ กับขวดที่เจาะจาก catheter ถ้าขวดที่เจาะผ่าน catheter ใช้เวลาที่ให้ผลบวกน้อยกว่าขวดที่เจาะจากเส้นเลือดดำ มากกว่าหรือเท่ากับ 2 ชม. และเชื้อที่แยกได้จากทั้งสองขวดเป็นเชื้อชนิดเดียวกันแสดงว่าการติดเชื้อนั้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับการใช้ catheter (catheter-related bloodstream infections) ดูความสอดคล้องกับการติดเชื้อในตำแหน่งต่างๆ และผลแกรมที่รายงานเบื้องต้น
4. ในใบรายงานผลควรระบุสิ่งที่ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดที่อาจมีผลต่อการเพาะเชื้อด้วยทุกครั้ง เช่น ได้ปริมาณเลือดน้อยกว่ากำหนด การส่งตัวอย่างล่าช้าเป็นต้น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 66 1/14/58 BE 3:50 PM

การแปลผลการเพาะเชื้อจากเลือด

เนื่องจากพบมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อในกระแสเลือด ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ปรกติไม่ได้เป็นเชื้อก่อโรค หรือก่อโรคไม่รุนแรง เช่น เชื้อประจำถิ่น (normal flora bacteria) ที่พบในคนปรกติ การแปลผลการเพาะเชื้อจากเลือดเพื่อแยกความสำคัญของการพบเชื้อดังกล่าวออกจากการปนเปื้อนทำได้ยากมาก เนื่องจากในอีกด้านหนึ่ง การพบการปนเปื้อนของเชื้อในกระแสเลือด อาจทำให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพเกินความจำเป็น มีการตรวจวิเคราะห์มากขึ้นหรือมีการปรึกษาแพทย์เฉพาะทาง และเพิ่มระยะเวลาการอยู่โรงพยาบาลนานขึ้น ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวเนื่องจากการพบผลบวกปลอมของการเพาะเชื้อของเลือด มีมากถึง 40% สำหรับการรับสารต้านจุลชีพและการทดสอบเพื่อแยกชนิดของเชื้อในห้องปฏิบัติการ การที่ไม่สามารถแยก contamination ออกจาก true infection จึงมีผลกระทบมาก ดังนั้นตัวชี้บ่งที่สามารถช่วยแยก probable pathogen ออกจาก contamination จึงมีความสำคัญสำหรับการแปลผลการเพาะเชื้อจากเลือด

ตัวบ่งชี้ที่ใช้ในการแปลผลของการเพาะเชื้อในเลือด

ตัวบ่งชี้ที่ใช้ในการแปลผล เพื่อพิจารณาแยกการเพาะเชื้อที่พบเชื้อก่อโรคในกระแสเลือด ออกจากการพบเชื้อปนเปื้อนในเลือด ตัวชี้วัดเหล่านี้ใช้แสดงให้แพทย์และห้องปฏิบัติการทราบว่าตัวอย่างตรวจน่าจะมีเชื้อปนเปื้อนระหว่างการเก็บตัวอย่างหรือในขั้นตอนการวิเคราะห์ เช่น

- **ความถี่ของการพบมีเชื้อขึ้นในขวดจากจำนวนขวดที่ทำการเพาะเชื้อ** (positive bottles among collections) เช่น การเจาะเลือดสามขวดและมีเชื้อขึ้นทั้งสามขวด หรือเจาะเลือดสองขวดเพาะเชื้อได้ทั้งสองขวด โอกาสที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อในกระแสเลือดเพียงขวดเดียวจากการเจาะเลือดสามขวด เป็นต้น
- **ผลการย้อมแกรมจากขวดเลือดเพาะเชื้อ** พบเชื้อ gram-positive cocci in cluster แสดงว่าเป็นเชื้อ staphylococci ซึ่งอาจจะเป็น เชื้อก่อโรคคือ *Staphylococcus aureus* หรือ อาจจะเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ผิวหนังเป็น coagulase-negative *Staphylococcus* ซึ่งไม่ก่อโรค ถ้าย้อมได้ gram-positive rod ตัวโต ชี้บ่งว่าเป็น *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม แสดงว่ามีการปนเปื้อนที่ตำแหน่งเจาะเลือดและทำความสะอาดผิวหนังไม่ดี การชี้บ่งการติดเชื้อด้วยการย้อมแกรมอย่างเดียวไม่เพียงพอ เนื่องจากเชื้อบางส่วนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเชื้อก่อโรคได้ด้วย
- **จำนวนและชนิดของเม็ดเลือดขาวในเลือด** ขณะที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานปรกติ ถ้ามี left shift (>10 % bands) โดยจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่เพิ่มขึ้นมักมีความสัมพันธ์กับ positive blood culture
- **จำนวน species ที่แยกได้จากเลือดแต่ละขวด** เชื้อที่เพาะได้หลายตัว (multiple organisms isolates) มักสัมพันธ์กับการปนเปื้อน เนื่องจากทำความสะอาดผิวหนังไม่ดี การติดเชื้อในเลือดมักพบเชื้อเพียงชนิดเดียว

14-0992(001-354)editnew130158.indd 67 1/14/58 BE 3:50 PM

- **อาการแสดงของผู้ป่วย** เช่น มีไข้สูง หรือไข้ต่ำๆ ผู้ป่วยที่ไม่มีไข้แต่มี positive blood culture มักเกิดคำถามว่าผลการเพาะเชื้อเชื่อถือได้หรือไม่
- **ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตจนตรวจพบเชื้อ** ถ้าเจาะเลือดได้เพียงพอเวลาที่แบคทีเรียแบ่งตัวจนตรวจพบเชื้อได้มักไม่เกิน 48 ชม. กรณีที่มีเชื้อปริมาณมาก จนตรวจพบ positive culture ได้เร็ว ในทางกลับกันเชื้อที่โตช้าชี้บ่งว่ามีเชื้อปริมาณน้อยมากที่เข้าไปในขวด ซึ่งมักมีความจำเพาะคือไม่มีเชื้อในเลือด แต่มีการปนเปื้อนในขวดเลือดจากเชื้อที่มีแหล่งจากภายนอก

เชื้อที่น่าจะเป็นเชื้อปนเปื้อน (probable contamination)

1. การเพาะได้เชื้อต่อไปนี้จากเลือดเพียงขวดเดียว ในขณะที่ทำการเพาะเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับสองขวดได้แก่ *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, coagulase-negative staphylococci
2. การพบเชื้อหลายชนิดในเลือดเพียงขวดเดียวจากการเจาะเลือดอย่างน้อยสองขวด
3. เชื้อที่แยกได้จากเลือดของคนไข้ที่ไม่มีอาการติดเชื้อ หรือหลักฐานทางแพทย์ไม่สอดคล้องกับผลการเพาะเชื้อ
4. เชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในตำแหน่ง primary site เป็นคนละชนิดกับที่แยกได้จากเลือด

เชื้อที่น่าจะเป็นเชื้อก่อโรค (probable pathogen)

1. เชื้อที่แยกได้เป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้จากเลือดที่เจาะซ้ำใหม่ ในเวลาที่ต่างกัน หรือเจาะจากตำแหน่งที่ต่างกัน
2. แยกเชื้อที่จำเพาะบางตัวได้จากเลือดของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ endocarditis เช่น *Enterococcus* spp. หรือเชื้อแกรมลบชนิดแท่ง
3. เชื้อที่จำเพาะ เช่น เชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* group B และเชื้อแกรมลบชนิดแอนเอโรบิค เป็นต้น
4. เชื้อประจำถิ่น (normal microbial flora) ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยที่สงสัยมีการติดเชื้อในกระแสเลือดและมี prosthetic devices หรือมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือได้รับสารกดภูมิต้านทาน
5. เชื้อที่พบได้ไม่บ่อยแต่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีประวัติพิเศษ เช่น เดินทางไปต่างประเทศ หรือเชื้อที่ใช้อาวุธชีวภาพ เช่น *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei*
6. เชื้อบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์ วินิจฉัยได้โดย serological test หรือ molecular method เช่น *Coxiella*, *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 68 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 4.1-1 แสดงแบคทีเรียที่แยกได้จากเลือดและโอกาสของการปนเปื้อน (false positive) หรือโอกาสของการก่อโรค (true positive)

Organism	% False positive	% True positive
Bacillus spp.	> 90	< 10
Coagulase-negative staphylococci	> 90	< 10
Propionibacterium spp.	> 90	< 10
Corynebacterium spp.	80	20
Viridans streptococci	50	50
Clostridium spp.	40	60
Staphylococcus aureus	25	75
Enterococcus spp.	15	85

การควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อจากเลือดในห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการควรทำการควบคุมคุณภาพในทุกขั้นตอนของการเพาะเชื้อจากเลือด โดยมีขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ ดังนี้

1. การประกันคุณภาพการวิเคราะห์

ทำการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control; IQC) และบันทึกผล ตลอดจนเข้าร่วมโครงการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการที่จัดขึ้นโดยองค์กรภายนอกในระดับประเทศหรือระดับสากล (external quality assessment; EQA) ห้องปฏิบัติการทำการประกันคุณภาพการเพาะเชื้อจากเลือดได้ดังนี้

- การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ครอบคลุมจุลชีพที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อในเลือด
- ควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารที่ใช้เพาะเชื้อ
- ควบคุมคุณภาพการย้อมสีให้ครอบคลุมทั้งเชื้อที่เป็น positive control และ negative control ทำการวิเคราะห์และบันทึกผลแบบเดียวกับการย้อมเลือดของผู้ป่วย
- ควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อจากเลือดในขวด ทำทั้ง positive control โดยใส่เชื้อมาตรฐานที่เจือจางด้วยเลือดของคนปรกติ ให้มีปริมาณเชื้อแตกต่างกันลงในขวดเพาะเชื้อ และทำ negative control ที่ใส่น้ำเกลือแทนเชื้อ ทำการวิเคราะห์และบันทึกผลการเพาะเชื้อแบบเดียวกับเลือดของผู้ป่วย
- ทำการควบคุมคุณภาพทดสอบความไวของเชื้อมาตรฐานต่อสารต้านจุลชีพ ทำการวิเคราะห์และบันทึกผลแบบเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย

14-0992(001-354)editnew130158.indd 69 1/14/58 BE 3:50 PM

- กำหนดเกณฑ์การตัดสินการควบคุมคุณภาพกรณีผล IQC ไม่อยู่ในเกณฑ์ และทำบันทึกปฏิบัติการแก้ไข
- มีการจัดเก็บรักษาคุณภาพของเชื้อมาตรฐานที่ได้มาจากแหล่งที่เชื่อถือได้ และเป็นสากลที่อ้างอิงได้ เพื่อนำผลมาใช้ควบคุมคุณภาพของการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ คุณภาพอาหารที่ใช้เพาะเชื้อจากเลือดและอาหารที่ใช้ทำ subculture หรือการวินิจฉัยเชื้อ
- มีระบบการวิเคราะห์ที่สอบกลับได้ (traceable) ถึงค่ามาตรฐานสากล (SI unit) มีการบันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์ สารมาตรฐาน และเชื้อมาตรฐาน
- วัสดุอ้างอิงและเชื้อมาตรฐาน (standard/calibrator) มีคุณลักษณะเหมาะสม มีใบรับรองคุณลักษณะหรือข้อมูลอ้างอิงจากผู้ผลิต (MT 5.2.4)
- กรณีทำการทดสอบเดียวกันแต่ใช้เครื่องมือหลายเครื่องต้องมีการปรับเทียบผล มีบันทึก
- ห้องปฏิบัติการต้องเข้าร่วมโครงการ EQA กับองค์กรที่มีคุณภาพ เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดความถูกต้องของผลการทดสอบที่ทำ โดยปฏิบัติต่อตัวอย่างที่ได้รับเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบจากผู้ป่วย กรณีที่มีผลไม่ตรงกับผล EQA ต้องทำการวิเคราะห์หาสาเหตุและดำเนินการแก้ไข
- มีการสอบเทียบเครื่องมือที่มีผลกระทบต่อคุณภาพ และมีการบำรุงรักษาเชิงป้องกันและตรวจสอบความพร้อมใช้งานของเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติสำหรับการเพาะเชื้อจากเลือด ทั้งส่วนที่เป็น incubator และระบบ detection ตลอดจนตู้เย็นเก็บแผ่นสารทดสอบและสารที่ใช้ทดสอบ

2. ขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์

- มีคู่มือการเก็บตัวอย่างและแนวปฏิบัติในการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ ให้หน่วยงานที่มาส่งตัวอย่างวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์ทันทีเมื่อได้รับตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างและช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างไว้โดยผลการทดสอบไม่เปลี่ยนไปและไม่ทำการทดสอบสิ่งตรวจที่มีคุณภาพไม่ดีพอ
- มีการควบคุมวิธีการนำส่งตัวอย่างภายในเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม
- มีการกำหนดเกณฑ์รับและปฏิเสธตัวอย่าง และบันทึกรายละเอียดสภาพตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมในการรายงานผลด้วยทุกครั้ง เพื่อแพทย์จะได้ใช้ประโยชน์ในการแปลผล
- มีการชี้บ่งตัวอย่างและใบนำส่ง มีบันทึกการรับตัวอย่างในสมุดหรือระบบคอมพิวเตอร์

14-0992(001-354)editnew130158.indd 70 1/14/58 BE 3:50 PM

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์

- ใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน หรือวิธีอ้างอิงได้ กรณีใช้วิธีวิเคราะห์ที่กำหนดขึ้นเอง หรือดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ เช่น ลดส่วนน้ำยา หรืออื่นๆ ต้องมีข้อมูลการ validate
- แจ้งวิธีวิเคราะห์ให้ผู้ใช้บริการทราบรวมทั้งชนิดและปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการ ถ้าเปลี่ยนแปลงวิธีการต้องแจ้งเป็นลายลักษณ์อักษรและมีบันทึกการแจ้ง
- มีคู่มือวิธีปฏิบัติหรือระเบียบปฏิบัติการวิเคราะห์ ณ จุดที่ปฏิบัติงาน เป็นเอกสารควบคุมในระบบการควบคุมเอกสาร วิธีในคู่มือตรงตามที่ใช้งานจริงและเป็นปัจจุบัน

4. ขั้นตอนหลังการวิเคราะห์

- การรายงานผลขั้นตอนสุดท้ายประกอบด้วยผลต่อไปนี้ ผลจากการย้อมแกรม ผลการวินิจฉัยเชื้อและผลความไวต่อสารต้านจุลชีพ
- มีการตรวจสอบผลการเพาะเชื้อโดยผู้ที่ได้รับมอบหมาย
- การย้อมแกรม เป็นวิธีการสำคัญที่ใช้บ่งชี้ว่ามีเชื้อขึ้นในขวดเลือด เมื่อย้อมพบเชื้อจากขวดเพาะเชื้อจากเลือดต้องทำการรายงานผลให้แพทย์ทราบทันที ผลการเพาะเชื้อจากเลือดจัดเป็นค่าวิกฤติที่ต้องรายงานเร่งด่วน ต้องให้แพทย์ดูแลผู้ป่วยได้รับผลที่รายงานโดยเร็ว ผู้ที่รับผลทางโทรศัพท์ต้องบันทึกผลเพื่อไว้ยืนยันความถูกต้อง และผู้โทรแจ้งผลต้องบันทึกชื่อผู้รับการแจ้งผล
- เมื่อเพาะเชื้อขึ้น (positive blood culture) ต้องรายงานผลทันทีที่ได้ผลเป็นค่าวิกฤติ การรายงานผลต้องรายงานทั้งผลจากการย้อมแกรม ผลการวินิจฉัยเชื้อและผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ข้อมูลที่อาจจะเป็นประโยชน์ต่อการแปลผล เช่น สารต้านจุลชีพที่ผู้ป่วยได้ก่อนเจาะเลือดเพาะเชื้อ ปริมาตรของเลือดที่ใช้เพาะเชื้อน้อยกว่ามาตรฐานที่กำหนด การส่งตัวอย่างล่าช้า เป็นต้น

การบริหารจัดการระบบคุณภาพของงานห้องปฏิบัติการให้งานขับเคลื่อนตามลำดับของการทำงานต้องทำให้ครอบคลุมทั้งสามขั้นตอน คือ ขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ ได้แก่ การสั่งตรวจ การเก็บสิ่งตรวจและนำส่งห้องปฏิบัติการ และการรับ การปฏิเสธสิ่งตรวจ โดยตรวจสอบคุณภาพของสิ่งตรวจในขั้นตอนการวิเคราะห์ เช่น วิธีการวิเคราะห์ การทบทวนและติดตามผลการวิเคราะห์ สำหรับขั้นตอนหลังการวิเคราะห์ ได้แก่การรายงานผลและการรับรองผลการวิเคราะห์ และการเก็บรักษาและทำลายสิ่งตรวจหลังการวิเคราะห์

14-0992(001-354)editnew130158.indd 71 1/14/58 BE 3:50 PM

รายงานผลการเพาะเชื้อจากเลือด ควรมีการควบคุมคุณภาพของการปฏิบัติงานทั้งสามขั้นตอนของการวิเคราะห์ การควบคุมคุณภาพที่ทำอย่างจริงจังและต่อเนื่องเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ในการประกันคุณภาพของการเพาะเชื้อจากเลือดได้ ทำให้แพทย์มีความเชื่อมั่นต่อผลการวิเคราะห์ อันจะเป็นประโยชน์ในการรักษาและควบคุมโรค การควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์เป็นวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดการปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อในเลือด เนื่องจากสามารถใช้แยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในเลือดจริงออกจากเชื้อที่ปนเปื้อนหรือเชื้อที่ไม่ใช้สาเหตุของการติดเชื้อได้ จึงควรใช้แนวทางปฏิบัติการแปลผลและการควบคุมคุณภาพในการพัฒนาคุณภาพการเพาะเชื้อจากเลือด

เอกสารอ้างอิง

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and Procedures for Blood Culture: Approved Guideline. CLSI document M47-A. Pennsylvania: Wayne; 2007.
2. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation Blood Cultures. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 58-62.
3. กำพล สุวรรณพิมลกุล, คัคนางค์ นาคสวัสดิ์. วิธีลดการปนเปื้อนในการเจาะเลือดเพื่อส่งเพาะเชื้อ. ใน: สุรางค์ เดชศิริเลิศ, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, กาญจนา คชินทร บรรณาธิการ. แนวปฏิบัติการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อและการเพาะเชื้อก่อโรคจากเลือด. กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. หน้า 7.
4. มาลัย วรจิตร. การดำเนินการเพาะเชื้อและการรายงานผลการเพาะเชื้อจากเลือดทางห้องปฏิบัติการ หลักการเพาะเชื้อจากเลือดและการวินิจฉัยเชื้อก่อโรค. กรุงเทพฯ: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2550. หน้า 79-86.
5. มาลัย วรจิตร. กระบวนการทางห้องปฏิบัติการสำหรับการเพาะเชื้อจากเลือด. ใน: สุรางค์ เดชศิริเลิศ, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, กาญจนา คชินทร บรรณาธิการ. แนวปฏิบัติ การเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อและการเพาะเชื้อก่อโรคจากเลือด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. หน้า 15-23.
6. วรรณา เพ่งเรืองโรจนชัย. การเพาะเชื้อจากเลือด. ใน: คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. นนทบุรี: กองโรงพยาบาลภูมิภาค; 2540. หน้า 19-22.
7. สุวรรณา ตระกูลสมบรูณ์. การแปลผลและการควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อจากเลือด. ใน: สุรางค์ เดชศิริเลิศ, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, กาญจนา คชินทร บรรณาธิการ. แนวปฏิบัติ การเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อและการเพาะเชื้อก่อโรคจากเลือด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. หน้า 27-35.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 72 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.2 การเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังและน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกาย

ฉันทนา อรัญญะ
วรรณา เพ่งเรืองโรจนชัย
สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์

การเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลัง

หลักการ

น้ำไขสันหลังเป็นของเหลวในร่างกายที่ปราศจากเชื้อ มีหน้าที่หล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง ภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในน้ำไขสันหลังถือเป็นภาวะวิกฤติที่ก่อให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ จึงมีความสำคัญที่ต้องรีบทำการทดสอบและแจ้งผลให้แพทย์ทราบโดยทันที การทดสอบที่รวดเร็วและถูกต้องสามารถช่วยรักษาชีวิตผู้ป่วยหรือลดความพิการได้ การติดเชื้อเพียงเล็กน้อยก็ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิกที่ต้องวินิจฉัยและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพในเชื้อทุกชนิด

ขอบเขต

ขั้นตอนการตรวจรับสิ่งตรวจ การเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลัง การอ่านผล การเพาะเชื้อ การรายงานผลเมื่อพบเชื้อจากการย้อมแกรม การรายงานผลเมื่อเสร็จสมบูรณ์

เชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลางมีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วย คือ

เด็กแรกคลอด : *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*

เด็กอายุต่ำกว่า 2 เดือน : *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*

เด็กอายุต่ำกว่า 10 ปี : *Hemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*

เด็กที่มีอายุมากกว่า 10 ปีและผู้ใหญ่

: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, gram negative bacilli

Listeria monocytogenes

วิธีปฏิบัติงาน

1. ตรวจดูลักษณะและปริมาณของ CSF
   1.1 ถ้ามีเลือดปะปนหรือมีความขุ่นให้บันทึกไว้
   1.2 ถ้ามีปริมาณมากกว่า 1 ml และใส ให้นำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 2,500 rpm นาน 15 นาที ใช้ pasteur pipette ปราศจากเชื้อ ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เหลือ CSF และตะกอนก้นหลอดประมาณ 0.5 ml เขย่าผสมตะกอนด้วย vortex mixer เพื่อใช้ย้อมและเพาะเชื้อต่อไป
   1.3 ถ้า CSF มีปริมาณน้อยกว่า 1 ml หรือขุ่นมาก ไม่ต้องปั่นทำการเพาะเชื้อได้เลย
2. ใช้ pasteur pipette ปราศจากเชื้อดูดตะกอน CSF หยดลงบน BA, CA, MAC plate ละ 1 หยด ส่วนที่เหลือใส่ใน FTM และทำ smear บน slide เพื่อย้อมแกรม โดยทำการตรวจให้เร็วที่สุด
3. streak plate ทั้ง 3 ชนิด นำไปบ่มที่ 35$\pm$2 ^{O}C นาน 3 วัน โดย BA และ CA บ่มในบรรยากาศ 5-10% CO_2 สำหรับ FTM ให้บ่ม ที่ 35$\pm$2 ^{O}C นาน 7 วัน

<u>ข้อควรระวัง</u>

1. ควรทำการเพาะเชื้อทันทีที่ได้รับสิ่งตรวจ ถ้าทำไม่ได้ให้เก็บในอุณหภูมิห้อง ห้ามเก็บในตู้เย็น
2. กรณีที่ได้ CSF ปริมาณน้อยไม่สามารถแบ่งหลายขวดเพื่อส่งตรวจจุลชีววิทยา ตรวจทางชีวเคมีและการตรวจนับและแยกชนิดของเซลล์ ให้เก็บ CSF ที่เจาะได้ทั้งหมดใส่ขวดเดียวแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาก่อน ทำการปั่นเพื่อนำตะกอนไปเพาะเชื้อและทำ direct examination เช่น ย้อมแกรม ทำ india ink แล้วจึงนำส่วนใสที่แยกได้ไปตรวจทางชีววิทยา

การอ่านผล

1. อ่านผลการย้อมแกรมทันที ถ้าพบเชื้อต้องรายงานผลแบบค่าวิกฤติ

2. ตรวจ plate ดูผลการเพาะเชื้อทุกวัน ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นให้อบต่อจนครบ 3 วัน ถ้ามีเชื้อขึ้นให้ย้อมแกรมและรายงานแพทย์ที่ดูแลผู้ป่วยทราบทางโทรศัพท์แบบค่าวิกฤติและทำการวินิจฉัยเชื้อทุกตัวและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

3. ตรวจดู FTM ทุกวัน อบจนครบ 7 วัน ถ้ามีลักษณะขุ่นสงสัยว่าน่าจะมีเชื้อขึ้น ให้ subculture บน BA, CA, MAC และย้อมแกรม ถ้าเชื้อที่ขึ้นเป็นชนิดเดียวกับที่ขึ้นใน primary plate ไม่จำเป็นต้องวินิจฉัยซ้ำ แต่ถ้าพบขึ้นใน FTM เท่านั้นให้ วินิจฉัยเชื้อรวมทั้งทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพโดยไม่ต้องระบุจำนวนเชื้อ ถ้า FTM ขุ่น เพาะเชื้อไม่ขึ้นในสภาวะปกติแต่ย้อมสีแกรมพบเชื้อให้สงสัยว่าอาจจะเป็น anaerobic bacteria ให้รายงานผลการย้อมแกรมพร้อมรูปร่างและควรส่งไปวิเคราะห์ต่อ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 74 1/14/58 BE 3:50 PM

การรายงานผล

1. ถ้าไม่พบเชื้อให้รายงานว่า “No growth after 3 days” (ตามแผนภูมิที่ 4.2-1)
2. ถ้าพบเชื้อจากการย้อมแกรมให้รายงานแพทย์ที่ทำการรักษาผู้ป่วยทางโทรศัพท์ทันที โดยทำการบันทึกการรายงานและชื่อผู้รับแจ้งผลไว้
3. ถ้ามีเชื้อขึ้น รายงานจำนวนเป็น numerous, moderate, few หรือ rare กรณีเชื้อขึ้นใน FTM อย่างเดียวให้รายงานชนิดของเชื้อโดยไม่ต้องบอกจำนวน และถ้าเชื้อขึ้นใน FTM หลังจากวันที่ 3 ไปแล้ว ให้รายงานผลเป็น additional report ตามไป

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อในน้ำไขสันหลังด้วยวิธี latex agglutination

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อที่เป็น capsular antigen ในน้ำไขสันหลังด้วยวิธี latex agglutination เป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่ใช้น้ำเจาะไขสันหลังเพื่อช่วยการวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบประสาทได้รวดเร็วกว่าการเพาะเชื้อ สามารถได้ผลภายในครึ่งชั่วโมง และการทดสอบนี้สามารถตรวจหาเชื้อที่จำเพาะชนิดได้ด้วย ชุดน้ำยา latex agglutination ใช้ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* type b, *Neisseria meningitidis*, *E. coli* K-1 และ *Streptococcus agalactiae* (Group B streptocoocci) สามารถใช้ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำไขสันหลังและน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกายได้ด้วย ข้อดีของวิธีนี้คือได้ผลรวดเร็ว มีความจำเพาะความไวสูง สามารถให้ผลดีกว่าการเพาะเชื้อโดยเฉพาะในรายที่ได้ยาปฏิชีวนะมาก่อนเก็บสิ่งตรวจ

การรายงานผล รายงาน latex agglutination negative หรือ positive ตามผลที่ได้และต้องระบุชนิดของเชื้อด้วย เมื่อได้ผลต้องรายงานแบบค่าวิกฤติ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 75 1/14/58 BE 3:50 PM

การเพาะเชื้อจากน้ำในส่วนต่างๆของร่างกาย

หลักการ

น้ำจากส่วนต่างๆจากร่างกาย เช่น น้ำจากข้อ (joint/synovial fluid) น้ำจากปอด (pleural fluid) น้ำจากช่องท้อง (peritoneal fluid) น้ำจากถุงหุ้มหัวใจ (pericardial fluid) ในภาวะปกติจะปราศจากเชื้อ การติดเชื้อในตำแหน่งดังกล่าวมีความสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับดูแลผู้ป่วย การเพาะเชื้อในตำแหน่งเหล่านี้อาจทำได้ยาก บางครั้งเชื้ออาจมีจำนวนน้อย ในผู้ป่วยที่ใส่สายต่างๆเข้าไปในร่างกาย ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน การเก็บสิ่งตรวจจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนเชื้ออื่นที่ไม่ได้เป็นเชื้อก่อโรคที่แท้จริง เชื้อทุกชนิดที่พบในสารน้ำที่ภาวะปกติปราศจากเชื้อถือว่ามีความสำคัญและต้องรายงานเชื้อทุกชนิดที่พบ

ขอบเขต

ขั้นตอนการตรวจรับสิ่งตรวจ การเพาะเชื้อจากน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกาย การอ่านผล การเพาะเชื้อ การรายงานผลเมื่อพบเชื้อจากการย้อมแกรม การรายงานผลเมื่อเสร็จสมบูรณ์

แบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบ่งตามประเภทของน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกายดังนี้

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบใน joint/synovial fluid ได้แก่

Staphylococcus aureus, β-hemolytic streptococci group A และ B (GAS, GBS), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* spp., Other streptococci, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella osloensis*, *Corynebacterium* spp. และ *Mycobacterium* spp.

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบใน pleural fluid ได้แก่

S. pneumoniae, *H. influenzae*, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, nonfermentative gram-negative bacilli, other streptococci, *M. tuberculosis* และ *Nocardia* spp.

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบใน pericardial fluid ได้แก่

S. aureus, *S. pneumoniae*, group A *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, other gram-negative bacilli และ *M. tuberculosis*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 76 1/14/58 BE 3:50 PM

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบใน peritoneal fluid ได้แก่ *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *S. aureus*, group A *Streptococcus*, coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) และ *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., anaerobic bacteria, และ nonfermentative gram-negative bacilli

สิ่งตรวจ

1. น้ำจากข้อ (joint/synovial fluid)
2. น้ำจากเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid)
3. น้ำจากถุงหุ้มหัวใจ (pericardial fluid)
4. น้ำจากเยื่อบุช่องท้อง (peritoneal fluid)

<u>ข้อควรระวัง</u> ควรทำการเพาะเชื้อทันทีที่ได้รับสิ่งตรวจ ถ้ายังทำไม่ได้ให้เก็บในอุณหภูมิห้อง ห้ามเก็บในตู้เย็น

วิธีปฏิบัติงาน

ใช้หลักการและวิธีการตรวจเช่นเดียวกับการเพาะเชื้อในน้ำไขสันหลัง โดยมีรายละเอียดเพิ่มเติม ในกรณีเก็บสิ่งตรวจไม่สามารถส่งห้องปฏิบัติการได้ทันที สามารถฉีด sterile body fluid 5 ml ใส่ในขวด hemoculture ได้

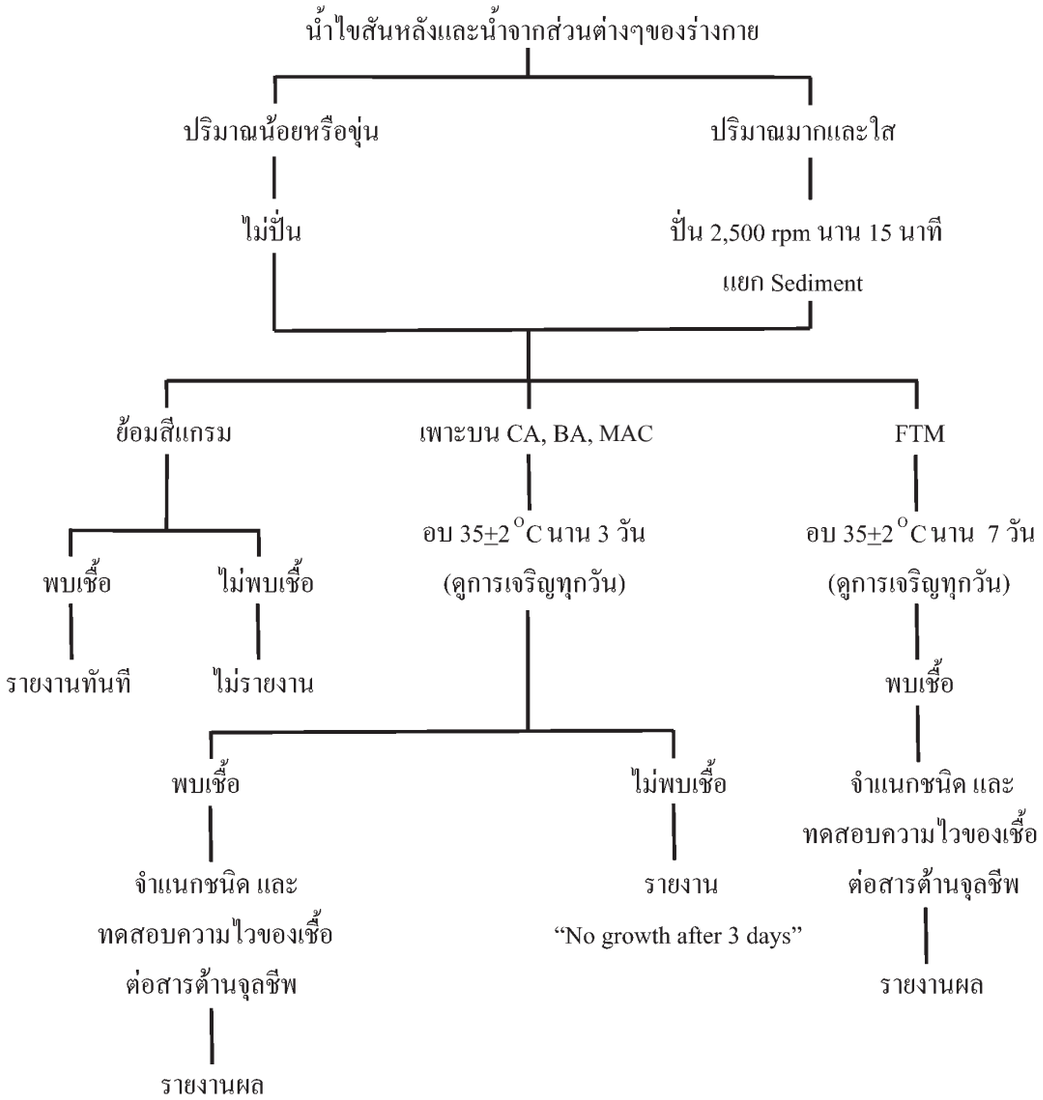
การตรวจวินิจฉัย peritoneal dialysis fluid (PDF) ในผู้ป่วยไตวาย ซึ่งล้างไตโดยการทำ peritoneal dialysis ทั้งในกรณี acute dialysis และในกรณีที่ทำ CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis) ผู้ป่วยจะได้รับการใส่น้ำยาล้างไตเข้าไปในช่องท้อง การตรวจ PDF ในผู้ป่วยเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาภาวะการติดเชื้อในช่องท้อง (peritonitis) อันเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อย เชื้อที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรีย มีส่วนน้อยที่เกิดจากเชื้อรา เชื้อที่พบเป็นสาเหตุได้บ่อย ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinotobacter* spp., *Enterobacteriaceae*

เนื่องจากปริมาณเชื้อที่พบในน้ำ PDF โดยทั่วไปจะมีน้อยมาก (น้อยกว่า 1 ตัว/10 ml ของ PDF) ดังนั้นแม้จะปั่นแล้วมาตรวจโดยการย้อมแกรมมักจะไม่พบเชื้อ การเพาะหาเชื้ออาจทำโดยนำ PDF มาไม่น้อยกว่า 10 ml ใส่ขวด hemoculture อย่างน้อย 5 ml และทำตามขั้นตอนการวินิจฉัยเช่นเดียวกับ hemoculture แต่มีข้อเสีย คือ เชื้อที่ต้องการเลือดในการเจริญเติบโตอาจไม่ขึ้นในขวดสำหรับเพาะเชื้อจากเลือด และต้องใช้เวลาในการรอคอยผลเพิ่มขึ้นอย่างน้อยอีกหนึ่งวัน เนื่องจากต้อง subculture เชื้อจากขวดเพาะเชื้อเพื่อนำโคโลนีของเชื้อมาทำการวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 77 1/14/58 BE 3:50 PM

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเชื้อจากน้ำ PDF ควรเก็บตัวอย่างน้ำ PDF 50 ml นำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 2,500 rpm นาน 30 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เหลือตะกอนก้นหลอดประมาณ 0.5 ml เขย่าผสมตะกอนด้วย vortex mixer เพื่อใช้ย้อมและเพาะเชื้อ

แผนภูมิที่ 4.2-1 ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยน้ำไขสันหลังและน้ำจากส่วนต่างๆของร่างกาย



<u>หมายเหตุ</u>

1. FTM ควรอบจนครบ 7 วัน ดูการเจริญทุกวัน ถ้ามีความขุ่นในส่วนล่าง อาจเป็น anaerobic bacteria ให้นำมาย้อมแกรม และเพาะบน BA ในบรรยากาศ CO_2 35 ± 2 °C นาน 2 วัน ถ้าไม่มีเชื้อขึ้น ให้รายงานผลการย้อมแกรมพร้อมรูปร่างและส่งเพาะเชื้อ anaerobic bacteria ต่อไป

14-0992(001-354)editnew060158.indd 78 1/14/58 BE 10:41 AM

2. ควรดูความสอดคล้องของผลเพาะเชื้อที่ได้สัมพันธ์กับการย้อมแกรมหรือไม่
3. ในรายที่สงสัยเชื้อราให้อบเพาะต่อจนครบ 1 สัปดาห์
4. ควรเก็บสไลด์ที่ย้อมแกรมเพื่อใช้ในการทวนสอบผลและสิ่งตรวจไว้ระยะหนึ่งในกรณีที่แพทย์อาจขอเพิ่มรายการทดสอบ เก็บ CSF ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เพื่อใช้ในกรณีที่แพทย์สั่งตรวจ PCR เพิ่ม

เอกสารอ้างอิง

1. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation of Sterile Body Fluids, Dialysate, and Urine. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 63-66.
2. York MK, Church DL. Cerebrospinal Fluid Culture. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 3.7.1-8.
3. มาลัย วรจิตร. แบคทีเรียก่อโรค: Pathogenic Bacteria. กรุงเทพฯ: สยามศิลปะการพิมพ์; 2545.
4. วรรณา เพ่งเรืองโรจนชัย. การเพาะเชื้อจากเลือด. ในคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. นนทบุรี: กองโรงพยาบาลภูมิภาค; 2540. หน้า 19-22.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 79 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.3 การเพาะเชื้อจากปัสสาวะ

สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์

หลักการ

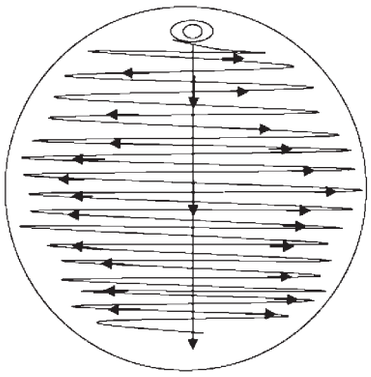
ปัสสาวะ เป็นสิ่งตรวจที่ส่งเพาะเชื้อในผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแต่มีความเสี่ยงสูงว่าอาจติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ เชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะส่วนใหญ่เป็นเชื้อเจริญเร็วเพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., และ *Pseudomonas* spp. ซึ่งพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากชุมชนและติดเชื้อในโรงพยาบาล

การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคจากปัสสาวะ สามารถใช้วินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งต้องทราบชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจึงต้องทำการเพาะเชื้อ เพื่อหาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ และตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่พบในสิ่งตรวจนั้นด้วย

ในภาวะปกติปัสสาวะเป็นน้ำจากร่างกายที่ปราศจากเชื้อถ้าเก็บอย่างถูกต้อง แต่อาจปนเปื้อนเชื้อจากบริเวณที่ปัสสาวะผ่านออกมาหรือที่อยู่ข้างเคียง เช่น perineum, prostate, urethra หรือ vagina จึงควรมีรายละเอียดในการเก็บปัสสาวะให้ผู้รับบริการ (ดูวิธีการเก็บจากบทที่ 2) ตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเชื้อส่วนใหญ่ใช้ midstream urine

วิธีปฏิบัติงาน

1. **การทำ colony count โดยใช้ standard calibrated loop**
   1.1 นำขวดที่บรรจุสิ่งตรวจมาเขย่าเบาๆให้ปัสสาวะเป็นเนื้อเดียวกัน
   1.2 ใช้ calibrated loop ขนาด 0.001 ml หรือ 0.01 ml จุ่มในแนวดิ่งลงในสิ่งตรวจแล้วยก loop ขึ้นตรงๆจะได้สิ่งตรวจติดเต็ม loop พอดี
   1.3 นำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BA โดย streak เป็นเส้นตรงบริเวณกลางจานเพาะเชื้อ จากด้านบนจนถึงด้านล่าง จากนั้นให้นำ loop เดิมขีดเป็นเส้นตรงให้ตั้งฉากกับแนวเดิม ขีดไปมาถี่ๆ หลายๆ ขีด คล้ายก้างปลา ดังภาพที่ 4.3-1



ภาพที่ 4.3-1 วิธีการเพาะปัสสาวะบน BA

1.4 ทำการเพาะเชื้อลงบน MAC โดย streak ด้วย loop ปราศจากเชื้อให้โคโลนีแยกกัน

1.5 อบจานเพาะเชื้อที่ 35 ^{o}C นาน 24 ชม. แล้วนำมาตรวจดูและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ให้อบจานเพาะที่สงสัยยีสต์หรือเชื้อราจนครบ 48 ชม. จึงนับจำนวนโคโลนี

1.6 อบจานเพาะเชื้อครบ 24 ชม. แล้วไม่พบเชื้อแบคทีเรีย หรือครบ 48 ชม. แล้วไม่พบยีสต์หรือเชื้อรา รายงาน “No growth after 1 (or 2) day”

1.7 อบจานเพาะเชื้อครบ 24 ชม. แล้วพบเชื้อแบคทีเรีย หรือครบ 48 ชม. แล้วพบยีสต์หรือเชื้อรา ทำการนับชนิดและจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบน BA แล้วรายงานผลเป็นจำนวน colony forming unit ในปัสสาวะ 1 ml (CFU/ml)

การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในปัสสาวะ ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบน BA โดยถ้าใช้ calibrated loop ปริมาตร 0.001 ml ให้คูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วย 1,000 แต่ถ้าใช้ calibrated loop ปริมาตร 0.01 ml ให้คูณจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ด้วย 100 จะได้จำนวนแบคทีเรียมีหน่วยเป็น CFU/ml เช่นใช้ calibrated loop ขนาด 0.001 ml นับเชื้อได้ 1 โคโลนี ให้รายงานเชื้อ = 10^3 CFU/ml

ตารางที่ 4.3-1 การคำนวณจำนวนโคโลนีที่นับได้เมื่อใช้ loop เทียบมาตรฐาน 0.001 ml

จำนวน โคโลนีที่นับได้	จำนวนเชื้อที่รายงานเป็น CFU/ml
1	10^3
10	10^4
100	10^5
>100	$>10^5$

1.8 นำเชื้อที่เพาะได้ colony count ตามเกณฑ์ในตารางที่ 4.3-1 ไปตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 81 1/14/58 BE 3:50 PM

2. การเพาะเชื้อ และทำ colony count โดยใช้ Bacteruristrip

2.1 เขย่าปัสสาวะเบาๆให้ปัสสาวะเป็นเนื้อเดียวกัน

2.2 ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบแถบ Bacteruristrip จุ่มลงในปัสสาวะให้ถึงขีดที่กำหนดไว้ รอให้ปัสสาวะดูดซับเข้ากระดาษกรองประมาณ 5 วินาที

2.3 แตะ Bacteruristrip ลงบน plate อาหารเลี้ยงเชื้อ BA กดให้ส่วนที่เปียกปัสสาวะแนบสนิทกับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 10 วินาที แล้วยกขึ้น นำแถบที่จุ่มปัสสาวะทิ้งแบบขยะติดเชื้อ (บริเวณนี้สำหรับทำ colony count)

2.4 ใช้แถบ bacteruristrip อีกแผ่นจุ่มปัสสาวะแล้วนำไปแตะบน BA plate เดียวกันบนตำแหน่งห่างจากรอยแรก และแตะบน MAC แล้ว streak ด้วย loop ปราศจากเชื้อให้โคโลนีแยกกัน

2.5 อบ plate ที่ 35 ^{o}C นาน 24 ชม. แล้วนำมาตรวจดูและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้าไม่พบเชื้อแบคทีเรียให้อบต่ออีก 24 ชม. แล้วนำมาอ่าน plate ใหม่ และนับจำนวนโคโลนี

ตารางที่ 4.3-2 การคำนวณจำนวนโคโลนีที่นับได้เมื่อใช้ Bacteruristrip

จำนวน โคโลนีที่นับได้	จำนวนเชื้อที่รายงานเป็น CFU/ml
1-6	10^3
7-20	10^4
21-34	10^5
≥ 35	$>10^5$

2.6 นำเชื้อที่เพาะ colony count ได้ตามเกณฑ์ในตารางที่ 4.3-2 ไปตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

การอ่านผล

การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในปัสสาวะ ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบน BA โดยถ้าใช้ calibrated loop ปริมาตร 0.001 ml ให้คูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วย 1,000 แต่ถ้าใช้ calibrated loop ปริมาตร 0.01 ml ให้คูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วย 100 จะได้จำนวนแบคทีเรียมีหน่วยเป็น CFU/ml

14-0992(001-354)editnew130158.indd 82 1/14/58 BE 3:50 PM

ถ้าใช้ paper strip ให้นับชนิดและจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนรอย streak แล้วเทียบเป็นจำนวน colony forming unit ในปัสสาวะ 1 ml และรายงานผลเป็น CFU/ml ถ้ามีเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด ให้นับโคโลนีและรายงานแต่ละชนิดแยกกัน ถ้ามีเชื้อเจริญบน BA และ MAC หากเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ให้นับและรายงานผลจำนวนโคโลนีจาก BA

เชื้อที่ขึ้นน้อยกว่า 10^4 CFU/ml ไม่ต้องแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อและไม่ทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ยกเว้น *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella* spp. และ *Burkholderia pseudomallei* ต้องทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเสมอแม้ colony count น้อยกว่า 10^4 หรือ 10^3 CFU/ml

การรายงานผล

1. การรายงานผลเมื่อไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงาน “No growth after 2 days”
2. การรายงานผลเมื่อพบเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้รายงานจำนวนเชื้อที่พบเป็น CFU/ml ตามด้วยชื่อเชื้อ และผลความไว (ถ้ามี) เช่น 10^5 CFU/ml of *Escherichia coli*
3. กรณีที่พบเชื้อหลายชนิด ($\geq$ 3 ชนิด) ให้รายงานว่า “Mixed culture, please repeat”

การแปลผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะ เพาะได้เชื้อหนึ่งชนิดที่มีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 10^5 CFU/ml ถือว่ามีนัยสำคัญ บ่งชี้ถึงภาวะการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจากเชื้อที่เพาะได้ ในเด็กและผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกหรือเพาะเชื้อได้ชนิดเดียว หรือพบเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะร่วมด้วยอาจใช้เกณฑ์พบเชื้อน้อยกว่า 10^4 CFU/ml เป็นนัยสำคัญบ่งชี้การติดเชื้อ ถ้าพบเชื้อหลายชนิดปนกันในปริมาณใกล้เคียงกันมักบ่งชี้การปนเปื้อนและไม่มีความสำคัญทางคลินิก การติดเชื้อหลายชนิดผสมกันอาจพบได้แต่ไม่บ่อยจึงควรส่งตัวอย่างตรวจซ้ำ ตัวอย่างที่เก็บโดยตรงจากสายสวนไตหรือจากการเจาะกระเพาะปัสสาวะอาจใช้เกณฑ์พบเชื้อปริมาณน้อยกว่า 10^2 CFU/ml เป็นนัยสำคัญในการแปลผลการติดเชื้อเมื่อพิจารณาร่วมกับอาการทางคลินิก เนื่องจากการแปลผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะที่มีวิธีการเก็บที่ต่างกันใช้เกณฑ์ที่ต่างกันดังแสดงในตาราง 4.3-3 ทางห้องปฏิบัติการจึงต้องทราบวิธีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ และต้องระบุวิธีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะในใบรายงานผลเสมอ

การเพาะเชื้อแบคทีเรียจากปัสสาวะต้องทำทันทีหลังเก็บปัสสาวะ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในน้ำปัสสาวะถ้าทิ้งไว้นานเกิน 1 ชม. จะทำให้ปริมาณของเชื้อเพิ่มมากกว่าความเป็นจริงและมีผลต่อการแปลผลการตรวจ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 83 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 4.3-3 เกณฑ์พิจารณานำเชื้อไปแยกวินิจฉัยชนิดและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จากปัสสาวะ

จำนวนชนิดของเชื้อที่เพาะได้ในสิ่งตรวจ	Colony count (CFU/ml)	การแยกวินิจฉัยชนิดและการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ	
		ปัสสาวะ ชนิด A Midstream urine	ปัสสาวะ ชนิด B Catheter urine
1 ชนิด	$\geq 10^5$	ID และ AST	ID และ AST
	10^4	Ignore ID และ AST*	ID และ AST
	10^3	Ignore ID และ AST**	ID และ AST ถ้าเป็น Pathogen
2 ชนิด	เชื้อแต่ละชนิด $\geq 10^5$	ID และ AST ทั้งสองชนิด	ID และ AST
	เชื้อชนิดแรก $\geq 10^5$	ID และ AST	Ignore ID และ AST ถ้าเป็น Pathogen (โดยทั่วไปเชื้อก่อโรคมีตัวเดียว)
	เชื้อชนิดที่สอง $< 10^5$	Ignore	
	เชื้อแต่ละชนิด $< 10^5$	Ignore	
3 ชนิด	เชื้อแต่ละชนิด $\geq 10^5$	Mixed organisms > 3 types โปรดส่งตรวจซ้ำ	Mixed organisms > 3 types โปรดส่งตรวจซ้ำ
	เชื้อชนิดแรก $\geq 10^5$	ID และ AST	Ignore ID และ AST ถ้าเป็น Pathogen (โดยทั่วไปเชื้อก่อโรคมีตัวเดียว)
	เชื้อชนิดที่สอง $< 10^5$	Ignore	
	เชื้อชนิดที่สาม $< 10^5$	Ignore	
	เชื้อแต่ละชนิด $< 10^5$	Mixed organisms > 3 types โปรดส่งตรวจซ้ำ	Mixed organisms > 3 types โปรดส่งตรวจซ้ำ

ชนิด A คือ Midstream urine, neonatal bagged urine, indwelling catheter (Foley catheter urine, ileal conduit urine suprapubic catheter) และ ชนิด B คือ In and out catheter urines, suprapublic-tapped urine

ID = Identification, AST = Antimicrobial susceptibility test

Ignore = ไม่ต้องแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อและไม่ทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ยกเว้น *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella* spp., และ *Burkholderia pseudomallei* ต้องทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเสมอแม้ colony count น้อยกว่า 10^4 หรือ 10^3 CFU/ml

* = เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ได้รับสารต้านจุลชีพ หรือผู้ป่วยชายที่มีอาการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ

** = เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 84 1/14/58 BE 3:50 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Infection of the Urinary Tract. In: Bailey& Scott's Diagnostic Microbiology, 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2007. p. 842-855.
2. Microbiology Department. Procedure Manual of Mount Sinai Hospital/ Toronto Medical Laboratories Shared Microbiological Service: Section Urine culture manual; Toronto: Mount Sinai Hospital; 2004.
3. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation of Urine Cultures. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 95-101.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 85 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.4 การเพาะเชื้อจากอุจจาระ/Rectal Swab

สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
สุจิตรา มานะกุล

หลักการ

สิ่งตรวจที่ได้จากทางเดินอาหารเช่นอุจจาระหรือ rectal swab เป็นสิ่งตรวจที่มีเชื้ออื่นๆ นอกเหนือจากเชื้อก่อโรคปนเปื้อนจำนวนมาก เพราะเป็นแหล่งที่มีเชื้อ normal flora หลากหลายชนิดในปริมาณมาก มีทั้ง gram-positive bacteria และ gram-negative bacteria และเชื้อก่อโรคที่พบอาจมีปริมาณเพียงเล็กน้อย การเพาะเชื้อจึงต้องมีขั้นตอนการทำ enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อก่อโรค และต้องมีขั้นตอนเพาะเชื้อด้วย selective media เพื่อลดปริมาณ normal flora จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อก่อโรค

การติดเชื้อของทางเดินอาหารอาจมีสาเหตุจากจุลชีพต่างๆ ในการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุอุจจาระร่วงในงาน routine ควรคำนึงถึงเชื้อที่พบได้บ่อยและสามารถเพาะได้ง่าย แม้ว่าแบคทีเรียบางชนิดอาจพบได้ในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับสารต้านจุลชีพชนิด broad-spectrum เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* บทบาทในการทำให้เกิดอุจจาระร่วงยังไม่ชัดเจน การตรวจพบเชื้อเหล่านี้จำนวนมากในอุจจาระ อาจรายงานให้ผู้ใช้บริการ โดยระบุด้วยว่าพบเป็น predominate microorganism

ขอบเขต

การรับสิ่งตรวจ คุณภาพอุจจาระ หรือ rectal swab ที่ส่งเพาะเชื้อ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ วิธีการเพาะเชื้อ การอ่านผล และการรายงานผล

การเก็บสิ่งตรวจ

สิ่งตรวจสำหรับเพาะเชื้อจากระบบทางเดินอาหารมีสองชนิดคือ อุจจาระและการป้ายอุจจาระที่ปนเปื้อนบริเวณรอบๆรูทวารหนักที่เรียกว่า rectal swab

1. อุจจาระ (feces, stool):

1.1 <u>การเก็บตัวอย่าง</u>

1.1.1 เก็บอุจจาระบริเวณที่ผิดปกติ เช่น เหลว เป็นมูกเลือด เป็นต้น ประมาณ 2 g

1.2 <u>ภาชนะบรรจุ</u>

1.2.1 ขวดหรือกระปุกสะอาด ปากกว้าง ฝาเกลียวปิดสนิท ส่งให้ถึงห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชม.ที่อุณหภูมิห้อง

1.2.2 เก็บใส่ Cary-Blair transport medium โดยใช้ไม้ swab ป้ายอุจจาระประมาณ 2 g จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มิด swab นำส่งทันที กรณีที่จำเป็นควรส่งภายในภายใน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

2. Rectal swab

2.1 <u>การเก็บตัวอย่าง</u>

2.1.1 ใช้ไม้พันสำลีสอดเข้ารูทวารหนัก ลึกประมาณ 1 นิ้ว

2.1.2 หมุนไม้พันสำลีรอบก้นแบบปาด เพื่อให้ได้เนื้ออุจจาระ

2.1.3 ดึงไม้พันสำลีออก ควรเห็นเนื้ออุจจาระติดบนสำลีจึงจะเป็นการเก็บตัวอย่างที่ดี

2.2 <u>ภาชนะบรรจุ</u>

2.2.1 นำไม้พันสำลีที่เก็บอุจจาระได้ใส่ขวดสะอาดนำส่งทันที กรณีที่จำเป็นควรส่งให้ถึงห้องตรวจภายใน 1 ชม.

2.2.2 Rectal swab ที่ใส่ใน Cary-Blair transport medium นำส่งทันที กรณีที่ไม่สามารถส่งทันทีควรส่งภายใน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

<u>ข้อควรระวัง</u>

1. การเก็บอุจจาระเพื่อเพาะเชื้อก่อโรค ไม่แนะนำให้ทำในผู้ป่วยที่นอนในโรงพยาบาลมากกว่า 3 วัน หากผู้ป่วยนอนในโรงพยาบาลมากกว่า 3 วัน และมีอาการอุจจาระร่วงควรคำนึงถึงเชื้อ *Clostridium difficile*
2. อุจจาระที่ต้องเพาะเชื้อควรเป็นที่ถ่ายใหม่ๆ ไม่ควรเก็บไว้นานเนื่องจากเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงโดยเฉพาะ *Vibrio cholerae* ตายง่ายในอุณหภูมิ ที่สูงกว่า 30 ^{o}C
3. การเก็บ rectal swab ให้ทำเฉพาะในผู้ป่วยเด็ก สำหรับผู้ใหญ่ควรเก็บเป็นอุจจาระ ยกเว้นกรณีที่เก็บอุจจาระไม่ได้ การเพาะเชื้อจากอุจจาระมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงมากกว่าสิ่งตรวจที่เป็น rectal swab เพราะมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าและสิ่งตรวจอาจแห้งเกินไปจนเชื้อตาย

14-0992(001-354)editnew130158.indd 87 1/14/58 BE 3:50 PM

4. อุจจาระที่นำส่งเพาะเชื้อนานเกิน 2 ชม. ต้องใส่ใน Cary-Blair transport medium เพื่อรักษาไม่ให้เชื้อตาย โดยเฉพาะ *Campylobacter* และ *Vibrio* spp. และควรลดปริมาณ agar ใน Cary-Blair medium จาก 0.5% เป็น 0.16% สำหรับเชื้อ *Campylobacter* spp. และเชื้อทั้งสองชนิดที่กล่าวนี้ไม่สามารถเก็บรักษาใน transport medium ที่มี glycerol

แบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella* spp.
- *Enterobacter*
- *Proteus*
- *Citrobacter*
- *Morganella*
- *Providencia*
- *Seratia*
- *Pseudomonas*
- *Alcaligenes faecalis*
- *Lactobacillus*
- Enterococci
- Anaerobic bacteria
- Coagulase-negative staphylococci

แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่

1. Infectious diarrhea
   - *Salmonella* spp.
   - *Shigella* spp.
   - *Vibrio* spp.
   - *Aeromonas* spp.
   - *Plesiomonas shigelloides*
   - *Yersinia enterocolitica*
   - *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC)
   - *Campylobacter jejuni*
   - *Campylobacter coli*
   - *Campylobacter* spp.
   - *Clostridium difficile*
   - *Clostridium perfringens*
   - *Bacillus cereus*
2. Toxin producing
   - *Staphylococcus aureus*
   - *Bacillus cereus*
   - *Clostridium botulinum*
3. กระเพาะอาหารอักเสบหรือแผลที่กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น (gastritis, gastric and duodenal ulcers)
   - *Helicobacter pylori*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 88 1/14/58 BE 3:50 PM

การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินอาหารเพื่อหาเชื้อก่อโรค

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง ต้องมีหลายชนิดเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพจึงต้องเพาะเลี้ยงทั้งในอาหารเหลวและอาหารวุ้นพร้อมกันทั้งที่เป็นอาหาร enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อก่อโรคที่จำเพาะ และต้องมีขั้นตอนเพาะเชื้อด้วย selective media เพื่อลดปริมาณ normal flora เมื่ออาหารเหลวมีเชื้อขึ้นต้องนำมาเพาะแยกเชื้อบนอาหารวุ้น เพื่อนำโคโลนีของเชื้อมาแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีดังนี้

1. Enriched media: BA
2. Differential media: MAC
3. Selective media: SS, XLD และ TCBS
4. Enrichment media: GN broth และ APW

ตารางที่ 4.4-1 เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ	อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม
Salmonella spp., *Shigella* spp.	GN broth, XLD, MAC MSRV และ GN broth ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* spp.
Vibrio spp.	APW, TCBS
Yersinia enterocolitica	*Yersinia* selective agar base, Bile esculin agar
Campylobacter spp.	BA base No.2, *Campylobacter* selective medium

1. ป้ายอุจจาระหรือ rectal swab ลงบน BA, MAC, SS หรือ XLD และ TCBS ให้ได้โคโลนีแยกจากกัน
2. ใส่สิ่งตรวจใน GN broth, APW และ BPW
3. นำจานเพาะเลี้ยงและหลอดอาหารเหลวทั้งหมดอบที่ 35-37 ^{o}C เป็นเวลา 18-24 ชม. สำหรับ APW อบ 6-8 ชม. และอบ BPW ที่ 42 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม.
4. เพาะเชื้อจาก APW ลงบน TCBS, เพาะเชื้อจาก GN broth ลงบน SS อบที่ 35-37 ^{o}C เป็นเวลา 18-24 ชม. และเพาะเชื้อจาก BPW ลงบน MSRV อบที่ 42 ^{o}C เป็นเวลา 18-24 ชม.
5. ตรวจเชื้อที่ขึ้นบนอาหารแต่ละชนิดเพื่อนำโคโลนีบน SS และ MSRV ที่สงสัย *Salmonella* หรือ *Shigella* และโคโลนีสีเหลืองและสีเขียวบน TCBS ไปทดสอบแยกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี

14-0992(001-354)editnew130158.indd 89 1/14/58 BE 3:50 PM

6. นำเชื้อบน TSI ที่สงสัย *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* O1 และ *Vibrio cholerae* O139 ไปทำ slide agglutination test กับ antiserum ที่จำเพาะต่อเชื้อเพื่อรายงานผลขั้นต้น

7. ทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเฉพาะเชื้อก่อโรค

8. รายงานผลการเพาะเชื้อและผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

แบคทีเรียก่อโรคที่ตรวจพบ

Shigella เป็น non-hydrogen sulfide producing nonlactose fermenter *Enterobacteriaceae* มี 4 species 4 serogroups คือ *S. dysenteriae* group A, *S. flexneri* group B, *S. boydii* group C และ *S. sonnei* group D

Salmonella ส่วนใหญ่เป็น nonlactose fermenter ที่สร้าง hydrogen sulfide ยกเว้น serovar Arizona ที่มัก ferment lactose และ serovar Paratyphi-A ที่ไม่สร้าง hydrogen sulfide *Salmonella* เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ อาหารเป็นพิษ และโลหิตเป็นพิษ ได้แก่ *S.* Paratyphi-A, *S.* Paratyphi-B, *S.* Paratyphi-C, *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Choleraesuis, *S.* Typhi และ *S.* Arizona

Vibrio เป็น gram-negative curved rod ลักษณะแท่งโค้งงอคล้าย comma-shape ให้ผล oxidase บวก *V. cholerae* มีหลาย serogroup แต่ที่ทำให้เกิดอหิวาตกโรคที่มีอาการท้องร่วงรุนแรงคือ serogroup O1 และ O139 serogroup O1 ยังแบ่งเป็น biotype Classical และ El tor สำหรับ serogroup อื่นมักเรียกว่าเป็น non agglutination *Vibrio* หรือ NAG-*Vibrio* ทำให้เกิดท้องเสียธรรมดาหรือติดเชื้อในระบบอื่นๆของร่างกาย *Vibrio* species ที่ก่อโรคได้บ่อยคือ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของอาหารทะเลเป็นพิษ และ *V. vulnificus* เป็น lactose fermenter *Vibrio* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่แผล และโลหิตเป็นพิษรุนแรงถึงแก่ชีวิต

Aeromonas เป็นแท่งตรง curve rod หรือ coccobacilli ที่ให้ผล oxidase บวก แยกได้จากน้ำจืด น้ำกร่อย ที่สกปรก และแผลของสัตว์น้ำ *A. hydrophila* เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษและการติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหาร *A. caviae* และ *A. veronii* biovar *sobria* เป็นเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกัน

Plesiomonas shigelloides ทำให้เกิดโรคเช่นเดียวกับ *Aeromonas* มีลักษณะผลการทดสอบทางชีวเคมี และ O antigen คล้ายกับ *Shigella sonnei* มาก แต่ *P. shigelloides* เคลื่อนที่ และให้ผล arginine dihydrolase, lysine และ ornithine decarboxylase เป็นบวก

Campylobacter และ *Helicobacter* รูปร่างเป็น pleomorphic spiral, half spiral คล้าย S-shape, gull wing shape หรือ comma shape อาจพบเป็นแท่งหรือ coccoid เป็น microaerophilic เจริญในบรรยากาศที่มี CO_2 3-5% และมี O_2 3-15% เชื้อที่พบก่อโรคระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นๆในคนได้บ่อย คือ *C. jejuni*, *C. coli* เจริญที่ 42 ^{o}C ได้ดี *C. fetus* ติดต่อจากสัตว์มาสู่คนทำให้เกิดโลหิตเป็นพิษ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 90 1/14/58 BE 3:50 PM

Helicobacter pylori ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงแต่ทำให้เกิดแผลที่กระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนต้น gram-negative half spiral bacilli หรือ gull wing shape เจริญแบบ microaerophilic ที่ 37 ^{o}C ในบรรยากาศที่มี O_2 5%, CO_2 10% และ N_2 85% สามารถเพาะเชื้อใน microaerophilic condition ใน anaerobe incubation jar ที่ไม่มี catalyst แต่ supplement ด้วย gas-generating agent การเพาะเชื้อต้องกรองอุจจาระที่ผสมกับน้ำเกลือ 1 ml โดยหยดลงบนกระดาษกรองขนาด 0.65 μm ที่วางบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ อบที่ 37 ^{o}C นาน 1 ชม. ในภาวะ microaerophilic เพื่อกรองเอาเชื้ออื่นๆออกไปให้มีแต่เชื้อ *Campylobacter* spp. อยู่บนผิววุ้น โดยดึงแผ่นกระดาษกรองออกแล้วบ่มจานเพาะเลี้ยงต่อที่ 42 ^{o}C ในภาวะ microaerophilic

การรายงานผล

1. กรณีพบเชื้อก่อโรค ให้รายงานผลชื่อเชื้อ และผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ (ยกเว้น *S. aureus* เพราะเชื้อนี้ไม่สร้าง toxin ในลำไส้)

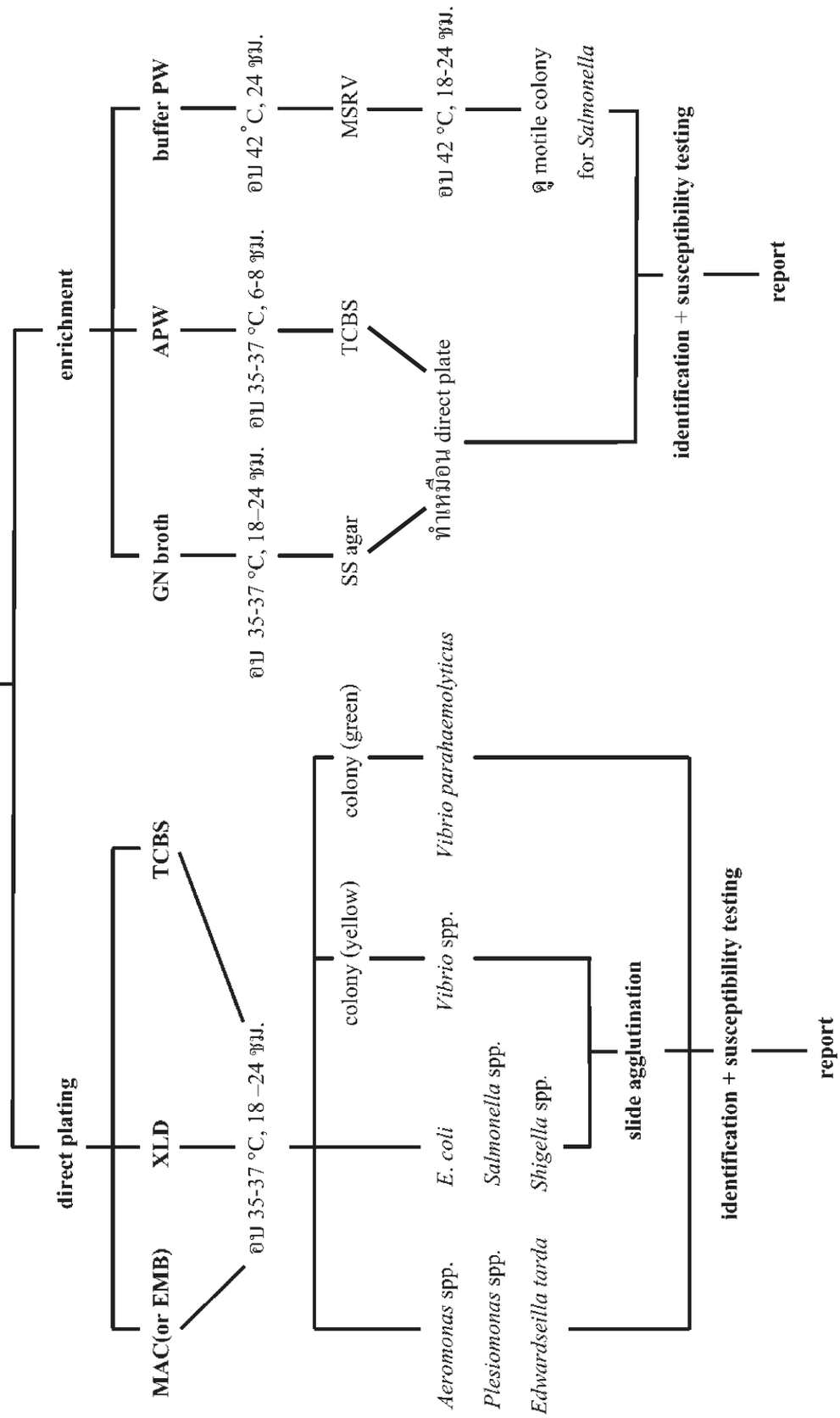
2. กรณีไม่พบเชื้อก่อโรค รายงาน

"No *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Aeromonas* or *Plesiomonas* isolated"

หากพบเชื้อก่อโรค *Salmonella* spp., *Shigella* spp. หรือ *Vibrio cholerae* หลังการทำ serum grouping ให้เก็บเชื้อใส่ NA ส่งตรวจยืนยัน และทำ strain typing ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์หรือกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อเฝ้าระวังการระบาดในระดับประเทศและนานาชาติ สำหรับเชื้อ *Vibrio cholerae* เมื่อพบต้องรายงานด่วนไปยังหน่วยงานที่ส่งตัวอย่างและงานควบคุมโรคติดเชื้อ เพื่อสอบสวนและเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา

14-0992(001-354)editnew130158.indd 91 1/14/58 BE 3:50 PM

แผนภูมิที่ 4.4-1 ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัย เชื้อจากอุจจาระ/rectal swab



14-0992(001-354)editnew060158.indd 92 1/14/58 BE 10:41 AM

เอกสารอ้างอิง

1. Abbott S.L, Janda JM Farmer III J J. *Vibrio* and Related Organisms. In Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock Dw, editor. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.666-676.
2. Atlas RM, Synder JW. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.272-303.
3. Baron EJ, Thomson RB. Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.228-271.
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae*, http://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Vibrio-cholerae-chapter-6.pdf.
5. Garcia, L.S., 2010, *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition.* ASM Press
6. Hornema, AJ, Ali A. *Aeromonas.* In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML,Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.658-665.
7. Jones TF, Keene WE. Investigation of Enteric Disease Outbreaks. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML,Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.85-99.
8. Linscott AJ. Specimen Collection, Transport, and Acceptability. In: Garcia LS. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010. P 2.1.1-2.1.26.
9. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation of Bacterial Fecal Cultures. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 90-94.
10. ภารดี สมานชัย. การวินิจฉัยแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหาร ในคู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป.กรุงเทพมหานคร:สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2540.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 93 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.5 การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินหายใจ

สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร

หลักการ

การเพาะเชื้อจากลำคอส่วนใหญ่ใช้วินิจฉัย Streptococcal pharyngitis และคอตีบ แบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของ pharyngitis ที่พบบ่อยคือ *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*; GAS) การเพาะเชื้อในงาน routine จึงควรเป็นวิธีที่สามารถแยกเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ที่มีจำนวนน้อยๆได้ คอตีบเป็นโรคติดเชื้อเฉียบพลันของทางเดินหายใจส่วนบน เชื้อที่เป็นสาเหตุคือ *Corynebacterium diptheriae* ชนิดที่สร้างสารพิษ (toxin) ซึ่งทำให้เกิด pseudomembrane ที่ pharynx การยืนยันอาการทางคลินิกนอกจากจะแยกเชื้อให้ได้แล้วต้องพิสูจน์ว่าเชื้อสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ได้ด้วย

แม้การติดเชื้อของทางเดินหายใจส่วนล่างพบเป็นสาเหตุการตายและพิการ แต่การวินิจฉัยโรคมีความยุ่งยากเพราะสิ่งตรวจมีการปนเปื้อนเชื้อประจำถิ่นของระบบทางเดินหายใจส่วนบน ซึ่งเชื้อประจำถิ่นเหล่านี้บางชนิดอาจเป็นสาเหตุการติดเชื้อของทางเดินหายใจส่วนล่าง ห้องปฏิบัติการจึงต้องแน่ใจว่าสิ่งตรวจที่นำมาตรวจเป็นสิ่งตรวจที่เหมาะสม โดยต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูคุณภาพของสิ่งตรวจโดยดูเซลล์ที่แสดงว่ามีการอักเสบของระบบทางเดินหายใจคือ polymorphonuclear cells

ขอบเขต

การรับสิ่งตรวจ คุณภาพสิ่งตรวจจากทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่างที่ส่งเพาะเชื้อ วิธีการเพาะเชื้อ การอ่านผลและการรายงานผล

การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินหายใจส่วนบน

สิ่งตรวจจากทางเดินหายใจส่วนบน มีดังนี้

1. สิ่งตรวจป้ายจากลำคอ (throat swab) ป้ายจากโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) เก็บใส่ใน Amies/Stuart's transport media (กรณีหาเฉพาะเชื้อ *S. pyogenes* หรือ *C. diphtheriae* ซึ่งทนต่อความแห้งได้ดี สามารถส่งในลักษณะไม้พันสำลีแห้งๆใส่ในหลอดหรือภาชนะปราศจากเชื้อนำส่งภายใน 1 วัน

2. สิ่งตรวจที่เป็น sinus aspirate, tracheal suction, nasopharyngeal suction ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
3. สิ่งตรวจที่เป็น tracheal suction, nasopharyngeal suction ส่งมาในรูป tip (ท่อยาง) ใน transport media

<u>แบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินหายใจส่วนบน</u> ได้แก่

- α-hemolytic streptococci
- Non-hemolytic streptococci
- *Haemophilus haemolyticus*
- *Staphylococcus* coagulase-negative
- Yeast (รวม *Candida albicans*)
- Anaerobes
- *Neisseria* spp. ที่ไม่ใช่ *Neisseria gonorrhoeae*
- *Moraxella catarrhalis*
- Non-group A β-hemolytic streptococci
- Coliform bacilli
- Diphtheroids
- Spirochetes

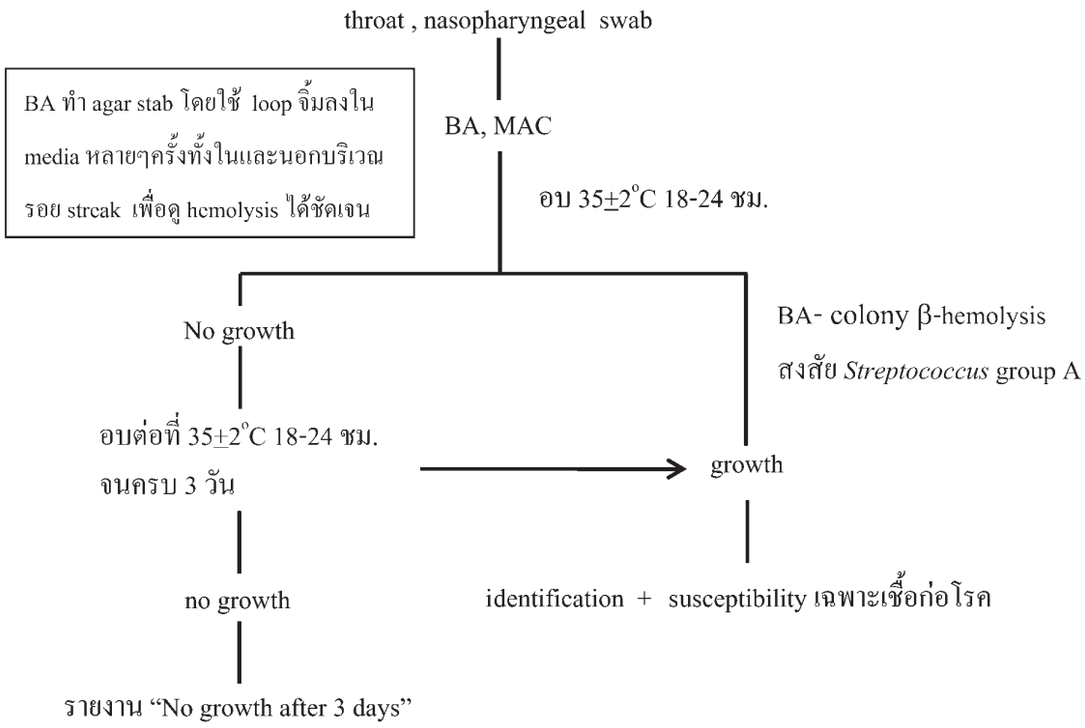
<u>แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนบน</u> ได้แก่

- β-hemolytic streptococcus group A
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Neisseria meningitidis* (carrier)
- *Bordetella pertussis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*
- Predominate gram-negative bacilli
- *Burkholderia pseudomallei*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Bordetella parapertussis*
- *Staphylococcus aureus*

เชื้อราก่อโรค เช่น *Candida albicans*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 95 1/14/58 BE 3:50 PM

แผนภูมิที่ 4.5-1 ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก throat swab และ nasopharyngeal swab



กรณีต้องการหาแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดโดยเฉพาะ	**อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม**
(แพทย์ระบุเพิ่มในใบส่งตรวจเพื่อเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่ม)	
- หาเชื้อ *C. diphtheriae* ก่อให้เกิดโรคคอตีบ*	CTBA*
- หาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ก่อให้เกิด gonococcal pharyngitis **	MTM
- หา carrier ของเชื้อ *N. meningitidis* ในลำคอ **	MTM
- หาเชื้อ *H. influenzae* ในคอของเด็กที่เก็บเสมหะไม่ได้ **	CA***
- หาเชื้อ *B. pertussis* ก่อโรคไอกรน	BG

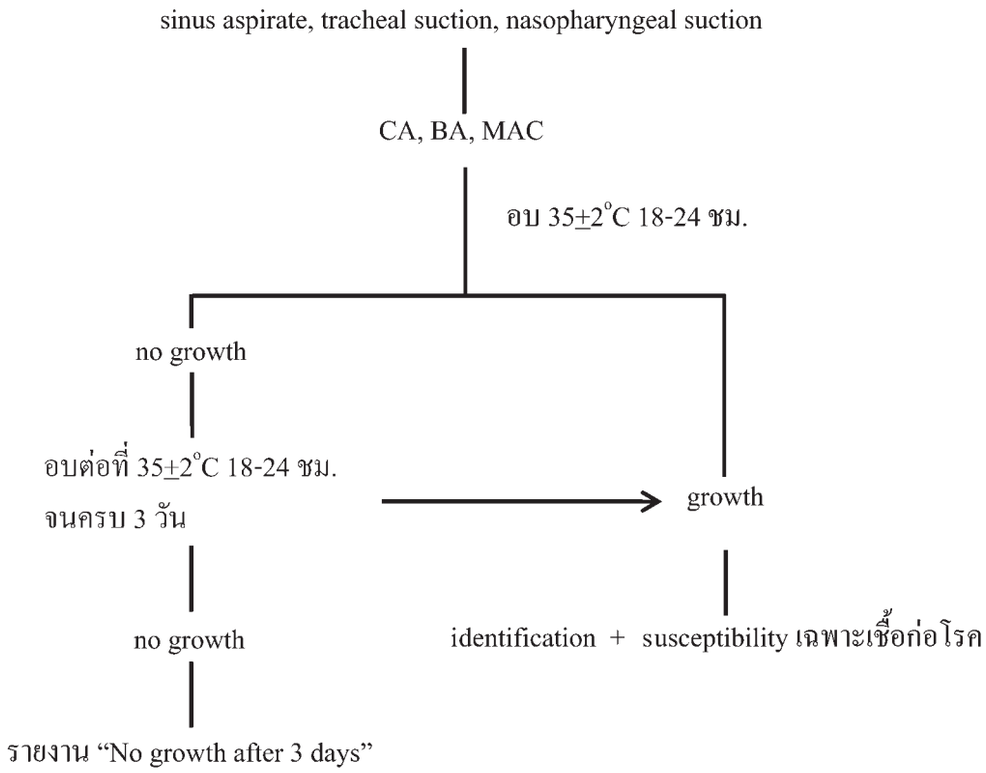
* *C. diphtheriae* โคโลนีสีดำบน CTBA พิสูจน์เชื้อแล้วต้องตรวจว่ามีการสร้าง exotoxin หรือไม่

** *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* ต้องทดสอบหา enzyme β-lactamase ด้วย

*** ถ้าไม่มี CA ให้ใช้เชื้อ *S. aureus* ขีดบน BA ที่ปลายระนาบแรกและที่ระนาบสุดท้าย ก่อนนำไปอบในบรรยากาศ 5% CO_2 หรือ candle jar

14-0992(001-354)editnew130158.indd 96 1/14/58 BE 3:50 PM

แผนภูมิที่ 4.5-2 ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก sinus aspirate, tracheal suction, nasopharyngeal suction



วิธีการเพาะเชื้อจาก throat swab, nasopharyngeal swab

1. ป้าย swab ลงบน BA, MAC และอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มเติม (ถ้ามี) อย่างละ 1 plate โดยหมุน swab ขณะป้ายเพื่อให้เชื้อลงบนอาหารให้มากที่สุด
2. Streak plate 4 ระนาบ เพื่อให้ได้โคโลนีที่แยกจากกัน นำไปอบที่ 35 ± 2 °C นาน 3 วัน โดย BA, CA และ MTM บ่มในบรรยากาศ 5-10% CO_2 หรือใส่ใน candle jar

วิธีการเพาะเชื้อจาก sinus aspirate, tracheal suction, nasopharyngeal suction

ใช้ pasteur pipette ปราศจากเชื้อดูดสิ่งตรวจ หยดลงบน CA, BA , MAC plate ละ 1หยด streak plate และนำไปอบที่ 35 ± 2 °C สำหรับ CA ให้เพาะในบรรยากาศ 5% CO_2

(กรณีส่งมาในรูป tip หรือท่อยางใน transport media ให้คีบชิ้นสายยางใส่ลงใน BHI หรือ TSB ประมาณ 3 ml แล้วนำไป mix ด้วย mixer เพื่อให้เชื้อหลุดออกมา จากนั้นไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 97 1/14/58 BE 3:50 PM

การอ่านผล

1. หลังอบที่ 35 ± 2 °C 18-24 ชม. แล้วตรวจดูว่ามีเชื้อเจริญหรือไม่ หากไม่มีเชื้อเจริญให้อบต่ออีกจนครบ 3 วันแล้วรายงาน "No growth after 3 days"
2. plate ที่มีเชื้อเจริญให้ตรวจดูว่าเชื้อที่เจริญมีความสำคัญหรือไม่ โดยพิจารณาชนิดและปริมาณเชื้อที่เจริญเปรียบเทียบกับเชื้ออื่น แล้วทำการวินิจฉัยเชื้อที่อาจเป็นสาเหตุของโรค โดยรายงานจำนวนเชื้อ (numerous, moderate, few หรือ rare) ชนิดของเชื้อ และทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเฉพาะเชื้อที่น่าจะเป็นสาเหตุ ส่วนเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ตามปกติไม่ต้องทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

การรายงานผล

1. กรณีไม่พบการเจริญของจุลชีพใดๆหลังการอบนาน 3 วัน ให้รายงานว่า "No growth after 3 day"
2. กรณีตรวจพบแต่เชื้อประจำถิ่น ไม่พบเชื้อก่อโรคที่ต้องการตรวจหา ให้รายงานว่า "No pathogenic bacteria isolated"
3. กรณีพบเชื้อก่อโรคได้แก่ β-hemolytic *Streptococcus* group A, *C. diphtheriae*, *N. meningitidis* และ *B. pertussis* ให้รายงานปริมาณเชื้อ ชื่อเชื้อ และผลทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ยกเว้นเชื้อ *Streptococcus* group A ไม่ต้องทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

โดยปกติ ระบบทางเดินหายใจส่วนล่างจะไม่มีแบคทีเรียประจำถิ่น แต่ในการเพาะเชื้ออาจพบเชื้อบางชนิดซึ่งเป็นจุลชีพประจำถิ่นในลำคอและช่องปากได้ เช่น

- α-hemolytic streptococci (Viridans streptococci)
- β-hemolytic streptococci not group A
- Low number of gram-negative bacilli
- *Neisseria* spp.
- *Corynebacterium* spp.
- *Lactobacillus* spp.

แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ได้แก่

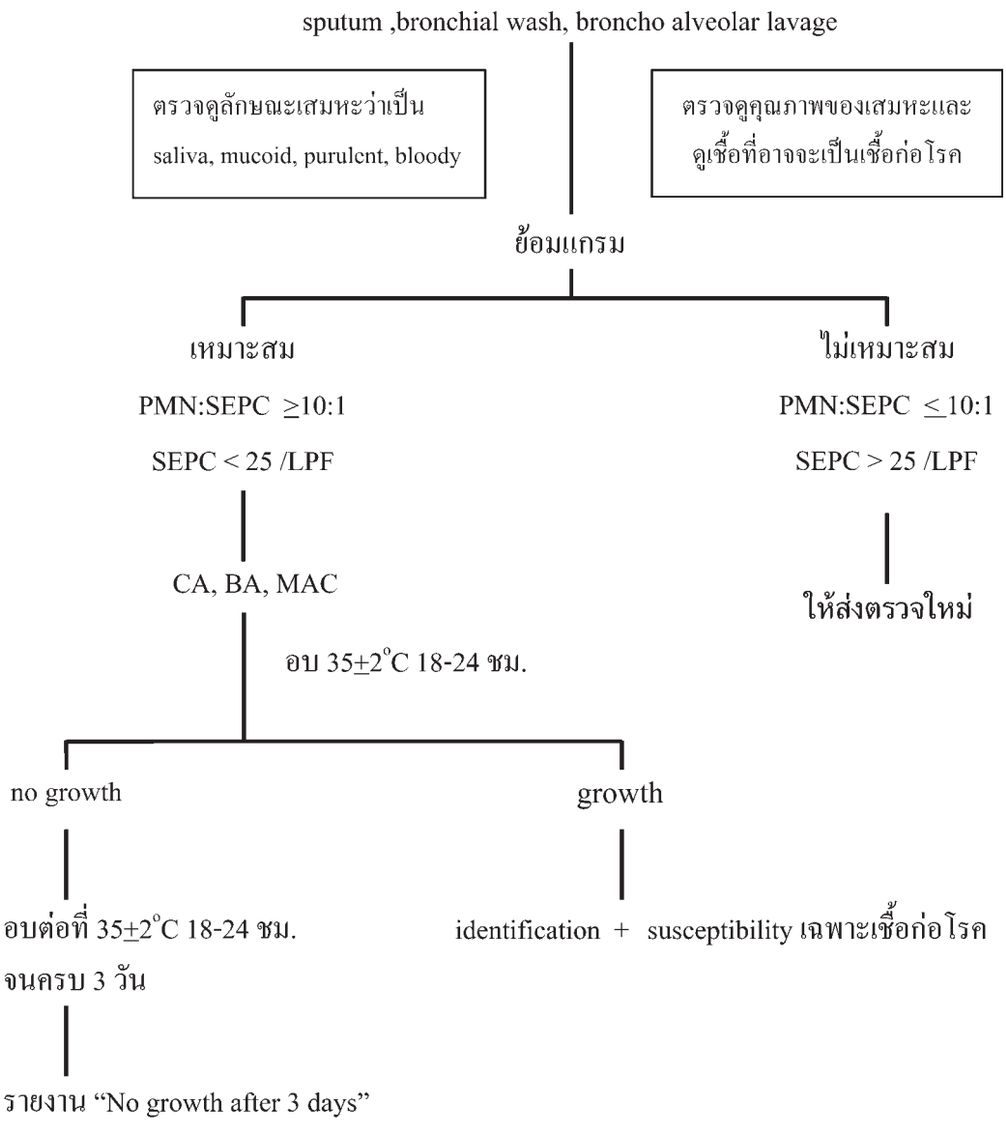
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Nocardia asteroides*
- *Haemophilus influenzae*
- *Burkholderia pseudomallei*
- *Pasteurella multocida*
- *Moraxella* (*Brahamella*) *catarrhalis*
- เชื้อ gram-negative bacilli ที่มีจำนวนตั้งแต่ moderate ขึ้นไป

14-0992(001-354)editnew130158.indd 98 1/14/58 BE 3:50 PM

ชนิดของสิ่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

ได้แก่ sputum, lung biopsy หรือ aspirate, tracheal suction และ bronchial wash

แผนภูมิที่ 4.5-3 ขั้นตอนการเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก sputum และ bronchial wash



กรณีเสมหะเหนียวข้น สามารถละลายเสมหะด้วย N-acetyl-L-cysteine (Fluimucil) ในอัตราส่วน 4:1 และสามารถทำการเจือจางใน sterile normal saline เพื่อหาปริมาณของเชื้อได้ (quantitative culture)

การเพาะเชื้อจากเสมหะและไม่พบเชื้อใดให้คิดถึงเชื้อที่ต้องการอาหารเพาะเชื้อหรือวิธีการเพาะเชื้อพิเศษ เช่น *Mycobacteria*, *Actinomycetes*, Fungus, Virus, Rickettsiae, *Chlamydia* และ *Mycoplasma*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 99 1/14/58 BE 3:50 PM

ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก sputum และ bronchial wash

1. ตรวจดูและบันทึกลักษณะเสมหะ (sputum) หรือ bronchial wash ว่าเป็นแบบใด
   - mucoid (เป็นมูก)
   - purulent (เป็นหนอง)
   - murco-purulent (มูกปนหนอง)
   - blood-stained (มีเลือดปน)
   - salivary (เหมือนน้ำลาย)

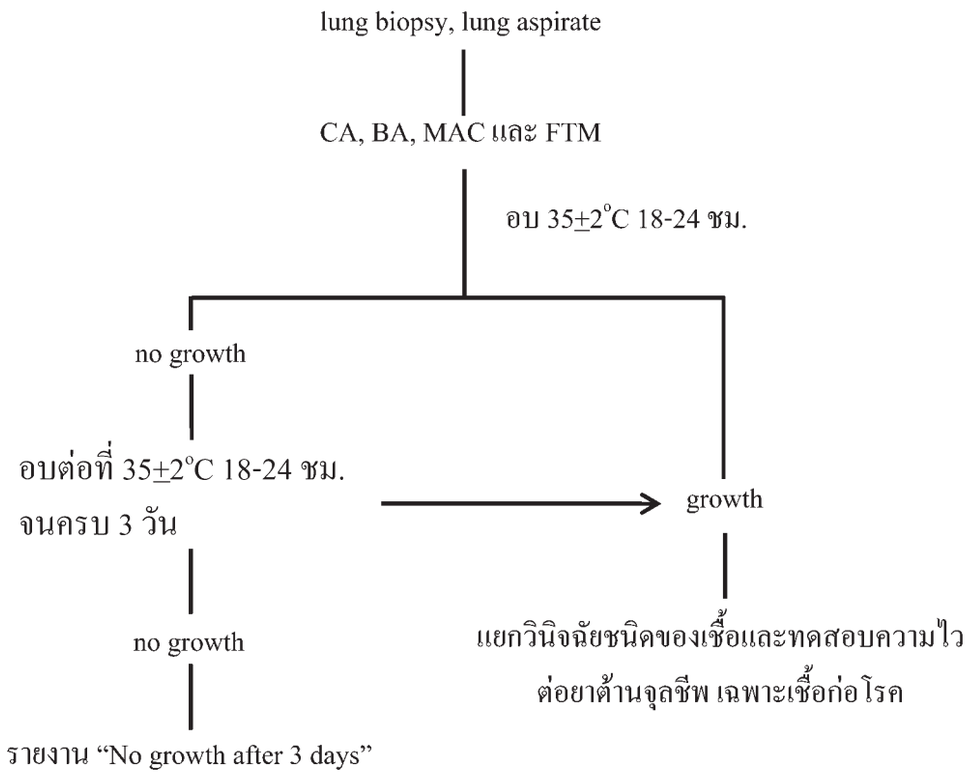
แล้วทำการย้อมแกรมทันทีเพื่อตรวจสอบดูความเหมาะสมของสิ่งตรวจโดยยึดหลักเกณฑ์ ดังนี้

<u>เสมหะที่เหมาะสม</u>	ควรมี PMN จำนวนมากแต่มี squamous epithelial cells (SEPC) จำนวนน้อย PMN:SEPC $\geq$ 10:1 หรือ epithelial cells < 25 cells/LPE เสมหะที่มีน้ำลายปนบ้าง ให้เลือกบริเวณที่เป็นเนื้อเสมหะเพื่อย้อมแกรมและเพาะเชื้อ
<u>เสมหะที่ไม่เหมาะสม</u>	เป็นน้ำลาย ไม่พบ PMN หรือพบน้อย มี epithelial cells มาก PMN:SEPC $\leq$ 10:1 หรือ epithelial cells > 25 cells/LPF เสมหะที่เก็บมาผิดวิธี อาจเก็บมาเป็น swab ต้องแจ้งผู้ส่งตรวจเพื่อเก็บมาใหม่ให้ถูกต้อง

2. สิ่งตรวจที่เหมาะสม เพาะลง CA, BA, MAC โดยเรียงลำดับก่อนหลัง, สำหรับ plate CA และ BA ให้อบในบรรยากาศ CO_2 ที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 ^{o}C 18-24 ชม.
3. หลังอบนาน 24 ชม. แล้ว ตรวจดูว่ามีเชื้อเจริญหรือไม่ หากไม่มีเชื้อเจริญ ให้อบต่อจนครบ 3 วัน ถ้าตรวจไม่พบเชื้อ ให้รายงาน “No growth after 3 days”
4. plate ที่มีเชื้อเจริญให้ตรวจดูว่าเชื้อมีความสำคัญหรือไม่ โดยพิจารณาชนิดและปริมาณเชื้อที่ขึ้นเปรียบเทียบกับเชื้ออื่น แล้วทำการวินิจฉัยเชื้อที่อาจเป็นสาเหตุของโรค โดยรายงานจำนวนเชื้อ (numerous, moderate, few หรือ rare) ชนิดของเชื้อ และทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเฉพาะเชื้อที่น่าจะเป็นสาเหตุ ส่วนเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ตามปกติไม่ต้องทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ
5. กรณีที่พบเชื้อเพียงชนิดเดียวจำนวนมากให้วินิจฉัยและรายงานแม้จะเป็นเชื้อประจำถิ่นหรือเชื้อรา

14-0992(001-354)editnew130158.indd 100 1/14/58 BE 3:50 PM

แผนภูมิที่ 4.5-4 ขั้นตอนการเพาะเชื้อจาก lung biopsy และ lung aspirate



1. ในกรณีที่เป็น lung biopsy ให้นำสิ่งตรวจบดในโกร่งปราศจากเชื้อ (ควรทำใน biohazard safety cabinet) อาจใช้ทรายละเอียดปราศจากเชื้อลงไปช่วยในการบด แล้วใช้ pasteur pipette ปราศจากเชื้อดูดสิ่งตรวจที่บดแล้ว หยดใส่ plate ละ 1 หยด ที่เหลือใส่ FTM และทำ smear เพื่อย้อมแกรม ถ้าเป็น lung aspirate ให้ทำการเพาะเชื้อได้เลยโดยไม่ต้องบด
2. การเพาะเชื้อ การอ่านผล และการรายงานผล ทำเช่นเดียวกับ sputum โดยเพิ่มการลงสิ่งตรวจที่เหลือใน FTM เพื่อหา anaerobic bacteria
3. FTM ควรอบจนครบ 7 วัน ดู growth ทุกวัน ถ้ามีความขุ่นในส่วนล่าง อาจเป็น anaerobes ให้นำมาย้อมแกรม และเพาะบน BA, MAC นาน 2 วัน : ถ้าพบเชื้อจากการย้อมแกรมแต่ไม่มีเชื้อเจริญ ให้รายงานผลการย้อมแกรมพร้อมรูปร่างและส่งต่อห้องปฏิบัติการที่เพาะ anaerobic bacteria ได้ ถ้ามีเชื้อเจริญทำการจำแนกชนิดและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ พร้อมกับรายงานผล กรณีที่พบเชื้อเพียงชนิดเดียวให้วินิจฉัยและรายงานแม้จะเป็นเชื้อประจำถิ่นหรือเชื้อรา

14-0992(001-354)editnew130158.indd 101 1/14/58 BE 3:50 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Church DL. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation of Respiratory Tract Cultures. In: Garcia LS editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. p.320-408.
2. Keizo M, Tsuyoshi N. Clinical Microbiology of Respiratory Infections. Nagasaki: Nagasaki University; 1994.
3. จารุภรณ์ กลิ่นแก้วณรงค์. การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินหายใจ. ใน: คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรีย สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. นนทบุรี:กองโรงพยาบาลภูมิภาค; 2540. หน้า 31-37.
4. นิชา เจริญศรี. การเพาะเชื้อจากระบบทางเดินหายใจ. ใน: วิภาวี แมนมนตรี, อรุณวดี ชนะวงศ์, โชติชนะ วิลัยลักษณคณา บรรณาธิการ. การตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและราวิทยา. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2521. หน้า 15-17.
5. มาลัย วรจิตร. แบคทีเรียก่อโรค: Pathogenic Bacteria. กรุงเทพมหานครฯ: สยามศิลปการพิมพ์; 2545.
6. ภัทรชัย กีรติสิน. ตำราแบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพมหานครฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549. หน้า 98-100, 206-209.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 102 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.6 การเพาะเชื้อจากระบบสืบพันธุ์

สมชัย หลกภิชาติ
อนุชาติ จ๋อมแปง

ระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์มีจุลชีพหลายชนิดที่เป็นเชื้อประจำถิ่นเกาะอยู่ที่ผิวของเซลล์ เชื้อประจำถิ่นพบที่ปลายเปิดองคชาต (surface of penis) และในช่องคลอด (vagina) การติดเชื้อระบบสืบพันธุ์มีสาเหตุจากเชื้อจุลชีพหลายประเภททั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ปรสิต ได้แก่

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Treponema pallidum*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Mycoplasma hominis*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Candida albicans*
- *Molluscum contagiosum*
- Human Papilloma Virus (HPV)
- Herpes Simplex Virus (HSV)
- Human Immunodeficiency Virus (HIV)
- Anaerobic bacteria (*Mobiluncus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp.)

สำหรับเชื้อก่อโรคที่สามารถติดเชื้อจากแม่สู่ลูก ได้แก่ *Streptococcus* group B (*Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes* ด้านสรีรวิทยาการติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์เพศหญิงจะมีการติดเชื้อได้ง่ายและบ่อยกว่าในเพศชาย

บทนี้จะกล่าวถึงสิ่งตรวจของระบบสืบพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเชื้อ อาหารและวิธีการเพาะเชื้อที่จำเพาะสำหรับแต่ละเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจ การอ่านผลและการรายงานผล โดยมุ่งเน้นการ

เพาะเชื้อก่อโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่สามารถเพาะเชื้อได้ ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล สำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรคที่ห้องปฏิบัติการไม่มีวิธีการอยู่ควรส่งต่อห้องปฏิบัติการอ้างอิง

สิ่งตรวจ

สิ่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ urethral swab, vaginal swab, cervical swab, endocervical swab, genital ulcer swab หรืออื่นๆ ควรเก็บด้วย Dacron swab ปลอดเชื้อ ใส่ Stuart's หรือ Amies transport medium ที่เติมหรือไม่เติม charcoal สิ่งตรวจที่เก็บต้องติดฉลากระบุชื่อผู้ป่วย วันที่เก็บตัวอย่าง ชนิดของสิ่งตรวจ และรีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที ห้ามเก็บที่ 4 ^{o}C ควรเก็บสิ่งตรวจ 2 ชุด สำหรับเพาะเชื้อและย้อมแกรม กรณีส่งตรวจ wet smear ให้ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อเก็บสิ่งตรวจใส่น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 1 ml

วิธีปฏิบัติงาน

1. ตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของสิ่งตรวจ ชื่อผู้ป่วย ชนิดสิ่งตรวจ ปริมาณ และวันที่เก็บตัวอย่าง
2. นำสิ่งตรวจเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA, BA, MTM, และ MAC ตามลำดับ ควรเพาะเชื้อทันทีหรือภายใน 20 นาที หลังรับสิ่งตรวจ กรณีที่แพทย์ส่งตรวจหาเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ควรเพาะเชื้อใน LIM broth (Todd-Hewitt broth ที่มี 10 µg/ml colistin และ 15 µg/ml nalidixic acid) ซึ่งเป็น selective media ก่อนเพาะบนจานเพาะเชื้อ จะช่วยให้ตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น
3. ป้ายสิ่งตรวจบนสไลด์หลังจากเพาะเชื้อ เพื่อนำมาย้อมแกรม ตรวจดูปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว และ clue cell เพื่อช่วยวินิจฉัยเชื้อก่อโรคจาก normal flora ในเบื้องต้น
4. นำจานเพาะเชื้อ (และ LIM broth กรณีตรวจหา *Streptococus agalactiae*) ไปอบ ที่ 35-37 ^{o}C ในบรรยากาศ 5 % CO_2 หรือใน candle jar ที่วางสำลีชุบน้ำให้ความชื้น
5. หลังจากอบนาน 18-24 ชม. อ่านผลการเพาะเชื้อบน CA, BA และ MTM ถ้าไม่มีเชื้อเจริญให้อบจนครบ 72 ชม. ยกเว้น ย้อมแกรมพบ coccobacilli มีลักษณะเรียงตัวแบบฝูงปลาว่ายตามกัน (“school of fish”) ให้อบจนครบ 5 วัน

   กรณี LIM broth ให้เพาะเชื้อ บน BA นำไปอบ ที่ 35-37 ^{o}C ในบรรยากาศ 5 % CO_2 หรือใน candle jar ที่วางสำลีชุบน้ำให้ความชื้น อบนาน 48 ชม. ถ้าไม่มีเชื้อเจริญให้อบจนครบ 72 ชม.
6. ตรวจแยกชนิดของเชื้อก่อโรค และทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ
7. หากตรวจพบเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ไม่ต้องทดสอบการผลิตเอนไซม์ β-lactamase เนื่องจากการรักษาในปัจจุบันใช้ยาที่ออกฤทธิ์ทำลายเอนไซม์ β-lactamase

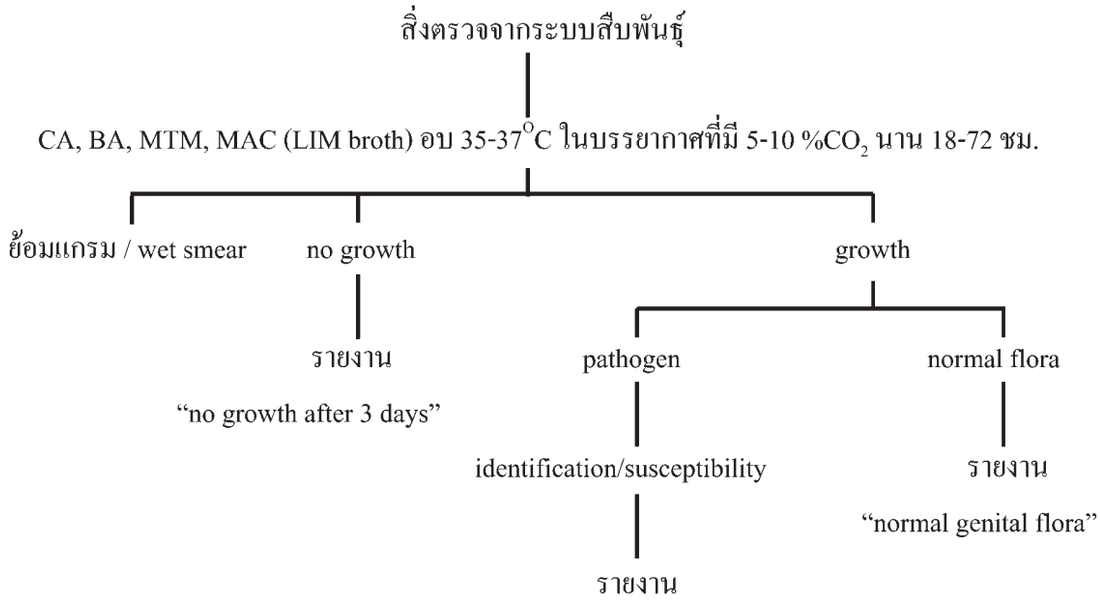
14-0992(001-354)editnew130158.indd 104 1/14/58 BE 3:50 PM

การย้อมแกรมจากสิ่งตรวจโดยตรงมีประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยโรคหนองใน (gonorrhea) จากเชื้อ *N. gonorrhoeae* ถ้าพบ gram-negative diplococci intra และ extra polymorphonuclear (PMN) cells ร่วมกับ PMN ที่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งตรวจจากระบบสืบพันธุ์เพศหญิง นอกจากนี้ยังช่วยในการวินิจฉัยโรค bacterial vaginosis ได้ โดยจะพบ lactobacilli ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีจำนวนมากจะลดลง ทำให้ pH ในช่องคลอดสูงขึ้น (pH > 4.5) เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ *Gardnerella vaginalis* และเชื้อก่อโรคอื่นๆ ซึ่งจะมี metabolism ได้สารประกอบพวกเอมีนและกรดอินทรีย์ ทำให้มีกลิ่นเหม็นคล้ายคาวปลา (fishy odor) และกลิ่นจะชัดขึ้นเมื่อหยด 10% KOH เนื่องจาก *Gardnerella vaginalis* เป็น normal flora ด้วย จึงต้องใช้ปริมาณที่พบเพื่อประกอบการพิจารณาว่า เป็นเชื้อก่อโรคร่วมด้วย คือ มีเชื้อเจริญ 3 ใน 4 บนอาหารที่ไม่ใช่ selective media (เช่น CA)

นอกจากนี้กรดอินทรีย์ยังทำให้เซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่มี gram-negative bacilli และ gram variable bacilli หลุดออกมาเป็นตกขาว (vaginal discharge) เมื่อย้อมแกรมก็จะพบลักษณะที่เรียกว่า clue cell

การตรวจสิ่งตรวจโดยตรงด้วยวิธี wet smear มีประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Trichomonas vaginalis*, budding yeast cells และ clue cells ได้

แผนภูมิที่ 4.6-1 ขั้นตอนการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในระบบสืบพันธุ์



14-0992(001-354)editnew130158.indd 105 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 4.6-1 การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในระบบสืบพันธุ์

เชื้อก่อโรค	การวินิจฉัยเบื้องต้น	การวินิจฉัยเพื่อแยกชนิดของเชื้อ
Neisseria gonorrhoeae	1. เจริญบน MTM และ CA ลักษณะโคโลนี ขนาดเล็ก สีเทาขอบเรียบเหนียว ไม่เจริญบน BA และ TSA 2. ติดสีแกรมลบ เป็น diplococci 3. oxidase บวก 4. catalase บวก โดยใช้ 30% H_2O_2	CTA : glucose บวก, lactose ลบ, maltose ลบ
Haemophilus ducreyi	1. เชื้อต้องการ hemin (X factor) จึงเจริญบน CA เท่านั้น หรืออาจเจริญรอบ staphylococci colony บน BA ลักษณะโคโลนี สีเทานูน ผิวเรียบ อาจเยิ้ม 2. ติดสีแกรมลบ coccobacilli ขนาดเล็ก 3. catalase ลบ oxidase บวกช้า (15-20 วินาที)	ย้อมแกรมพบลักษณะเรียงตัวแบบฝูงปลาว่ายตามกัน (“school of fish”)
Streptococcus group B (*Streptococcus agalactiae*)	1. เจริญบน CA และ BA ลักษณะโคโลนี เล็ก ใสให้ β-hemolysis มีโซนแคบ 2. ติดสีแกรมบวก cocci เรียงตัวเป็นคู่ หรือสาย 3. catalase ลบ	CAMP บวก hippurate บวก PYR ลบ
Gardnerella vaginalis	1. ลักษณะโคโลนี เล็ก ให้ β-hemolysis 2. ติดสีแกรม variable coccobacilli หรือ rod ขนาดเล็กมาก 3. catalase ลบ	hippurate บวก พบ clue cell
Listeria monocytogenes	1. เจริญบน CA และ BA ลักษณะโคโลนี เล็ก แบน สีเทาขาวให้ β-hemolysis มีโซนแคบ 2. ติดสีแกรมบวก rods 3. catalase บวก 4. motile (tumbling) in wet mount	bile-esculin บวก CAMP บวก motility บวกที่ 25 °C เป็นรูปร่มกาง แต่ลบที่ 35 °C
Yeast cells	เจริญบน CA และ BA ลักษณะโคโลนี สีครีม สีขาว มีกลิ่นขนมปัง ขอบโคโลนียื่น	*Candida albicans* ให้ germ tube บวก

การอ่านผล

อ่านผลการเพาะเชื้อที่ 18-24 ชม. ถ้าไม่เจริญให้อบต่อจนครบ 72 ชม. และอ่านผล CA, BA และ MTM

14-0992(001-354)editnew130158.indd 106 1/14/58 BE 3:50 PM

การรายงานผล

1. กรณีไม่มีเชื้อเจริญให้รายงาน “no growth after 3 days”
2. กรณีมีเชื้อประจำถิ่นเจริญให้รายงาน “normal genital flora” และประเมินจำนวนเชื้อ
3. กรณีมีเชื้อก่อโรคเจริญให้รายงานชนิดของเชื้อก่อโรคทุกชนิดที่พบ และประเมินจำนวนเชื้อ (rare หรือ 1+, few หรือ 2+, moderate หรือ 3+, many(numerous) หรือ 4+) พร้อมผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

เอกสารอ้างอิง

1. Baron EJ, et. al. Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology, 9th ed. Missouri: Mosby; 1994. p. 258-73.
2. Braude AL, et. al. Infectious Diseased and Medical Microbiology, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1986. p. 1009-59.
3. Mary K. York, Sharon L. Hillier, and Deirdre L. Church. Guidelines for Performance of Genital Cultures. In: GS Lynne (ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd edition. ASM Press, Washington DC; 2010. p. 3.9.1.1-3.9.4.5
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH editors. Manual of Clinical Microbiology 7th ed. Washington, DC: ASM Press; 1999. p. 64-104, 777-806.
5. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation of Genital Cultures. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 81-89.
6. กลุ่มโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์, สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์, กรมควบคุมโรค, กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการชันสูตรโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์. กรุงเทพมหานครฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2541.
7. วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอุรุเลิศ, สุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์, พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานครฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. หน้า 159-71.
8. วรรณา เพ่งเรืองโรจนชัย. การเพาะเชื้อจากเลือด. ใน: คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. นนทบุรี: กองโรงพยาบาลภูมิภาค; 2540. หน้า 19-22
9. สวรรยา พงศ์ปริตร. แบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์. ปทุมธานี: ศูนย์เทคโนโลยีทางการศึกษา มหาวิทยาลัยรังสิต; 2556.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 107 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 4
ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ
4.7 การเพาะเชื้อจากหนอง แผล ฝี ต่างๆ

หัทยา ธัญจรูญ

หลักการ

จุลชีพที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อของแผลฝีต่างๆ อาจเป็นเชื้อประจำถิ่นของผิวหนัง mucous membrane และสิ่งแวดล้อม โดยผ่านเข้าสู่บริเวณที่ภาวะปกติปราศจากเชื้อทางผิวหนังหรือ mucous membrane เพราะในการก่อโรคจุลชีพเหล่านี้อาจไม่ต้องใช้ virulence factor ก็ได้ ในการแปลผลการเพาะเชื้อจึงต้องอิงเกณฑ์ผลการย้อมแกรมและการปรึกษาร่วมกับแพทย์

สิ่งตรวจ

1. หนองจากแผลลึกหรือฝีที่ได้จากการเจาะดูด เป็นสิ่งตรวจที่ดีรองจากชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัด เนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนจากจุลชีพประจำถิ่น
2. หนองและสิ่งคัดหลั่งที่ได้จากบริเวณติดเชื้อระหว่างการผ่าตัด
3. Swab เป็นสิ่งตรวจที่มีคุณภาพด้อยที่สุด เนื่องจากมีปริมาตรของสิ่งตรวจน้อยและมีโอกาสปนเปื้อนมาก

การรับสิ่งตรวจ

ขั้นตอนการรับสิ่งตรวจ ประกอบด้วยการตรวจสอบดังนี้

1. การตรวจสอบวิธีการนำส่ง (การป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ อุณหภูมิ ระยะเวลา การปนเปื้อน) และวิธีการเก็บรักษา

2. การตรวจสอบข้อมูลที่สำคัญ ได้แก่ ชื่อ อายุ เพศ เลขที่ผู้ป่วย แพทย์ผู้ส่งตรวจ เวลาที่เก็บสิ่งตรวจ ชนิดและตำแหน่งสิ่งตรวจ รายการส่งตรวจ เป็นต้น โดยข้อมูลต้องถูกต้องตรงกันทั้งใบส่งตรวจและสิ่งตรวจ

3. การตรวจสอบคุณภาพสิ่งตรวจทั้ง macroscopic (ปริมาณ ชนิดภาชนะนำส่งสิ่งตรวจ ชนิดสิ่งตรวจเหมาะสมกับรายการส่งตรวจ ไม่ใช้ syringe ในการนำส่งสิ่งตรวจ) และทำ microscopic โดยการย้อมแกรมซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ช่วยการวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็วและทำได้ง่าย

การย้อมแกรม ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ดังนี้

2.1 การประเมินการติดเชื้อ จากปริมาณ PMN, squamous epithelial cells และจุลชีพที่ตรวจพบ แนวทางการแปลผลการย้อมแกรมเชิงปริมาณแสดงในตารางที่ 4.7-1 และ ตารางที่ 4.7-2

ตารางที่ 4.7-1 การแปลผลการย้อมแกรมเชิงปริมาณสำหรับตัวอย่างที่ไม่ใช่เสมหะ ไม่ใช่ตัวอย่างป้ายช่องคลอดที่ใช้วินิจฉัยช่องคลอดอักเสบ และไม่ใช่ตัวอย่างน้ำคัดหลั่งที่ผ่านการปั่น

Epithelial or Polymorphonuclear cells (PMN)		**Microorganisms (bacteria, yeast / fungi)**	
Description	**Number / LPF**	**Description**	**Number / OIF**
1+ , rare	< 1	1+ , rare	< 1
2+ , few	1-10	2+ , few	1-10
3+ , moderate	11-25	3+ , moderate	11-25
4+ , many	> 25	4+ , many	> 25
low-power field (LPF) (x100) high-power oil immersion field (OIF) (x1000) numbers are based on an average of 10 fields.			

(Canadian Coalition for Quality in Laboratory Medicine CCQLM, Microbiology Working Group. Guideline for Quantitative Interpretation of Gram's Stains : November 2004)

การแปลผล: ปริมาณ PMN และจุลชีพยิ่งมาก แสดงว่ามีโอกาสพบการติดเชื้อมาก

2.2 การบริหารการใช้ยาต้านจุลชีพของแพทย์ เนื่องจากสามารถบอกทั้งลักษณะการติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเชื้อจุลชีพ

2.3 ช่วยติดตามการเปลี่ยนแปลงของการติดเชื้อของแผลได้ประหยัดกว่าการเพาะเชื้อ

2.4 ตรวจสอบคุณภาพสิ่งตรวจได้ ทำให้สามารถรับหรือปฏิเสธสิ่งตรวจ และเก็บตัวอย่างใหม่ได้ในวันเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7-2

14-0992(001-354)editnew130158.indd 109 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 4.7-2 การแปลผลการย้อมแกรมเชิงปริมาณสำหรับการตรวจสิ่งตรวจหนองโดยตรง (direct examination) โดยการประเมินผลร่วมของปริมาณ neutrophil และ squamous cell เพื่อตรวจสอบคุณภาพสิ่งตรวจ

Quantity of cells per 10x (objective lens) microscopic field					
No. of neutrophils	**Q-value for neutrophils**	**Q-value for squamous epithelial cells present in following no.**			
		0	**1-9**	**10-24**	**> 25**
		0	**-1**	**-2**	**-3**
0	**0**	(1)	0	0	0
1-9	**1+**	1	0	-1	-2
10-24	**2+**	+2	+1	0	-1
≥ 25	**3+**	+3	+2	+1	0

(Microbiology Procedures/Guidelines-2010 Edition Page 42)

*** - สิ่งตรวจที่ให้ค่า Q-value เป็นบวก โดยบวกยิ่งมากก็จะยิ่งทำให้ตรวจพบเชื้อก่อโรคได้มากกว่าและยิ่งลดการตรวจพบเชื้อปนเปื้อน

- สิ่งตรวจที่ให้ค่า Q-value เป็นลบหรือศูนย์ ดูเหมือนจะปนเปื้อนจุลชีพประจำถิ่น
- สิ่งตรวจที่ตรวจไม่พบทั้ง squamous cells และ PMN (1) จะพบได้ในสิ่งตรวจที่ได้จาก neutropenic patient หรือสิ่งตรวจที่เป็น necrotic หรือ serous secretions สิ่งตรวจเหล่านี้จะถูกยอมรับในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.5 การตรวจพบจุลชีพที่น่าจะมีความสำคัญอย่างมากทางคลินิก ที่ต้องรายงานแบบค่าวิกฤติ ได้แก่ *Clostidium*-like gram-positive bacilli ในสิ่งตรวจ soft-tissue หรือ aspirate mixed morphologies ที่อาจจะเป็น anaerobic bacteria ใน brain abscess

2.6 เป็นแนวทางสำหรับการแปลผลและการควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อ

2.7 ช่วยเป็นแนวทางในการเลือกการทดสอบเพิ่มเติม เช่น การย้อมสี modified acid fast stain/ acid fast stain การเพาะเชื้อรา/ anaerobic bacteria

<u>หมายเหตุ</u> การพบเชื้อจากการย้อมแกรม แต่เพาะเชื้อไม่ขึ้นอาจเกิดจากมีการปนเปื้อนของน้ำยาที่ใช้ หรือเชื้อไม่สามารถขึ้นบนอาหารและบรรยากาศที่ใช้ในการเพาะเชื้อ หรือเป็นเชื้อที่ตายง่ายหรือผลการย้อมแกรมผิดพลาด

14-0992(001-354)editnew130158.indd 110 1/14/58 BE 3:50 PM

วิธีปฏิบัติงาน

1. หนองจากแผลลึกและฝีปิด (deep wound and abscess pus)

โดยทั่วไปการติดเชื้อในแผลลึกและฝีปิด บ่อยครั้งที่เกิดจากการติดเชื้อร่วมกันของ aerobic และ anaerobic organism

ตารางที่ 4.7-3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจากหนองจากแผลลึกและฝีปิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลาเพาะเชื้อ
Blood agar (BA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
MacConkey agar (MAC)	ambient air	35 ^{o}C	48 ชม.
Chocolate agar (CA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
Anaerobic agar (BRUC)	AnO_2	35 ^{o}C	72-96 ชม.

<u>หมายเหตุ</u> - ให้เพิ่ม FTM/ chopped meat medium ถ้าเป็นหนองจากแผลลึกหรือฝีและต้องการเพาะเชื้อ anaerobe ถ้า plate - แต่ broth + ต้อง subculture

- ถ้ามีคำสั่งส่งตรวจ *Actinomyces* spp. หรือ *Nocardia* spp. หรือตรวจพบ branching หรือ beaded gram-positive organisms จากการย้อมแกรมควรทำการย้อมสี modified acid fast stain เพิ่ม
- ถ้าสงสัย *Actinomyces* spp. ไม่ว่าจากคำสั่งส่งตรวจ หรือจาก direct smear anaerobic culture ต้องอบนาน 7 วัน

<u>การอ่านผล</u>

ตรวจสอบ aerobic plates ทุกวัน และ anaerobic plates ภายหลัง 48 ชม. และ 4 วัน จำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคและทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

potential pathogens ได้แก่ *S. aureus*, β-haemolytic streptococci, *Pasteurella* spp., *Capnocytophaga* spp. (animal bites), *Eikenella* spp. (human bites), *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* , anaerobic bacteria

14-0992(001-354)editnew130158.indd 111 1/14/58 BE 3:50 PM

<u>การรายงานผล</u>

- Negative report: No growth/ตรวจพบจุลชีพประจำถิ่นทั้งชนิด aerobic และ anaerobic
- Positive report: รายงานปริมาณการตรวจพบ **potential pathogens** และผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

2. หนองจากแผลเปิด ฝีเปิดและผื่น (superficial skin swabs)

ในการเก็บ superficial skin swabs ถ้าไม่ระมัดระวัง มักปนเปื้อนจุลชีพประจำถิ่นร่วมด้วย นอกจากนี้ superficial skin swabs เป็นสิ่งตรวจที่ไม่เหมาะสมสำหรับ anaerobes

ตารางที่ 4.7-4 อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจากหนองจากแผลเปิด ฝีเปิด และผื่น

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลาเพาะเชื้อ
Blood agar (BA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
MacConkey agar (MAC)	ambient air	35 ^{o}C	48 ชม.
Colistin nalidixic acid agar (CAN)/ Phenyl-ethyl alcohol (PEA)/ Azide BA (option)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
เพิ่ม Chocolate agar (CA) หากตัวอย่างเป็น tracheal swab หรือเก็บจาก chest tube site (option)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.

<u>หมายเหตุ</u> CAN / PEA / Azide BA เป็น selective medium สำหรับ gram-positive bacteria มีประโยชน์เมื่อมีการ overgrowth ของ enteric flora หรือ swarming *Proteus* spp.

<u>การอ่านผล</u>

ตรวจสอบ plates ภายหลังการเพาะเชื้อ 24 และ 48 ชม. potential pathogens ได้แก่ *S. aureus*, β-hemolytic *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa* จุลชีพอื่น ๆ ที่ตรวจพบเพียงชนิดเดียว หรือพบเป็นจำนวนมากและผลเข้ากันได้กับการย้อมแกรมถือว่ามีนัยสำคัญในการก่อโรค ถ้าตรวจพบ PMN $\geq$ 1 ร่วมด้วย ทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

<u>การรายงานผล</u>

- Negative report: No growth หรือตรวจพบจุลชีพประจำถิ่น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 112 1/14/58 BE 3:50 PM

- Positive report: รายงานปริมาณจุลชีพเฉพาะที่มีนัยสำคัญพร้อมผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ถ้าตรวจพบเชื้อที่น่าจะเป็นเชื้อประจำถิ่นให้รายงานแต่ปริมาณการตรวจพบ

3. Conjunctival swab

การเก็บ conjunctival swab เพื่อการวินิจฉัยโรคเยื่อตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) โดย swab ควรถูกนำส่งจากตาทั้ง 2 ข้าง คือข้างที่ติดเชื้อและข้างที่ไม่ติดเชื้อ เพื่อการวิเคราะห์เปรียบเทียบว่าเชื้อที่ถูกตรวจพบเป็นเชื้อประจำถิ่นหรือเชื้อก่อโรค

ตารางที่ 4.7-5 อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิและเวลาเพาะเชื้อจาก conjunctival swab

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลาเพาะเชื้อ
Blood agar (BA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
Chocolate agar (CA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
G.C. Selective agar (neonates)	CO_2	35 ^{o}C	72 ชม.

<u>การอ่านผล</u>

ตรวจสอบ BA และ CA ภายหลังการเพาะเชื้อ 24 และ 48 ชม. และ G.C. ภายหลังการเพาะเชื้อ 48 และ 72 ชม. เปรียบเทียบผลระหว่าง swab ข้างที่ติดเชื้อและข้างที่ไม่ติดเชื้อ เพื่อช่วยการวินิจฉัยเชื้อก่อโรค

potential pathogens ได้แก่ *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Moraxella* spp. และ *P. aeruginosa* สำหรับเชื้อชนิดอื่นจะมีนัยสำคัญ ถ้าตรวจพบปริมาณปานกลางถึงมาก ซึ่งเข้ากันได้กับผลการย้อมแกรมและควรมีการตรวจพบ PMN $\geq$ 1 ร่วมด้วย แล้วทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

<u>การรายงานผล</u>

- Negative report: No growth (จุลชีพที่พบในการย้อมแกรมแต่ไม่พบใน culture อาจจะเป็น fastidious organisms เช่น *N. gonorrhoeae*) หรือตรวจพบเฉพาะจุลชีพประจำถิ่น
- Positive report: รายงานปริมาณการตรวจพบ potential pathogens และผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ถ้ามีเชื้อประจำถิ่นร่วมด้วย รายงานชนิดและปริมาณการตรวจพบเท่านั้น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 113 1/14/58 BE 3:50 PM

4. Ear swab

การเก็บ ear swab เพื่อการวินิจฉัยโรค otitis externa ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียของ external auditory canal สำหรับ tympanocentesis fluid เป็นสิ่งตรวจเพื่อการวินิจฉัย otitis media ซึ่งจะถูกปฏิบัติเช่นเดียวกับหนองจากแผลลึก

ตารางที่ 4.7-6 อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาเพาะเชื้อจาก ear swab

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะ	อุณหภูมิ	เวลาเพาะเชื้อ
Blood agar (BA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
MacConkey agar (MAC)	ambient air	35 ^{o}C	48 ชม.
Chocolate agar (CA)	CO_2	35 ^{o}C	48 ชม.
Fungal plate (เช่น Sabouraud dextrose agar, Fungal selective agar, Phytone)	ambient air	30 ^{o}C	48 ชม. อาจอบต่อ ถึง 4 สัปดาห์

<u>การอ่านผล</u>

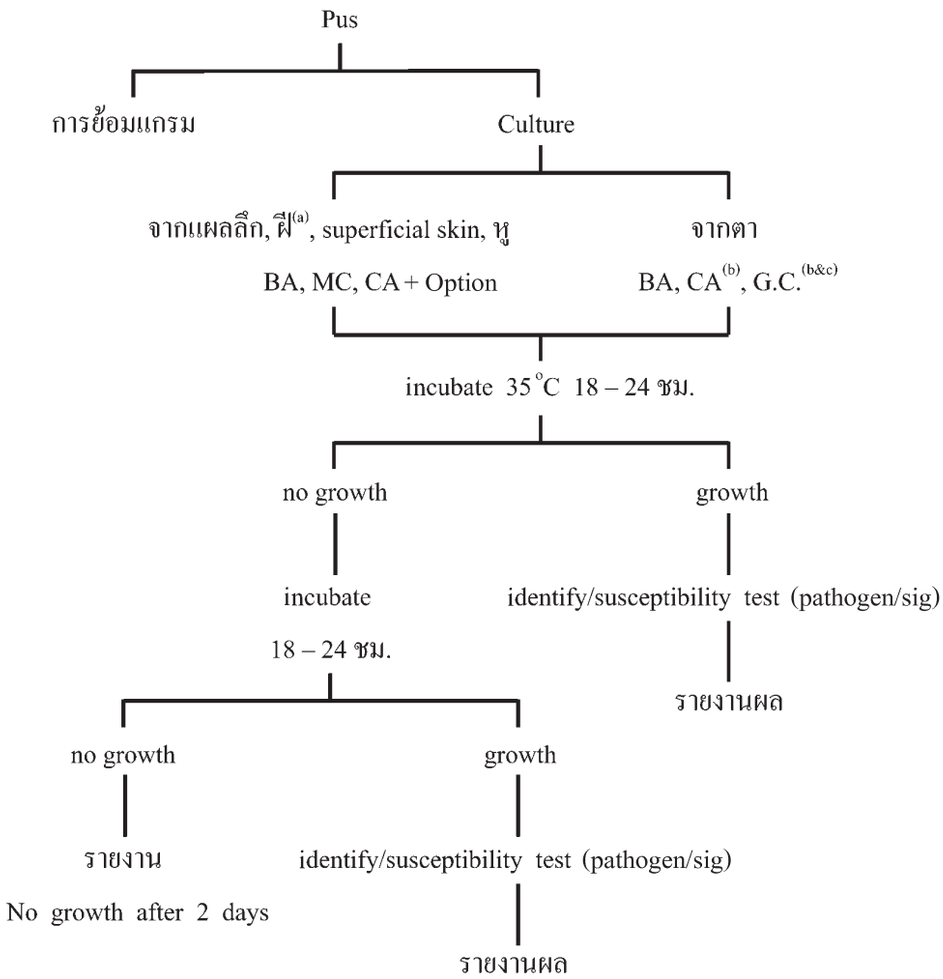
ตรวจสอบ culture plates ภายหลังการเพาะเชื้อ 24 และ 48 ชม. potential pathogens ได้แก่ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, Group A *Streptococcus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* หรือ yeast เฉพาะสิ่งตรวจจากทารกแรกเกิดเชื้อก่อโรคที่ต้องตรวจวิเคราะห์และรายงานด้วย คือ Group B *Streptococcus* สำหรับเชื้อชนิดอื่นจะมีนัยสำคัญ ถ้าตรวจพบปริมาณปานกลางถึงมาก ซึ่งเข้ากันได้กับผลการย้อมแกรม และควรมีการตรวจพบ PMN $\geq$ 1 ร่วมด้วย แล้วทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

<u>การรายงานผล</u>

- Negative report: No growth (จุลชีพที่พบในการย้อมแกรม แต่ไม่พบใน culture อาจจะเป็น fastidious organisms เช่น *S. pneumoniae*), หรือตรวจพบเฉพาะจุลชีพประจำถิ่น
- Positive report: รายงานปริมาณการตรวจพบ potential pathogens และผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ถ้ามีเชื้อประจำถิ่นร่วมด้วย รายงานชนิดและปริมาณการการตรวจพบเท่านั้น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 114 1/14/58 BE 3:50 PM

แผนภูมิที่ 4.7-1 ขั้นตอนการเพาะเชื้อจากหนองต่างๆ



(a) ให้เพิ่ม FTM/chopped meat medium ถ้าเป็นหนองจากแผลลึก หรือฝี และต้องการเพาะเชื้อ anaerobe ถ้า plate - แต่ broth + ต้อง subculture

(b) เพาะเชื้อในสภาวะ 5-10 % CO_2

(c) เฉพาะ neonates และ อบ plate นาน 72 ชม.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 115 1/14/58 BE 3:50 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Baron EJ, Thomson RB. Specimen Collection, Transport , and Processing : Bacteriology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.228-271.
2. Canadian Coalition for Quality in Laboratory Medicine CCQLM, Microbiology Working Group. Guideline for Quantitative Interpretation of Gram Stains. 2004. p.1-4.
3. College of Physicians and Surgeons of Saskatchewan Laboratory Quality Assurance Program. Procedures/Guidelines for the Microbiology Laboratory. 2010. p. 1-60.
4. Linscott AJ. Specimen Collection, Transport, and Acceptability. In : Garcia LS. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010. p 2.1.1-2.1.26.
5. Pezzlo M. Aerobic Bacteriology: Processing and Interpretation of Skin and Subcutaneous-Tissue Specimens. In: Isenberg HD editor. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 102-10.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 116 1/14/58 BE 3:50 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.1 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียชนิด Gram-Positive Cocci

สมศักดิ์ ราหุล
อนุศักดิ์ เกิดสิน

เชื้อกลุ่ม gram-positive cocci มีความยากในการแยกชนิดได้อย่างครบถ้วน แต่ควรต้องสามารถบอกชนิดของเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยได้ ปัจจุบันพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ และมีการพบเชื้อใหม่ๆเป็นเชื้อก่อโรคมากขึ้น ซึ่งอาจยุ่งยากในการวินิจฉัย การนำ commercial kit มาช่วยวินิจฉัยชนิดของเชื้อกลุ่มนี้ เช่น viridans group streptococci, enterococci แม้ว่าจะทำได้สะดวกและง่าย แต่มีข้อจำกัดในด้านความแม่นยำ (accuracy)

สิ่งสำคัญที่สุดในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรีย คือ รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อ สำหรับเชื้อกลุ่มนี้ก็เช่นเดียวกัน การย้อมแกรมมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อใช้แยกรูปร่างลักษณะและชนิด เพราะลักษณะโคโลนีของเชื้อ gram-positive cocci มีความคล้ายคลึงกัน ไม่สามารถแยกชนิดได้อย่างชัดเจน เช่น โคโลนีของเชื้อ *Streptococcus* และ *Aerococcus* แต่สามารถแยกชนิดจากกันได้โดยดูลักษณะการเรียงตัวจากการย้อมแกรม โคโลนีของ Group B streptococci และ *Listeria* ก็เช่นเดียวกัน มีความคล้ายกันมากจนอาจสับสนได้ หากไม่ย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์

gram-positive cocci แบ่งการเรียงตัวเป็นกลุ่ม (cluster) เช่น *Staphylococcus* เป็นสี่ (tetrads) เช่น *Micrococcus* เป็นสาย (chain) เช่น *Streptococcus* เป็นคู่ เช่น *Streptococcus pneumoniae* เป็นต้น

การทดสอบแรกที่ใช้เมื่อพบ gram-positive cocci คือ catalase ซึ่งจะทำให้แยกออกเป็น 2 กลุ่มคือ catalase บวกและ catalase ลบ กลุ่ม catalase บวกที่พบก่อโรคบ่อยคือ *Staphylococcus* ที่พบได้น้อยคือ *Micrococcus* กลุ่มที่ catalase ลบ ที่พบก่อโรคได้บ่อยได้แก่ *Streptococcus* และ *Enterococcus*

Staphylococcus และ *Micrococcus* เป็นเชื้อประจำถิ่นของผิวหนัง เยื่อบุต่างๆ และในช่องปากของมนุษย์และสัตว์ บาง species เช่น *S. aureus*, *S. lugdunensis* อาจก่อโรคที่สำคัญและรุนแรง

Staphylococcus

แบ่งตามความรุนแรงในการก่อโรคตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ coagulase เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มที่สร้างเอนไซม์ coagulase ได้ เรียก *Staphylococcus* coagulase positive หรือ coagulase positive *Staphylococcus* ซึ่งประกอบด้วยหลาย species ได้แก่ *aureus*, *schleiferi*, *intermedius*, *delphini* และ *hyicus* (บางสายพันธุ์) แต่เนื่องจาก species อื่นนอกจาก *aureus* อาจพบก่อโรคของแผลถูกสัตว์กัดเท่านั้น การติดเชื้อ *Staphylococcus* coagulase positive ส่วนใหญ่จึงเป็น *S. aureus* หากต้องการทำการวินิจฉัย species ให้ทำเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus* coagulase positive ที่แยกได้จากแผลถูกสัตว์กัด
2. กลุ่มที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase เรียก *Staphylococcus* coagulase negative หรือ coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) ประกอบด้วยหลาย species แต่จะมี species ที่พบบ่อยและห้องปฏิบัติการน่าจะวินิจฉัยได้ ในกรณีพบเชื้อจากตำแหน่งที่ปราศจากจุลชีพประจำถิ่น ประมาณ 4 species ได้แก่ *epidermidis*, *haemolyticus*, *lugdunensis*, *saprophyticus* (เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยในสตรีวัยเจริญพันธุ์)

   <u>การวินิจฉัย species ของ CNS มีความสำคัญ</u> กล่าวคือ

   2.1 ช่วยวินิจฉัยว่าเป็นชนิดก่อโรคที่เคยมีรายงานหรือไม่ และเมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูลของผู้ป่วย จะช่วยยืนยันว่าเป็นเชื้อก่อโรคจริงหรือไม่ในกรณีที่แยกเชื้อได้จากเลือดหรือสิ่งตรวจอื่น

   2.2 *Staphylococcus lugdunensis* เป็น CNS ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค endocarditis สูงเทียบเท่า *S. aureus* แม้จะยังไม่มีรายงานการพบเชื้อก่อโรคชนิดนี้บ่อยก็ตาม อีกทั้งการทดสอบความไวของเชื้อนี้ต่อ methicillin ใช้เกณฑ์ในการแปลผลแบบเดียวกันกับ *S. aureus* จึงควรให้ความสำคัญในการวินิจฉัยถึงระดับ species อีกทั้งการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อช่วยแยกเป็นการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก และมีใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป

Micrococcus

ประกอบด้วยเชื้อแกรมบวกรูปกลม มักเรียงตัวแบบ tetrads และเป็นกลุ่มเชื้อที่มีโคโลนีสีเหลือง แตกต่างจาก *Staphylococcus* คือ *Micrococcus* ไวต่อ bacitracin 0.04 U ไม่ ferment glucose และ modified oxidase บวก ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไปไม่จำเป็นต้องวินิจฉัยว่าเป็น *M. luteus* หรือ *M. lylae* สามารถรายงานผลเชื้อที่มีลักษณะนี้เป็น *Micrococcus* spp.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 118 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 5.1-1 การวินิจฉัยเชื้อ gram-positive cocci, catalase บวก ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่สีขาวหรือเหลืองที่พบบ่อย

Organisms	คุณลักษณะเฉพาะ	Slide coagulase	Tube coagulase	Bacitracin (0.04 U)	Polymycin B (300 U)	PYR
Micrococcus group[a]	often yellow			S	S	V
Staphylococcus aureus	VP +	V	+	R	R	-
S. intermedius (dogs)	VP -	V	+	R	S	+
S. delphini (dolphins)	VP -	-	+	R	NA	NA
S. hyicus (pigs)	VP -	-	V	R	R	-
S. lugdunensis	OD +	V	-	R	R	+
S. schleiferi	OD -	+	-+	R	S	+
S. saprophyticus	urine; novobiocin (5 µg) - R; urease +; non-hemolytic	-	-	R	S	-
S. epidermidis	urease + non-hemolytic	-	-	R	R	-
S. haemolyticus	urease -, VP +, DNase -	-	-	R	S	+
S. caprae	urease +, DNase +	-	-	R	S	+
Other coagulase-negative staphylococci	novobiocin (5 µg) -/V; urease V; non-hemolytic or delayed hemolysis	-	-	R	S	V

+ = greater than 90% of strain positive in 48h; - = greater than 90% of strain negative; V = result are between 90 and 10% positive; -+ = most strains are negative but rare positive strains exist; NA = not applicable or aviable; VP = Voges-Proskauer; OD = ornithine decarboxylase; PYR = production of pyrrolidonyl arylamidase; R = resistant; S = susceptible. Bacitracin susceptible = inhibition zone 10-25 mm, Novobiocin resistant = inhibition zone ≤16 mm, Polymycin B resistant = inhibition zone <10 mm

[a] Including *Kytococcus* and *Kocuria*.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 119 1/14/58 BE 3:50 PM

Streptococcus

Streptococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ให้ผลการทดสอบ catalase เป็นลบ รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสาย ขึ้นอยู่กับแต่ละ species เชื้อ *Streptococcus* สามารถให้การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดแกะเป็นส่วนผสม (sheep BA) เป็น 3 แบบ ได้แก่ alpha-hemolysis, beta-hemolysis และ gamma-hemolysis ปัจจุบันได้มีการแบ่งกลุ่ม *Streptococcus* เป็น pyogenic และ non-pyogenic group ซึ่ง non-pyogenic group ประกอบด้วย *anginosus* group, *mitis* group, *salivarius* group, *bovis* group และ uncertain group เช่น *S. suis* อย่างไรก็ดีการวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* เพื่อประโยชน์ในการดูแลผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์โดยใช้ปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อแบ่งกลุ่มที่มีความสำคัญในการก่อโรค แสดงดังตารางที่ 5.1.2

ตารางที่ 5.1-2 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* group ต่างๆ

Organisms	**Group A**	**Group B**	**Non Group A, B or D**	**Group D *Enterococcus***	**Group D not *Enterococcus***	**Viridans group**	***S. pneumoniae***
Hemolysis	β	β	β	α, β or γ	α	α	α
PYR (pyrrolidonyl aminopeptidase)	+	-	-	+	-	-	-
Bacitracin susceptibility 0.04 unit (at any zone size)	+	-*	-*	-	-	-*	-
CAMP reaction	-	+	-	-	-	-*	-
Bile esculin hydrolysis	-	-	-	+	+	-*	-
Tolerance to 6.5% NaCl	-	-	-	+	-	-	-
Optochin susceptibility (≥ 14 mm)	-	-	-	-	-	-	+

* บางครั้งอาจให้ผลบวก

14-0992(001-354)editnew130158.indd 120 1/14/58 BE 3:50 PM

การทำ grouping กับ antisera และ PYR test สามารถใช้ในการวินิจฉัย *Streptococcus* group A (โดยเฉพาะ *S. pyogenes*) อย่างรวดเร็ว เชื้อ *Enterococcus* ให้ผล PYR บวกเช่นเดียวกับ *Streptococcus* group A สามารถแยกโดยดู bile esculin hydrolysis และการขึ้นในอาหารที่มี 6.5% NaCl การวินิจฉัยเชื้อในกรณีที่แยกได้จากสิ่งตรวจที่ไม่มีเชื้อประจำถิ่นมีความจำเป็นที่ต้องแยกถึงระดับ species เพื่อประโยชน์ในการทำนายโรคและการติดตามระบาดวิทยาของเชื้อ เช่น แยกได้จากเลือดหรือน้ำไขสันหลัง ถ้าเป็น *Streptococcus* viridans group (α-hemolysis) ต้องวินิจฉัยว่าเป็น *Streptococcus suis* หรือไม่ โดยการส่งห้องปฏิบัติการอ้างอิง/ใช้ชุดทดสอบ/ใช้เครื่องวินิจฉัยเชื้ออัตโนมัติตามความเหมาะสม ถ้าพบจาก throat swab ต้องทำ grouping ว่าเป็น group C หรือ group G หรือไม่ เพราะ group C และ group G สามารถทำให้เจ็บคอและเกิดอาการรุนแรงเช่นเดียวกับ group A ถ้าพบเชื้อ *Streptococcus* group D not *Enterococcus* ต้องวินิจฉัยให้ได้ว่าเป็น *Streptococcus bovis* หรือไม่ เพราะเชื้อนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในลำไส้สูง แพทย์จะได้ทำการตรวจ ซึ่งการพบเชื้อได้เร็วจะช่วยให้รักษาได้ผลดีกว่าการพบเชื้อในระยะหลัง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 121 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 5.1-3 การวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* กลุ่ม pyogenic ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี

Organisms	Bacitracin	CAMP	PYR	VP	Trehalose	Sorbitol	Lancefield group	Source
S. pyogenes	+	-	+	-	+	-	A	Human
S. phocae	+	-	-	-	ND	-	C, F	Animal
S. agalactiae	-	+	-	-	v	-	B	Human, Animal
S. porcinus	-	+	+	+	+	+	E, P, U, V, None	Human, Animal
S. pseudoporcinus	-	+	v	v	ND	+	(B), None	Human
S. canis	-	v +	-	-	v	-	G	Human, Animal
S. iniae	-	+	+	-	ND	-	None	Human, Animal
S. dysgalactiae subsp. *dysgalactiae*	v +	-	-	-	+	v +	C, L	Animal
S. dysgalactiae subsp. *equisimilis*	v	-	-	-	+	-	A, C, G, L	Human, Animal
S. equi subsp. *equi*	-	-	-	-	-	-	C	Animal
S. equi subsp. *zooepidemicus*	-	-	-	-	-	+	C	Human, Animal
S. anginosus group	-	-	-	+	+	-	A, C, G, F, None	Human
S. didelphis	-	-	-	-	ND	-	None	Animal

+ = positive reaction (≥95%); - = negative reaction (≤5%); v + = variable reaction, but most strains positive; v - = variable reaction, but most strains negative; v = variable reaction

14-0992(001-354)editnew130158.indd 122 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 5.1-4 การวินิจฉัยเชื้อ *Streptococcus* กลุ่ม non-pyogenic ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี

Organisms	VP	Bile esculin	Esculin	Arginine	Mannitol	Sorbitol	Urea	Optochin	Lancefield group	Remark
S. suis	-	v -	+	v +	-	v -	-	-	R, S, T	มีประวัติการรับประทานหมูดิบหรืออาหารที่มีส่วนผสมของหมูดิบหรือเลือดหมู หรือมีการสัมผัสกับสุกรหรือเนื้อหมู
S. sanguinis group	-	-	+	+	-	v -	-	-	None	
S. mitis group	-	-	- *	-	-	-	-	-	None	
S. pneumoniae	-	-	-	-	-	-	-	+	None	ควรยืนยันด้วย bile solubility test ถ้าพบ zone มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 14 mm
S. mutans group	+	-	+	-	+	+	-	-	None	
S. salivarius group	+	-	v	-	-	-	v	-	None	
S. anginosus group	+	-	+	+	-	-	-	-	A, C, G, F, None	
S. bovis group	+	+**	+	-	- *	-	-	-	D	

+ = positive reaction (≥95%); - = negative reaction (≤5%); v + = variable reaction, but most strains positive; v - = variable reaction, but most strains negative; v = variable reaction

* บางครั้งอาจให้ผลบวก ; ** บางสายพันธุ์อาจให้ผลลบ (*S. infantarius*)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 123 1/14/58 BE 3:50 PM

ตารางที่ 5.1-5 การวินิจฉัยเชื้อในกลุ่มของ *S. bovis* group ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี

Organisms	Bile esculin	Esculin	Lactose	Mannitol	Raffinose	Trehalose	Inulin	Urea	Lancefield group	Formerly synonym	Source
S. equinus/ S. bovis	+	+	-/+	-	-	v	-/+	-	D	*S. bovis*	Animal
S. gallolyticus subsp. *gallolyticus*	+	+	+	+	+	+	+	-	D	*S. bovis* biotype I	Human, Animal
S. gallolyticus subsp. *pasteurianus*	+	+	+	-	v	+	-	-	D	*S. bovis* biotype II.2; *S. pasteurianus*	Human
S. gallolyticus subsp. *macedonicus*	-	-	+	-	v	-	-	-	ND	*S. macedonicus*	Dairy product
S. infantarius subsp. *infantarius*	-	v	+	-	+	-	-	-	D	*S. bovis* biotype II.1	Human, Animal
S. infantarius subsp. *coli*	+	+	+	-	-	-	-	-	D	*S. lutetiensis*	Human, Animal
S. alactolyticus	v	+	-	-	-	-	-	+	D	*S. intestinalis*	Animal

+ = positive reaction (≥95%); - = negative reaction (≤5%); v + = variable reaction, but most strains positive; v - = variable reaction, but most strains negative; v = variable reaction

14-0992(001-354)editnew130158.indd 124 1/14/58 BE 3:51 PM

Enterococcus

เดิมเป็น *Streptococcus* ที่มี Lancefield group D antigen แต่มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีหลายประการที่ต่างจาก genus *Streptococcus* กล่าวคือ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 ^{o}C ที่ pH 9.6 อาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง 6.5% สามารถขึ้นในอาหารที่มีน้ำดี 40% และ hydrolyse esculin ที่อยู่ในอาหารนี้ได้ และให้ผลการทดสอบ PYR บวก จึงถูกจัดเป็น genus ใหม่ บน BA plate มีการเจริญเป็นโคโลนีสีขาวใส โปร่งแสง อาจพบ hemolysis ได้ทุกรูปแบบ คือ ไม่มี hemolysis หรือ α หรือ β ก็ได้

Enterococcus เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร และอาจพบเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งแผลติดเชื้อของผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่พบบ่อยเป็นอันดับสองรองจาก *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ดื้อ aminoglycoside ระดับต่ำแบบ intrinsic resistant เชื้อที่พบในโรงพยาบาลอาจเป็นเชื้อดื้อสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น penicillin, cephalosporin เชื้อ *Enterococcus* ดื้อยาที่ต้องเฝ้าระวังการแพร่กระจาย คือ vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) *faecium* และ *E. faecalis* ดังนั้น หากพบ *Enterococcus* ที่ดื้อ vancomycin จึงต้องวินิจฉัยระดับ species ต่อว่าเป็นสอง species ดังกล่าวหรือไม่เพราะถ้าเป็น *E. faecium* หรือ *E. faecalis* จำเป็นต้องแยกผู้ป่วยเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของยีนส์ดื้อ vancomycin เชื้อ *Enterococcus* ที่ดื้อต่อ vancomycin โดยธรรมชาติ คือ *E. casseliflavus* และ *E. gallinarum* ซึ่งสามารถแยกจาก *E. faecium* และ *E. faecalis* ได้โดยทดสอบ motility เชื้อ *E. casseliflavus* และ *E. gallinarum* เคลื่อนที่ได้ แต่ *E. faecium* และ *E. faecalis* ไม่เคลื่อนที่ เชื้อ *E. casseliflavus* เป็น *Enterococcus* ที่มี pigment สีเหลือง แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมที่เคลื่อนที่ได้อีก species หนึ่งคือ *Vagococcus fluvialis* ส่วน *Enterococcus* ที่มีสีเหลืองอีก species หนึ่งคือ *E. mundtii*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 125 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.1-6 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย gram-positive cocci, catalase negative, PYR positive ที่ไม่ใช่ *Streptococcus* group A

Organisms	Motility	Pigment	MGP	AD	Arabinose	Mannitol	Lactose	Raffinose	Sorbitol	Tellurite	Pyruvate	45 °C Growth	Vancomycin
E. avium	-	-	V	-	+	+	+	-	+	-	+	+	S
E. raffinosus	-	-	V	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V
Vagococcus fluvialis	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S
E. faecium	-	-	-	+	+	+d	+	V	V	-	-	+	V
E. gallinarum	+d	-	+	+d	+	+	+	+	D	-	-	+	R
E. casseliflavus	+d	+d	+	+d	+	+	+	D	V	-d	V	+	R
E. mundtii	-	+	-	+	+	+	+	+	V	-	-	+	S
E. faecalis	-	-	-	+d	-	+d	+d	-	+	+	+	+	V
Lactococcus garvieae	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	S
E. durans	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	S
E. hirae	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	S
E. dispar	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	S

14-0992(001-354)editnew130158.indd 126 1/14/58 BE 3:51 PM

Gram positive cocci catalase negative ที่พบไม่บ่อย

1. *Streptococcus*-like organisms

1.1 Nutritionally variant *Streptococcus* (NVS)

เป็น *Streptococcus* ที่ต้องการสารอาหารพิเศษในการเจริญ เช่น pyridoxal หรือ vitamin B6 ซึ่งเป็นส่วนผสมใน CA, cysteine, NAD มักพบเป็นสาเหตุของ endocarditis ดังนั้น ถ้าพบเชื้อ gram-positive cocci in chain ที่ไม่ขึ้นบน BA แต่เจริญบน CA ได้ และให้ลักษณะ satellite phenomenon กับ *Staphylococcus* บน BA ควรนึกถึงเชื้อนี้ ซึ่งในขณะนี้ถูกจัดเป็น genus ใหม่ คือ *Abiotrophia* และ *Granulicatella* ซึ่งสามารถแยกจากกันโดย *Abiotrophia* จะ ferment น้ำตาล lactose, trehalose, raffinose แต่ *Granulicatella* ไม่ ferment ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากในการทดสอบ เนื่องจากเชื้อเป็น fastidious organism ดังนั้นในเบื้องต้น ห้องปฏิบัติการอาจรายงานผลเป็น Nutritionally variant *Streptococcus*

แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมอีก genus หนึ่งที่อาจต้องการสารอาหารพิเศษในการเจริญ หรือให้ผล satellite phenomenon เป็นบวกกับ *Staphylococcus* บน BA แต่อาจมีการเรียงตัวเป็นสายหรือเป็นกลุ่มก็ได้ คือ *Ignavigranum* ซึ่งนอกจากจะเป็นเชื้อที่มีการเรียงตัวทั้งสองแบบแล้ว เชื้อ genus นี้ มักไม่ให้ hemolysis บน BA และเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือที่มีความเข้มข้น 6.5% ซึ่งแตกต่างจาก *Abiotrophia* และ *Granulicatella*

1.2 *Aerococcus*

เป็นเชื้อแกรมบวกรูปกลมเรียงตัวแบบ tetrads หรือ cluster แบบ *Staphylococcus* ที่มีโคโลนีเหมือน viridans group *Streptococcus* ดังนั้นการย้อมแกรมของเชื้อที่เลี้ยงใน broth จะช่วยแยก *Aerococcus* จาก *Streptococcus* ได้ บางสายพันธุ์ของ *Aerococcus* viridans อาจ hydrolyse bile esculin และให้ผลบวกกับ PYR แต่ *A. urinae* ให้ผลลบกับปฏิกิริยาทั้งคู่

1.3 *Facklamia*

เป็นเชื้อแกรมบวกรูปกลมเรียงตัวแบบ pairs, tetrads หรือ cluster ที่มีโคโลนีเหมือน viridans group *Streptococcus* แต่มักให้ผลบวกกับ urease test และ hippurate hydrolysis

1.4 *Gemella*

เป็นเชื้อที่มีโคโลนีเหมือน viridans group *Streptococcus* แม้บางสายพันธุ์อาจไม่ให้ hemolysis แต่ลักษณะเด่นของเชื้อนี้ คือ เป็นเชื้อแกรมบวกที่ถูก decolourize ได้ง่าย ทำให้เห็นเป็น gram-negative cocci ที่เรียงตัวเป็นคู่ คล้าย *Neisseria*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 127 1/14/58 BE 3:51 PM

2. Enterococcus-like organism (*Globicatella*, *Lactococcus*, *Dolosigranulum*)

เชื้อที่มีลักษณะคล้าย *Enterococcus* ทั้งรูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะโคโลนีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า และ hydrolyse bile esculin ได้ *Globicatella* และ *Lactococcus* อาจแยกจาก *Enterococcus* ได้ โดยการเจริญที่ 45 ^{o}C ซึ่งทั้งสอง genus นี้ ไม่สามารถขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 45 ^{o}C ส่วน *Dolosigranulum* เป็นแกรมบวกรูปกลมที่ให้ผล PYR เป็นบวก และเจริญได้ในที่ความเข้มข้นเกลือ 6.5% แต่มีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 ^{o}C และ 45 ^{o}C

3. *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Weissella*

ทั้งสาม genus เป็นเชื้อแกรมบวกรูปร่างกลมที่ดื้อ vancomycin เชื้อ *Pediococcus* มักเรียงตัวเป็นกลุ่มหรือ tetrads บางสายพันธุ์อาจเจริญที่ 45 ^{o}C arginine เป็นลบ LAP เป็นบวก บางครั้งอาจสับสนกับ *Streptococcus* group D และ *Enterococcus* เนื่องจากเป็นเชื้อที่มี Lancefield group D antigen จึงอาจให้ผล bile esculin เป็นบวก หรือเจริญในที่มีเกลือ 6.5% ได้ แต่ PYR ของเชื้อนี้เป็นลบ เช่นเดียวกับ *Leuconostoc* และ *Weissella* แต่สอง genus หลังนี้เป็นแกรมบวกรูปร่างกลมที่มักเรียงตัวเป็นสาย หรือบางครั้งอาจเห็นเป็นแกรมบวกรูปแท่งได้ *Leuconostoc* ไม่ขึ้นที่ 45 ^{o}C arginine เป็นลบ LAP เป็นลบ ส่วน *Weissella* เจริญที่ 45 ^{o}C ได้ และ LAP เป็นลบ

4. *Dolosicoccus*, *Helcococcus*

ทั้งสอง genus นี้เป็นแบคทีเรียรูปกลมที่ให้ผลบวกกับ PYR แต่ไม่สามารถเจริญในที่มีความเข้มข้นเกลือ 6.5% และที่อุณหภูมิ 10 ^{o}C และ 45 ^{o}C แต่ *Dolosicoccus* เรียงตัวเป็นสาย โคโลนีเป็น α-hemolysis บน BA ส่วน *Helcococcus* เรียงตัวเป็นกลุ่ม ไม่มี hemolysis บน BA

14-0992(001-354)editnew130158.indd 128 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.1-7 การวินิจฉัยเชื้อ gram-positive cocci (excluding *Streptococcus pyogenes*), catalase negative or weakly positive, PYR positive

Organisms	Gram stain	CAT	LAP	6.5% NaCl	10 °C	45 °C	Colony on BAP	Hemolysis	Bile-esculin
Enterococcus (some motile)	CH	-	+	+	+	+	Large	α, γ, β	+
Lactococcus	CH	-	+	V	+	-	Large	α, γ	+
Vagococcus (motile)	CH	-	+	+	+	-	Large	α, γ	+
Abiotrophia/ Granulicatella	CH	-	+	-	-	-	Satellite	α, γ	-
Globicatella	CH	-	-	+	-	-	Small	α	V
Dolosicoccus	CH	-	-	-	-	-	Small	α	NA
Aerococcus viridans	CL/T	-,W	-	+	-	-	Large	α	V
Helcococcus kunzii	CL/T	-	-	V	-	-	Tiny	γ	-
Gemella	CL/T/CH	-	V	-	-	-	Tiny, 48h	α, γ	-
Facklamia (hippurate +)	CL/CH	-	+	+	-	-	Small	γ	-
Alloiococcus otitis	CL/T	W,+	+	+	-	-	Tiny, 72h	α	NA
Ignavigranum (hippurate -)	CL/CH	-	+	+	-	-	Satellite (V) or small	γ	-
Rothia mucilaginosa	CL	-,W,+	+	-	NA	NA	Sticky	γ	V
Dolosigranulum	CL/T	-	+	+	-	-	Small	γ	NA

CAT = catalase production; LAP = production of leucine aminopeptidase; CL = clusters; T = tetrads; CH = chains; W = weak. Large colonies are approximately 1 mm; small colonies are about the size of viridans group streptococci. + = greater than 90% of strain positive in 48h; - = greater than 90% of strain negative; V = result are between 90 and 10% positive; NA = not applicable or aviable

14-0992(001-354)editnew130158.indd 129 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.1-8 การวินิจฉัยเชื้อ gram-positive cocci, catalase negative and PYR negative

Organisms	Gram stain	LAP	6.5% NaCl	VAN	Arginine	45 ^{o}C
Leuconostoc	CH, rods	-	V	R	-	-
Weissella confusa	CH, rods	-	V	R	+	+
Pediococcus	CL/T	+	V	R	-	V
Streptococcus	CH	+	-	S		V
Aerococcus urinae	CL/T	+	+	S		+

VAN = vancomycin; LAP = production of leucine aminopeptidase; CL = clusters; T = tetrads; CH = chains; + = greater than 90% of strain positive in 48h; - = greater than 90% of strain negative; V = result are between 90 and 10% positive; R = resistant; S = susceptible

เอกสารอ้างอิง

1. Becker K, von Eiff, C. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 308-330.
2. Bekal S, Gaudreau C, Laurence R A, Simoneau E, Raynal L. *Streptococcus pseudoporcinus* sp. nov., a Novel Species Isolated from the Genitourinary Tract of Women. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 2584-2586.
3. Duarte RS, Barros RR, Facklam RR, Teixeira LM. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Streptococcus porcinus* Isolated from Human Sources. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4592-4601.
4. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev. 2002; 15:613-630.
5. Facklam R, Elliott J. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin Microbiol Rev. 1995; 8:479-495.
6. Gangone R, Findlay I, Lakkireddi PR, Marsh G. A very rare spontaneous group-C *Streptococcal constellatus* spondylodiscitis: A case report. J. Orthopaedics. 2009; 6(3):e7.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 130 1/14/58 BE 3:51 PM

7. Garcia LS, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 3.9.2.1-3.11.8.1.
8. Köhler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Int J Med Microbiol. 2007; 297:133-150.
9. Ruoff K. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, gram positive cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 365-376.
10. Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, Bouvet A. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis / Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003;53: 631-645.
11. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 331-349.
12. Teixeir LM, Carvalho MGS, Shewmaker PL, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 350-364.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 131 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.2 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียชนิด Gram-Positive Bacilli

นิตยา ธีระวัฒนสุข

แบคทีเรียกลุ่มนี้แบ่งตามความสามารถในการสร้างสปอร์เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. แบคทีเรียแกรมบวกชนิดแท่งที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ (aerobic non-spore forming gram-positive bacilli) ประกอบด้วย genus ที่สำคัญได้แก่ *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* และ *Rhodococcus*
2. แบคทีเรียแกรมบวกชนิดแท่งที่สร้างสปอร์ (aerobic spore-forming gram-positive bacilli) ประกอบด้วย *Bacillus*, *Geobacillus* และ *Paenibacillus* สำหรับ genus ที่สำคัญคือ *Bacillus* ส่วน *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* ใช้ในการควบคุมประสิทธิภาพของ autoclave

Aerobic non-spore forming gram-positive bacilli

Corynebacterium and related bacteria เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ ปลายด้านหนึ่งหรือสองด้านป่องออก ลักษณะคล้ายกระบอง (club shape) เซลล์มักเรียงตัวขนานกันตามแนวยาว หรืออาจมีการเรียงตัวที่ไม่แน่นอน เช่นเป็นคู่ เป็นรูปตัววี รูปตัววาย หรือเรียงตัวคล้ายอักษรจีน (Chinese letter appearance) species ที่มีความสำคัญ คือ *C. diphtheriae* ซึ่งก่อโรคคอตีบ (diphtheria) ในการแยก *C. diphtheriae* จากสิ่งตรวจที่มีเชื้อประจำถิ่นปนเปื้อน ควรเลือกใช้ selective medium เช่น cystine tellurite blood agar (CTBA) เชื้อจะให้โคโลนีสีเทาดำ และบน Tinsdale (TIN) agar เชื้อ *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* และ *C. ulcerans* จะให้โคโลนีสีเทาดำที่มีวงสีน้ำตาลเข้มรอบๆ (halo)

Listeria ที่ทำให้เกิดโรคในคน คือ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง พบเป็นเซลล์เดี่ยว หรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิ 22-28 ^{o}C เมื่อดูโดยวิธี hanging drop จะเห็นการเคลื่อนไหวแบบตีลังกา (tumbling) ซึ่งเกิดจากการหมุนรอบตัวเองที่มีแกนหมุนตั้งฉากกับแนวยาวของเซลล์ แต่ถ้าใช้ semisolid medium จะเห็นการเคลื่อนไหวเป็นรูปร่ม

Erysipelothrix เป็นแบคทีเรียรูปแท่งสั้น ไม่เคลื่อนไหว ไม่สร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase มีรายงานการก่อโรคในคนเฉพาะเชื้อ *E. rhusiopathiae* เชื้อนี้แยกจากแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ คือเมื่อเจริญเติบโตบน TSI จะให้ H_2S

Rhodococcus ส่วนใหญ่พบเป็นแท่งสั้น (coccobacilli) ย้อมติดสี partially acid fast สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเพาะเชื้อทั่วไป เมื่อเก็บเชื้อไว้หลายวันโคโลนีจะมีสีชมพูอ่อน (pale salmon pink) species ที่ก่อโรคในคนโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ คือ *R. equi*

ตารางที่ 5.2-1 การวินิจฉัย aerobic non-spore forming gram-positive bacilli ที่สำคัญ

Test	*Corynebacterium*	*L. monocytogenes*	*E. rhusiopathiae*	*R. equi*
Gram stain	Gram positive bacilli, Chinese letter appearance	Gram positive bacilli	Gram positive bacilli	Gram positive coccobacilli
Catalase	+	+	_	+
Motile at 25 ^{o}C	_	+	_	_
Esculin hydrolysis	_	+	_	+
H_2S in TSI	_	_	+	_
Modified AFB	_	_	_	+

ตารางที่ 5.2-2 การแยกชนิดของ *Corynebacterium*

Species	Catalase	Urea	Nitrate	Glucose	Maltose	Sucrose	Reverse CAMP
C. diphtheriae bv. *gravis*	+	_	+	+	+	_	_
C. diphtheriae bv. *intermedius*	+	_	+	+	+	_	_
C. diphtheriae bv. *mitis*	+	_	+	+	+	_	_
C. diphtheriae bv. *belfanti*	+	_	_	+	+	_	_
C. xerosis	+	_	V	+	+	+	_
C. jeikeium	+	_	_	+	V	_	_
C. striatum	+	_	+	+	_	V	V
C. bovis	+	_	_	+	_	_	_
C. pseudotuberculosis	+	+	V	+	+	V	+
C. pseudodiphtheriticum	+	+	+	_	_	_	_
C. ulcerans	+	+	_	+	+	_	+
C. urealyticum	+	+	_	_	_	_	_

14-0992(001-354)editnew130158.indd 133 1/14/58 BE 3:51 PM

การทดสอบการสร้าง Toxin ของ *C. diphtheriae* (Elek's test)

1. เตรียม sterile Elek agar 20 ml รอให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50 ^{o}C เติม fresh serum 2-5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงใน sterile plate
2. จุ่มกระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาด 1x8 cm ลงใน diphtheria antitoxin ที่มีความเข้มข้น 100 unit/ml
3. วางกระดาษกรองที่ชุบ antitoxin ลงบนจานอาหาร Elek agar ที่จวนจะแข็ง กดกระดาษกรองลงบนผิวอาหารเล็กน้อย
4. เมื่อ Elek agar แข็งและผิวหน้าแห้งแล้ว ให้ใช้เชื้อที่ต้องการทดสอบลากตั้งฉากกับแผ่นกระดาษกรอง
5. ใช้เชื้อสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (positive control) และไม่สร้างสารพิษ (negative control) ทดสอบควบคู่กัน
6. อบเชื้อที่ 35-37 ^{o}C เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดู precipitin lines ซึ่งจะทำมุม 45 องศากับแนวเชื้อที่ลากไว้

Aerobic spore-forming gram-positive bacilli

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งขนาดใหญ่ หัวท้ายตัด บางสายพันธุ์เรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว สร้างสปอร์ภายในเซลล์ เชื้อในกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญได้แก่ *B. anthracis* และ *B. cereus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus cereus* group โดยเชื้อกลุ่มนี้จะมีเซลล์ขนาดใหญ่กว่ากลุ่มอื่นๆ

ตารางที่ 5.2-3 การแยกเชื้อ *Bacillus cereus* group

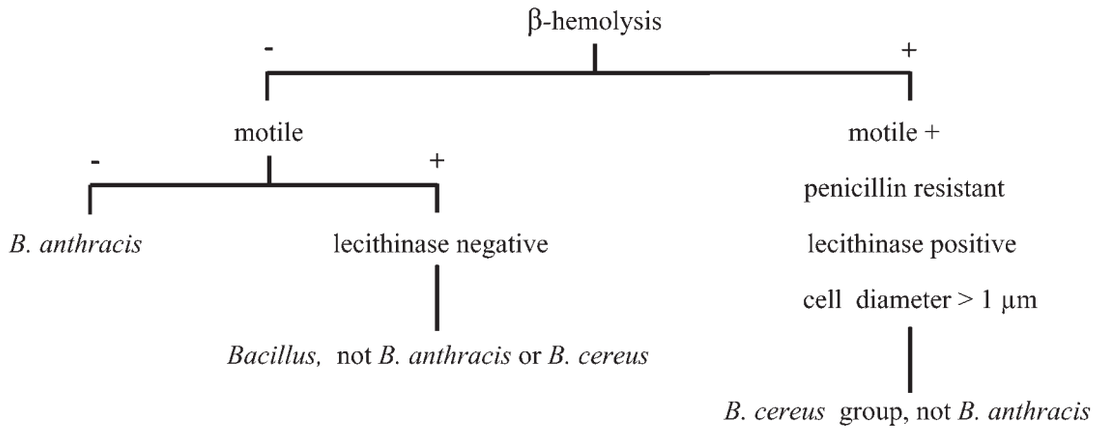
Species	Mean diam. of cell >1µm	β-Hemolysis	Motility	Lecithinase	Penicillin
B. anthracis	+	_	_	+	S
B. cereus	+	+	+	+	R
B. thuringiensis	+	+	+,V	+	R
B. mycoides	+	V	_	+	R
B. megaterium	+	V	+,V	_	S
Other *Bacillus* spp. And related groups	–	_+	+,V	_	V

14-0992(001-354)editnew130158.indd 134 1/14/58 BE 3:51 PM

ถ้าพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ > 1μm สลายเม็ดเลือดแดงได้ ดื้อเพนนิซิลิน lecithinase positive ให้รายงาน "*B. cereus group*, not *B. anthracis*"

ถ้าพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ แต่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง และ/หรือ lecithinase negative รายงาน "*Bacillus*, not *B. anthracis* or *B. cereus*"

แผนภูมิที่ 5.2-1 ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัย *Bacillus*



เอกสารอ้างอิง

1. Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-Positive Rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 413-442.
2. Logan NA, Hoffmaster AR, Shadomy SV, Stauffer KE. Bacillus and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 381-402.
3. Synder JW. *Corynebacterium diphtheria* Cultures. In: Garcia LS, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2007. p.3.11.7.1-3.11.7.10.
4. York MK, Ruoff KL, Clarridge III J, Bernard K. Identification of Gram-Positive Bacteria. In: Garcia LS editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2007 Update. p. 3.18.1.1- 3.18.1.17.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 135 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.3 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย Gram-Negative Cocci

วันทนา ปวีณกิตติพร

เชื้อแบคทีเรีย gram-negative cocci ที่พบในคนมี 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งเป็นแบคทีเรียใน genus *Neisseria* ได้แก่ *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. polysaccharea*, *N. mucosa*, *N. sicca* และ *N. subflava* อีกกลุ่มเป็นแบคทีเรียใน genus *Moraxella* ได้แก่ *M. catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) และ *M. canis* (ติดเชื้อจากการถูกสุนัข หรือ แมวกัด) แต่แบคทีเรีย gram-negative cocci ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยพบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่มีความรุนแรงได้บ่อยคือ *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* และ *M. catarrhalis* เมื่อย้อมแกรมแบคทีเรียทั้ง 3 species จะเห็นเซลล์รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว ส่วนใหญ่อยู่เป็นคู่โดยหันส่วนที่เว้าเข้าหากันเหมือนรูปไต จึงเรียกว่า diplococci และอาจเห็นแบบ 4 เซลล์ (tetrads) ได้ ทั้ง 3 species เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่เคลื่อนไหว ให้ผลบวกของการทดสอบ oxidase และ catalase ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในเชื้อ *Neisseria* species และ coccoid moraxellae อื่นด้วย จึงจำเป็นต้องแยกเชื้อก่อโรคดังกล่าวในระดับ species เพื่อช่วยในการวินิจฉัยและรักษาโรคของแพทย์

Neisseria gonorrhoeae

เป็นแบคทีเรียที่จัดเป็นเชื้อก่อโรคโดยมีคนเป็น host เท่านั้น ส่วนใหญ่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ทำให้เกิดโรคหนองใน (gonorrhea) และการติดเชื้อที่เยื่อเมือกของ pharynx (pharyngitis และ tonsillitis) และตาของเด็กแรกคลอด (gonococcal conjunctivitis) การติดเชื้อในกระแสเลือดพบได้น้อยกว่า 2 กรณีข้างต้น *N. gonorrhoeae* เจริญไม่ดีบน BA การเพาะเชื้อควรใช้ทั้ง selective (MTM) และ non selective media (CA) อบที่ 35-37 ^{o}C ในภาวะที่มี 5-10 % CO_2 นาน 24-72 ชม. ลักษณะโคโลนีบน CA กลม เรียบ มีสีขาวอมเทา มันวาว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อความแห้ง และกรดไขมันในเส้นใยฝ้าย การเก็บสิ่งตรวจโดยใช้ swab จึงต้องเป็นชนิด Dacron หรือ Rayon swab นำส่งใน Amies' หรือ Stuart's transport medium และส่งห้องปฏิบัติการโดยไม่แช่เย็น การทำ direct smear ควรหมุน swab อย่างเบาๆ บนสไลด์เพื่อไม่ให้เซลล์ย่นหรือขาด

Neisseria meningitidis

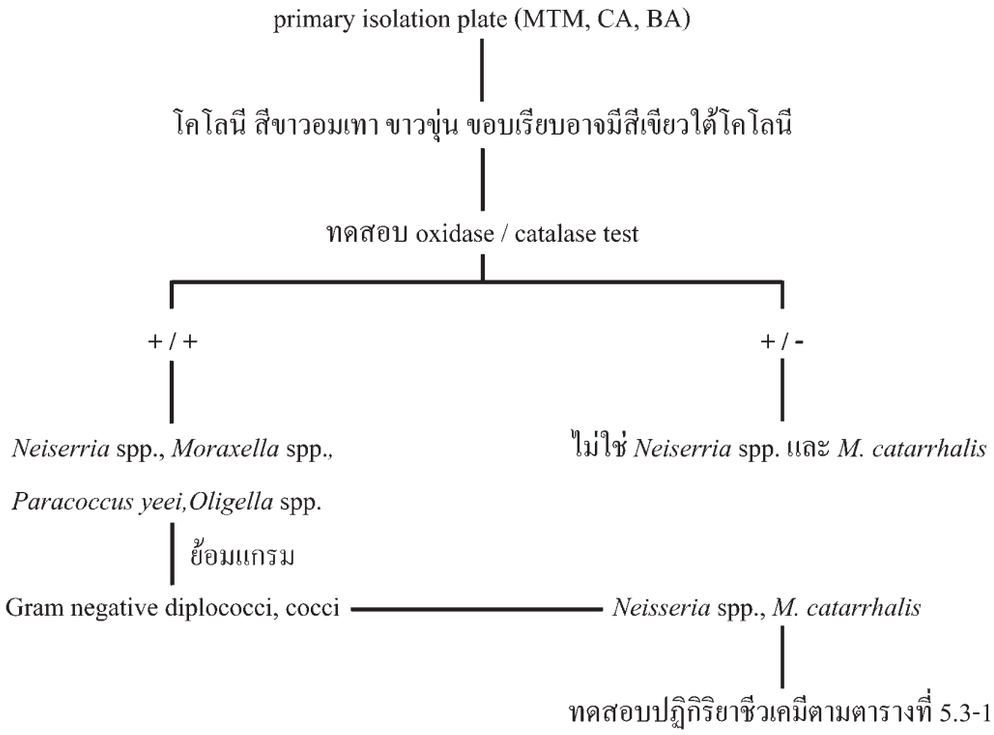
เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) หรือโรคไข้กาฬหลังแอ่นและการติดเชื้อในเลือด (meningococcemia) สิ่งตรวจส่วนใหญ่จึงเป็น CSF และเลือด หรือ body fluid สามารถเจริญได้ทั้งบน BA และ CA ในภาวะที่มี 5-10% CO_2 ถ้าแยกเชื้อจาก nasopharyngeal swab เพื่อตรวจหาคนที่เป็นพาหะ

ควรเพาะบน MTM ควบคู่ไปด้วย โคโลนีมีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีเทา มันวาว บางสายพันธุ์ให้โคโลนีเยิ้ม (mucoid) ได้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm เชื้อ *N. meningitidis* มี 12 serogroup ได้แก่ A, B, C, H, I, K, L, X, Y, Z, W135, และ 29E แบ่งตามชนิดของ antigen บน capsule การหา serogroup ของเชื้อมีประโยชน์ทางระบาดวิทยา สามารถส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิง เช่น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

Moraxella catarrhalis

เป็นแบคทีเรียที่เป็นได้ทั้ง normal flora และเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจของคน พบในผู้ป่วย bronchitis, bronchiectasis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), otitis media (ส่วนใหญ่พบในเด็ก) sinusitis และ pneumonia นอกจากนี้ยังพบเป็นสาเหตุของ endocarditis และ meningitis *M. catarrhalis* เจริญได้ดีบน NA, BA และ CA รวมทั้ง MTM โคโลนีมีสีขาวขุ่น ถึงเทา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 mm เมื่อใช้ loop เขี่ยเชื้อจะหลุดมาทั้งโคโลนี เชื้อไม่ย่อยสลายน้ำตาล สายพันธุ์ส่วนใหญ่สร้างเอ็นไซม์ β-lactamase สามารถแยกได้จาก *Neisseria* species โดยคุณสมบัติการสร้างเอ็นไซม์ DNase

แผนภูมิที่ 5.3-1 ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ gram-negative cocci



14-0992(001-354)editnew130158.indd 137 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.3-1 Differentiation of *Neisseria* spp. and *M. catarrhalis*

Organisms	Morphology	Growth on NA, 35 °C	Acid production from			DNase	Nitrate reduction
			GAL	MAL	LAC		
N. bacilliformis	rod	ND	-	-	-	-	V
N. cinerea	diplococci	-	-	-	-	-	-
N. elongata	rod	+	V	-	-	-	-
N. gonorrhoeae	diplococci	-	+	-	-	-	-
N. lactamica	diplococci	-	+	+	+	-	-
N. meningitidis	diplococci	-	+	+	-	-	-
N. mucosa	diplococci	+	+	+	-	-	+
N. polysaccharea	diplococci	+	+	+	-	-	-
N. sicca	diplococci	+	+	+	-	-	-
N. subflava	diplococci	+	+	+	-	-	-
N. weaveri	rod	+	-	-	-	-	-
M. catarrhalis	diplococci	+	-	-	-	+	+

NA = nutrient agar; ND = not determined; GAL = glucose; MAL = maltose; LAC= lactose; V = variation

เอกสารอ้างอิง

1. Elias J., Frosch M., and Vogel U. Neisseria. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 559-573.
2. Koneman EW, et al. *Neisseria* species and *Moraxella catarrhalis*. In: Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 566-622.
3. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Nemec A, Kampeer P, Wauters G. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other Nonfermentative Gram–Negative Rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.714-738.

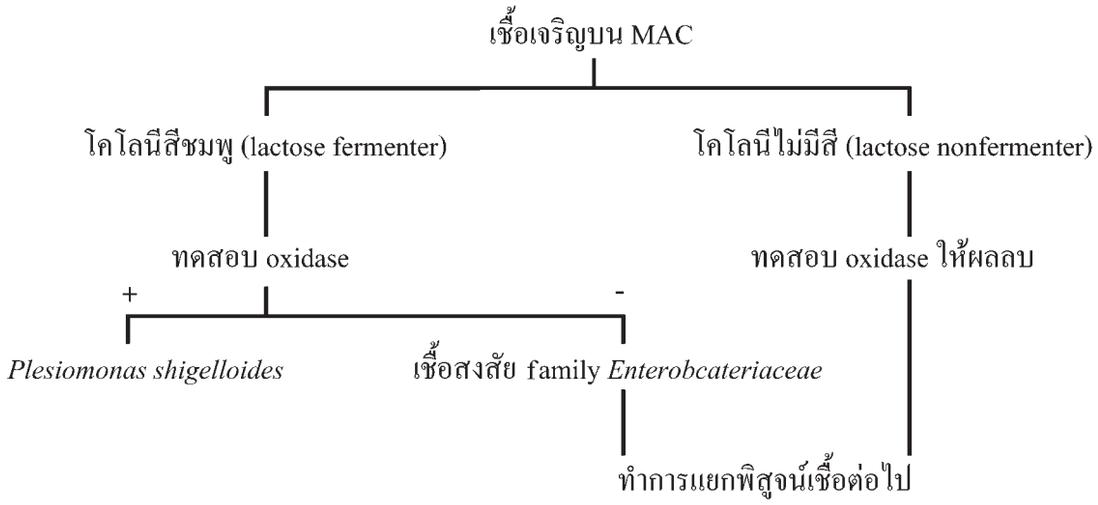
14-0992(001-354)editnew130158.indd 138 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.4 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย Family *Enterobacteriaceae*

วรดา สโมสรสุข

แบคทีเรียใน family *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยๆ จากสิ่งตรวจผู้ป่วย แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเชื้อแกรมลบ รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C แม้ว่าบางชนิดจะเจริญได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25-30 ^{o}C เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะ facultative anaerobe สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และบางชนิดให้ก๊าซด้วย นอกจากนี้เกือบทั้งหมดให้ผลลบต่อการทดสอบ oxidase **ยกเว้น *Plesiomonas shigelloides*** นอกจากนี้ เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase ยกเว้น *Shigella dysenteriae* type 1 (Karas et al., 2007) การแยกชนิดของเชื้อใน family *Enterobacteriaceae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose fermenter) และกลุ่มที่ไม่หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส (non-lactose fermenter) ซึ่งสามารถดูได้จากการเจริญบน MAC เชื้อที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสได้จะให้ลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพู เชื้อที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสจะให้โคโลนีไม่มีสี (แผนภูมิที่ 5.4-1)

แผนภูมิที่ 5.4-1 เชื้อที่สงสัย family *Enterobcateriaceae*



เชื้อที่สงสัยอยู่ใน family *Enterobacteriaceae* ที่มีความสำคัญทางคลินิก มีหลายสายพันธุ์ ทำให้การแยกพิสูจน์เชื้อต้องใช้วิธีการทดสอบเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ในบทนี้ได้ทำการเลือกวิธีทดสอบที่ควรมีใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้การจำแนกเชื้อได้ถูกต้องมากขึ้น ดังนี้ TSI (ดูการสร้างก๊าซ, การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์) PDA, LDC, ODC, indole, motility, methyl red, VP, citrate, urea, malonate, gelatin/DNase, esculin, ONPG, yellow pigement, red pigment, การหมักย่อยน้ำตาล ได้แก่ lactose (สามารถดูได้จากโคโลนีที่ขึ้นบน MAC), sucrose, maltose, mannitol, adonitol, sorbitol และ arabinose

เชื้อตระกูล *Enterobcateriaceae* สามารถแยกกลุ่มเบื้องต้นออกจากกันโดยการใช้ TSI ได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 TSI = A/A หรือ A/AG, H_2S-

กลุ่มที่ 2 TSI = A/A หรือ A/AG, H_2S+

กลุ่มที่ 3 TSI = K/A หรือ K/AG, H_2S-

กลุ่มที่ 4 TSI = K/A หรือ K/AG, H_2S+

เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นและแยกออกด้วยผล TSI แล้ว จะทำการแยกกลุ่มเชื้อต่อไปด้วยผลของการสร้างเอนไซม์ deaminase ของเชื้อ โดยใช้การทดสอบที่เรียกว่า phenylalanine deaminase (PDA)

เชื้อในกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S- จะถูกพิสูจน์ ดังตารางที่ 5.4-1 ถึง 4 และ แผนภูมิที่ 5.4-2 ถึง 5
เชื้อในกลุ่มที่ 2 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S+ จะถูกพิสูจน์ ดังตารางที่ 5.4-5 และแผนภูมิที่ 5.4-6
เชื้อในกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S- จะถูกพิสูจน์ ดังตารางที่ 5.4-6 ถึง 9 และแผนภูมิที่ 5.4-7 ถึง 10
เชื้อในกลุ่มที่ 4 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S+ จะถูกพิสูจน์ ดังตารางที่ 5.4-10 และแผนภูมิที่ 5.4-11

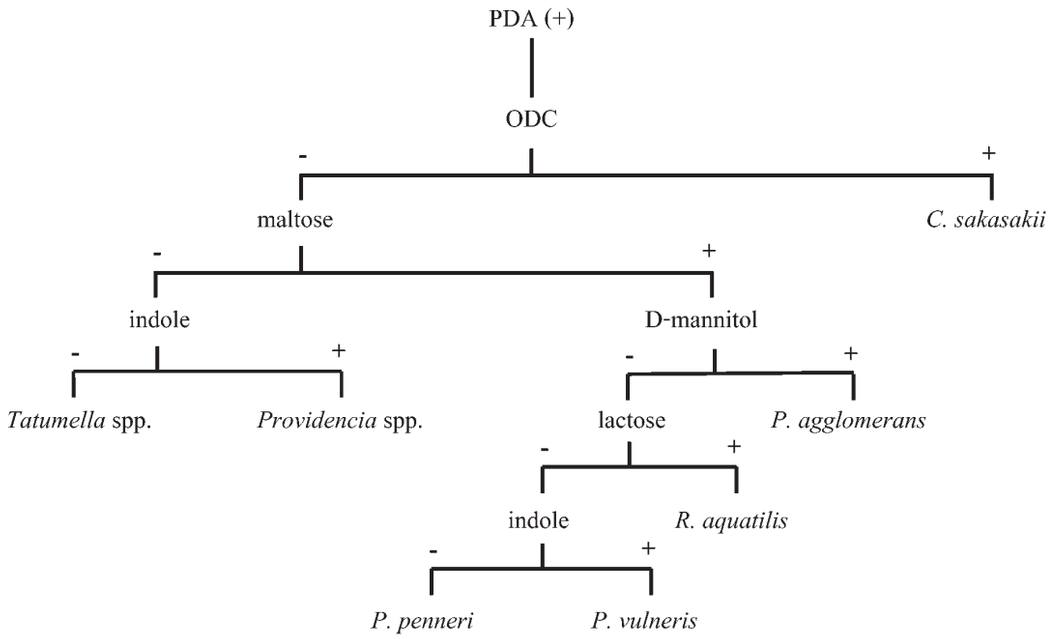
14-0992(001-354)editnew130158.indd 140 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.4-1 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S- , PDA (+)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Yellow pigment	Indole production	Motility	D-Glucose, gas	Fermentation of			
								Lactose	Sucrose	Maltose	D-Mannitol
Cronobacter sakazakii	V	-	+	+	V	+	+	+	+	+	+
Pantoea agglomerans	V	-	-	V	V	+	V	V	V	+	+
Proteus penneri	+	-	-	-	-	+	V	-	+	+	-
Proteus vulgaris	+	-	-	-	+	+	V	-	+	+	-
Providencia spp.	+	-	-	-	+	V	V	V	V	-	V
Rahnella aquatilis	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Tatumella ptyseos	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

V, >11 - <80% positive

แผนภูมิที่ 5.4-2 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S- , PDA (+)



14-0992(001-354)editnew130158.indd 141 1/14/58 BE 3:51 PM

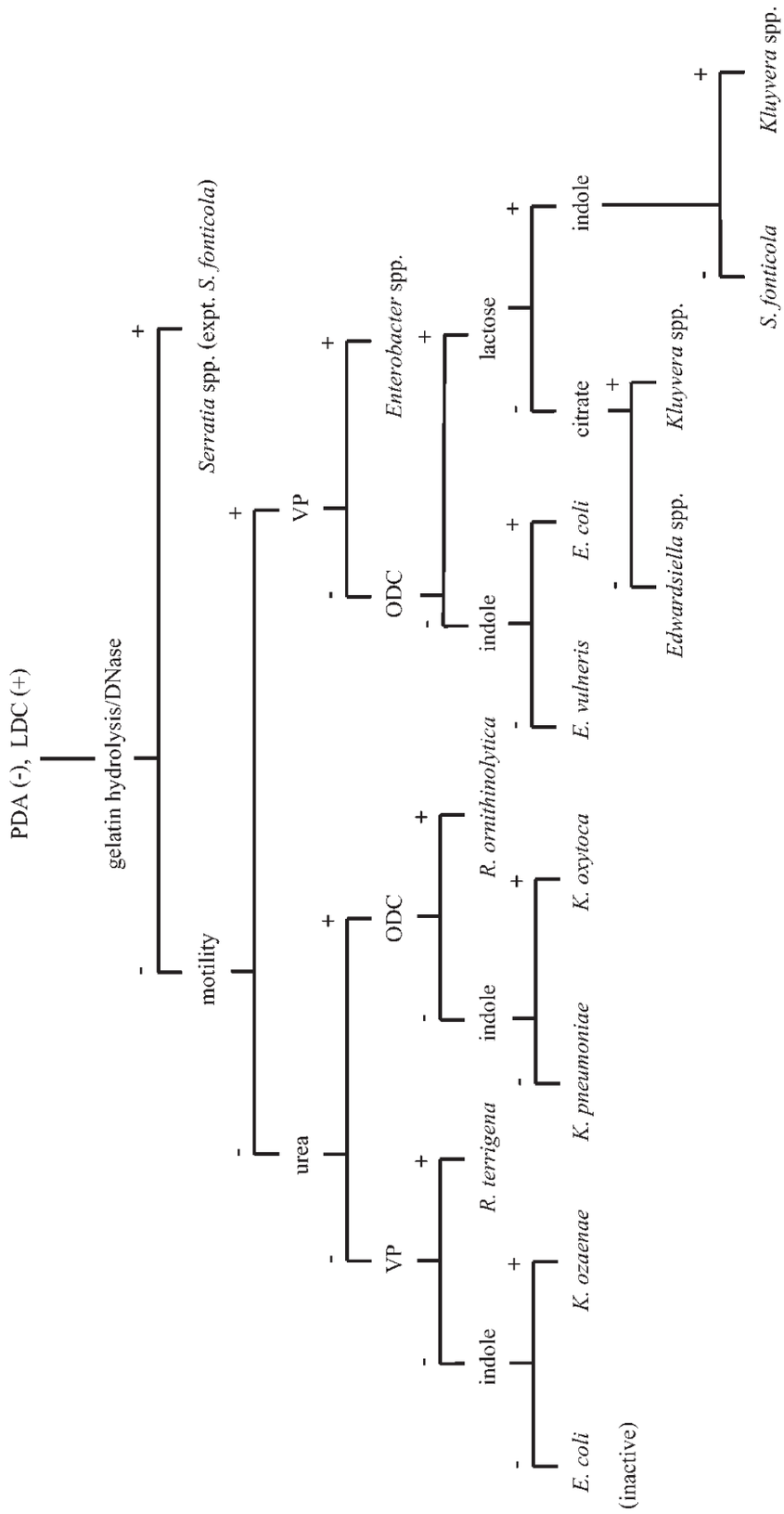
ตารางที่ 5.4-2 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S- , PDA (-), LDC (+)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Yellow pigment	Indole production	Motility	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	Gelatin hydrolysis (22 °C)	DNase (25 °C)	D-Glucose, gas	Fermentation of	
													Lactose	Sucrose
Edwardsiella spp.	-	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	V	-	+
Enterobacter spp.	-	+	+	-	-	+	+	+	V	-	-	+	V	+
Escherichia coli	-	+	V	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	V
Escherichia coli (inactive)	-	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	V
Escherichia vulneris	-	+	-	V	-	+	-	-	-	-	-	+	V	-
Klebsiella oxytoca	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Klebsiella ozaenae	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	V	V
Klebsiella pneumoniae	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Kluyvera spp.	-	V	+	-	+	+	-	+	-	-	-	V	+	+
Raoultella ornithinolytica	-	+	+	-	+	-	V	+	+	-	-	+	+	+
Raoultella terrigena	-	+	V	-	-	-	+	V	-	-	-	+	+	+
Serratia spp.	-	V	V	-	V	V	V	+	V	V	+	V	-	+
Serratia fonticola	-	+	+	-	-	+	-	+	V	-	-	V	+	V

V , >11 - <80% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 142 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-3 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA (-), LDC (+)



14-0992(001-354)editnew130158.indd 143 1/14/58 BE 3:51 PM

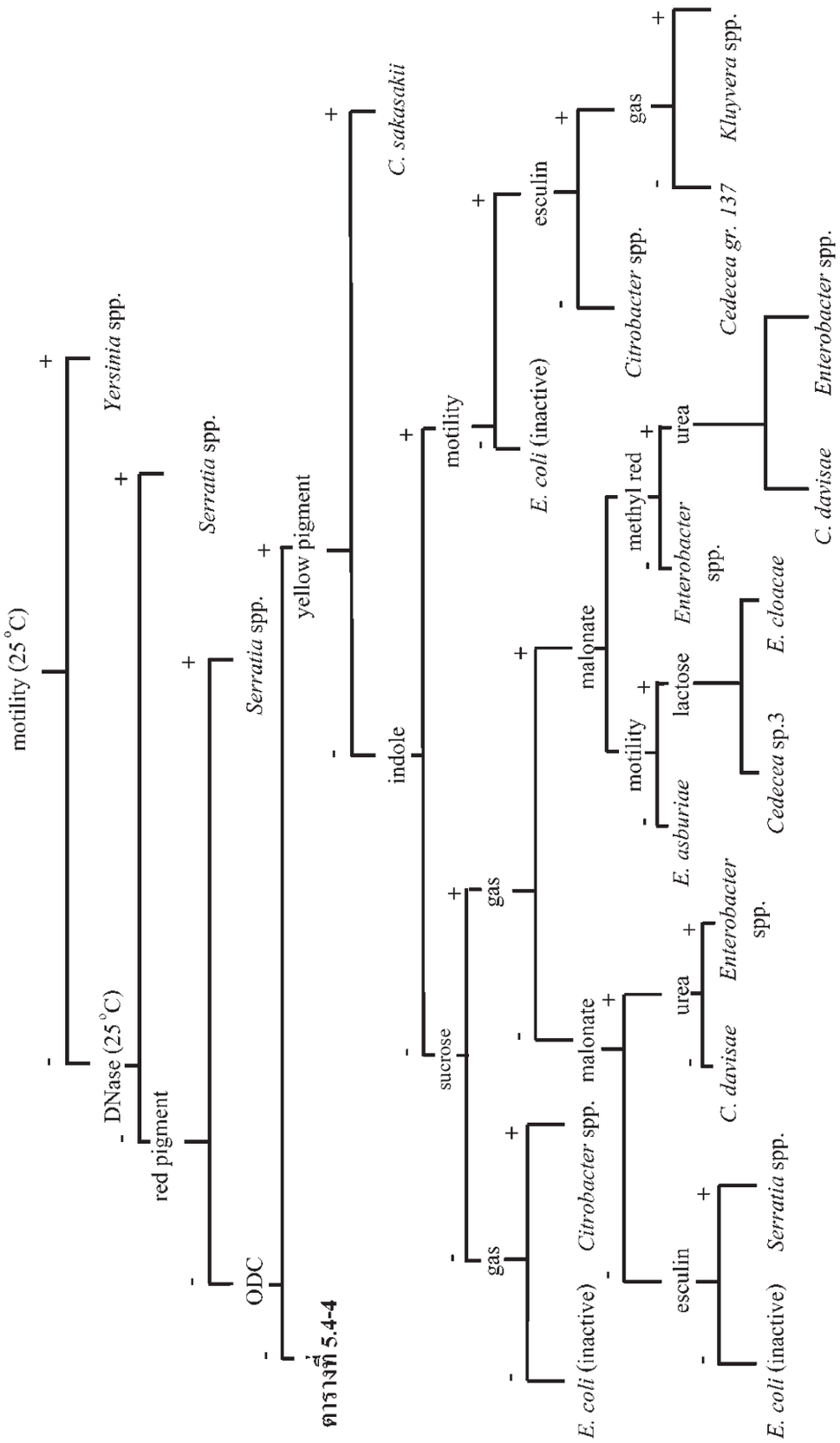
ตารางที่ 5.4-3 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S- , PDA (-), LDC (-)

Organism	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Yellow pigment	Indole production	Motility (25 °C)	Motility	Voges-Proskauer	Methyl red	Urea hydrolysis	Gelatin hydrolysis (22 °C)	DNase (25 °C)	Esculin hydrolysis	Malonate utilization	D-Glucose, gas	Fermentation of	
																Lactose	Sucrose
Cedecea davisae	-	-	+	-	-	-	-	+	V	+	+	-	-	-	V	+	V
Cedecea sp. 3	-	-	-	-	-	-	-	+	V	+	+	-	-	-	+	-	+
Citrobacter spp.	-	-	+	-	-	V	-	V	-	+	V	V	-	-	-	V	+
Cronobacter sakazakii	V	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	V	+
Enterobacter spp.	-	-	V	-	-	-	-	V	V	V	V	V	-	-	V	V	+
Enterobacter cloacae	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	V	-	-	V	V	+
Escherichia coli (inactive)	-	V	V	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Kluyvera cryocrescens	-	V	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Serratia spp.	-	V	V	-	V	-	-	V	V	V	V	-	V	+	+	V	V
Yersinia spp.	-	-	V	-	-	V	+	-	-	V	V	V	-	-	V	-	V

V , >11 - <80% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 144 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-4 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA (-), LDC (-)



ตารางที่ 5.4-4

14-0992(001-354)editnew060158.indd 145 1/14/58 BE 10:41 AM

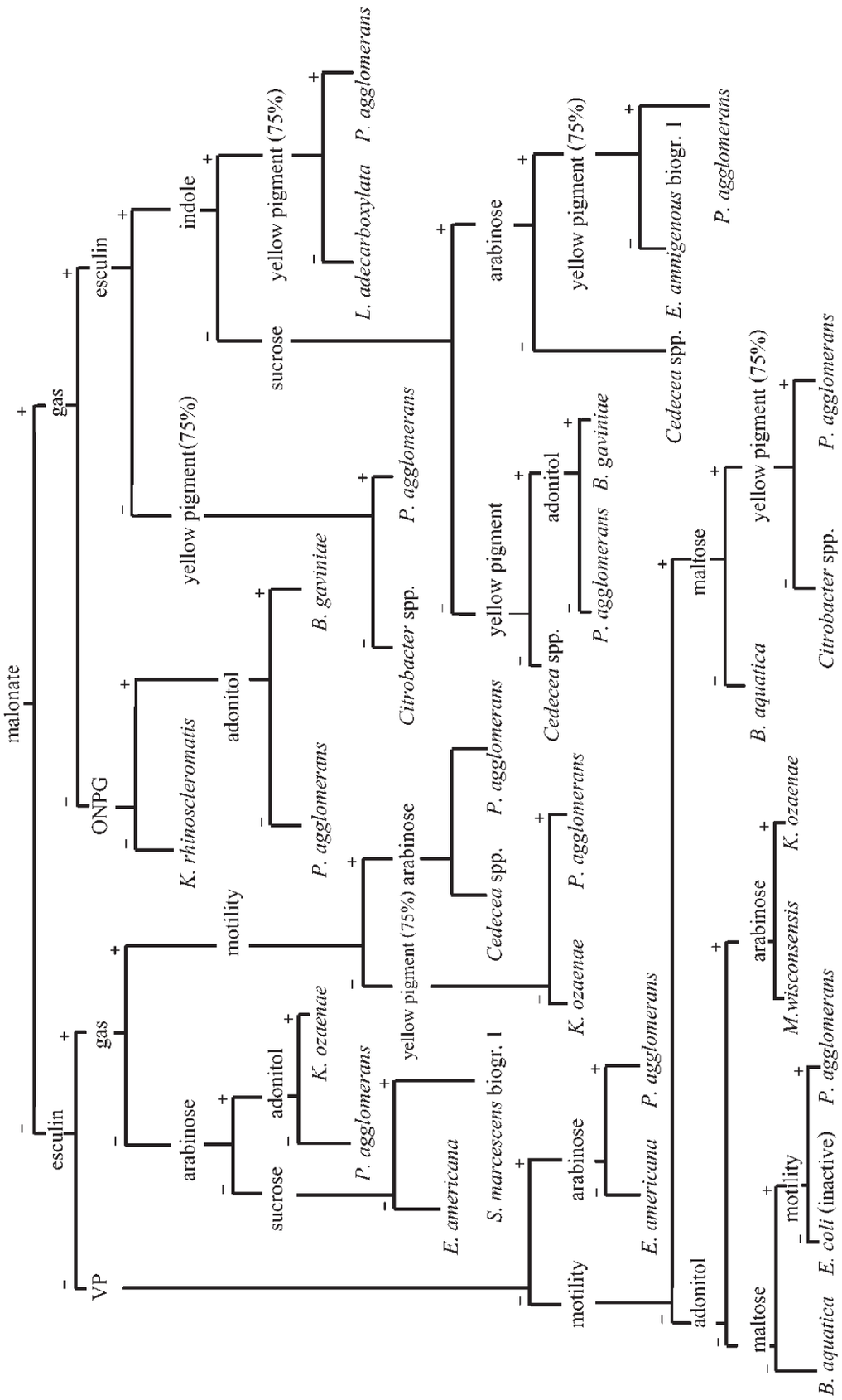
ตารางที่ 5.4-4 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S-, PDA (-), LDC (-), motility 25°C (-), DNase 25 °C (-), red pigment (-), ODC (-)

Organism	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Yellow pigment	Indole production	Motility	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	Gelatin hydrolysis (22 °C)	Esculin hydrolysis	Malonate utilization	ONPG test	D-Glucose, gas	Fermentation of				
															Lactose	Sucrose	Maltose	Adonitol	L-arabinose
Budvicia aquatica	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	+	V	+	-	-	-	+
Buttiauxella gaviniae	-	-	-	-	-	+	-	V	-	-	+	+	+	V	V	-	V	+	+
Cedecea spp.	-	-	V	-	-	+	V	+	-	-	+	V	+	+	V	V	+	-	-
Citrobacter spp.	-	-	-	-	V	V	-	V	V	-	-	V	V	V	V	V	+	-	+
Pantoea agglomerans	V	-	-	V	V	+	V	V	V	-	V	V	+	V	V	V	+	-	+
Enterobacter amnigenus biogr.1	-	-	V	-	-	+	+	V	-	-	+	+	+	+	V	+	+	-	+
Escherichia coli (inactive)	-	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	V	V	+	-	+
Ewingella americana	-	-	-	-	-	V	+	+	-	-	V	-	+	-	V	0	V	-	-
Klebsiella ozaenae	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	+	-	+	V	V	V	+	+	+
Klebsiella rhinoscleromatis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+	-	-	-	V	+	+	+
Leclercia adecarboxylata	-	-	-	-	+	V	-	-	V	-	+	+	+	+	+	V	+	+	+
Moellerella wisconsensis	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	V	+	-
Serratia marcescens biogr.1	-	V	V	-	-	V	V	V	-	V	+	-	V	-	-	+	V	V	-

V, >11 - <80% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 146 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-5 การแยกพิสูจน์ชื่อกลุ่มที่ 1 TSI : A/A หรือ A/AG, H2S-, PDA (-), LDC (-), motility 25 °C (-), DNase 25°C (-), red pigment (-), ODC (-)



บทที่ 5

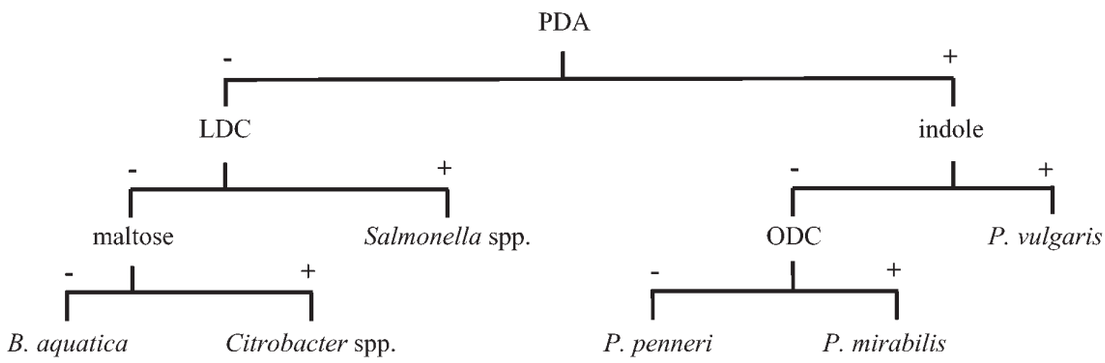
14-0992(001-354)editnew060158.indd 147 1/14/58 BE 10:41 AM

ตารางที่ 5.4-5 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 2 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S+

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Indole production	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	D-Glucose, gas	Fermentation of	
									Lactose	Sucrose
Budvicia aquatica	-	-	-	-	-	-	V	V	+	-
Citrobacter spp.	-	-	-	V	-	V	V	V	V	V
Proteus mirabilis	+	-	+	-	V	V	+	+	-	V
Proteus vulgaris	+	-	-	+	-	V	+	+	-	+
Proteus penneri	+	-	-	-	-	-	+	V	-	+
Salmonella spp.	-	+	+	-	-	+	-	+	V	-

V, >11 - <80% positive

แผนภูมิที่ 5.4-6 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 2 TSI : A/A หรือ A/AG, H_2S+



14-0992(001-354)editnew130158.indd 148 1/14/58 BE 3:51 PM

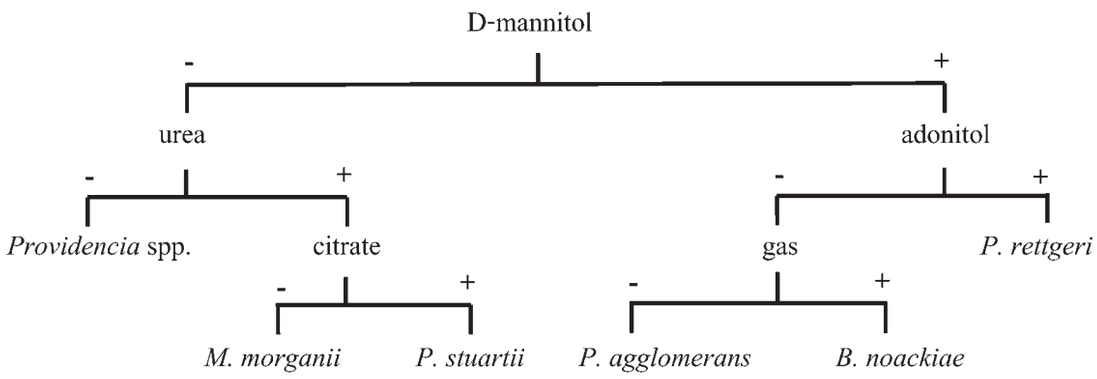
ตารางที่ 5.4-6 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA (+)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Indole production	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	Motility	D-Glucose, gas	Fermentation of			
									Lactose	Sucrose	D-Mannitol	Adonitol
Buttiauxella noackiae	+	-	-	V	V	-	+	+	-	-	+	-
Pantoea agglomerans	V	-	-	V	V	V	+	V	V	V	+	-
Morganella morganii	+	V	V	V	-	+	V	+	-	-	-	-
Providencia spp.	+	-	-	V	V	-	V	V	-	V	-	V
Providencia rettgeri	+	-	-	+	+	+	+	-	-	V	+	+
Providencia stuartii	+	-	-	+	+	V	+	-	-	V	-	-

V , >11 - <80% positive

บทที่ 5

แผนภูมิที่ 5.4-7 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA (+)



14-0992(001-354)editnew130158.indd 149 1/14/58 BE 3:51 PM

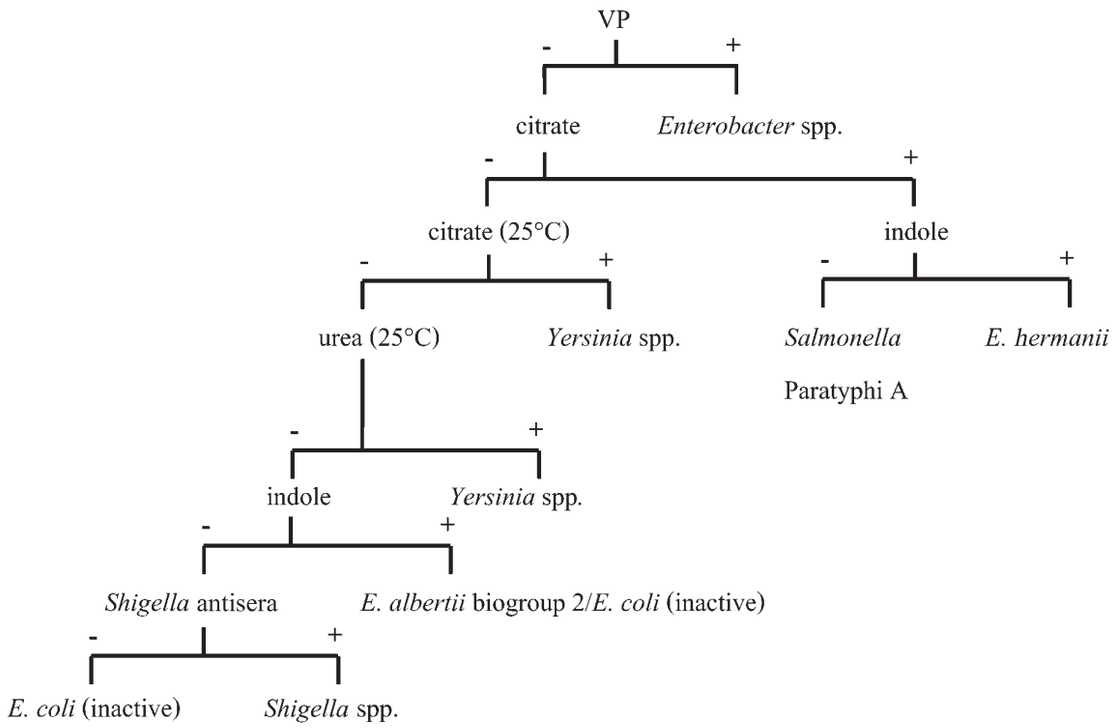
ตารางที่ 5.4-7 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA (-), LDC (-) ODC (+)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Indole production	Motility	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Citrate (25°)	Urea hydrolysis	Urea hydrolysis (25°)	D-Glucose, gas	Fermentation of	
												Lactose	Sucrose
Citrobacter spp.	-	-	+	V	+	-	+	-	V	-	+	V	-
Enterobacter spp.	-	-	+	-	V	+	+	-	-	-	+	V	-
Escherichia albertii biogroup 2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Escherichia coli (inactive)	-	V	V	+	-	-	-	-	-	-	-	V	V
Escherichia hermanii	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	V	V
Salmonella Paratyphi A	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Shigella sonnei (serogroup D)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia spp.	-	-	V	V	-	-	-	V	V	+	V	-	V

V, >11 - <80% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 150 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-8 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA (-), LDC (-) ODC (+)



บทที่ 5

14-0992(001-354)editnew060158.indd 151 1/14/58 BE 10:41 AM

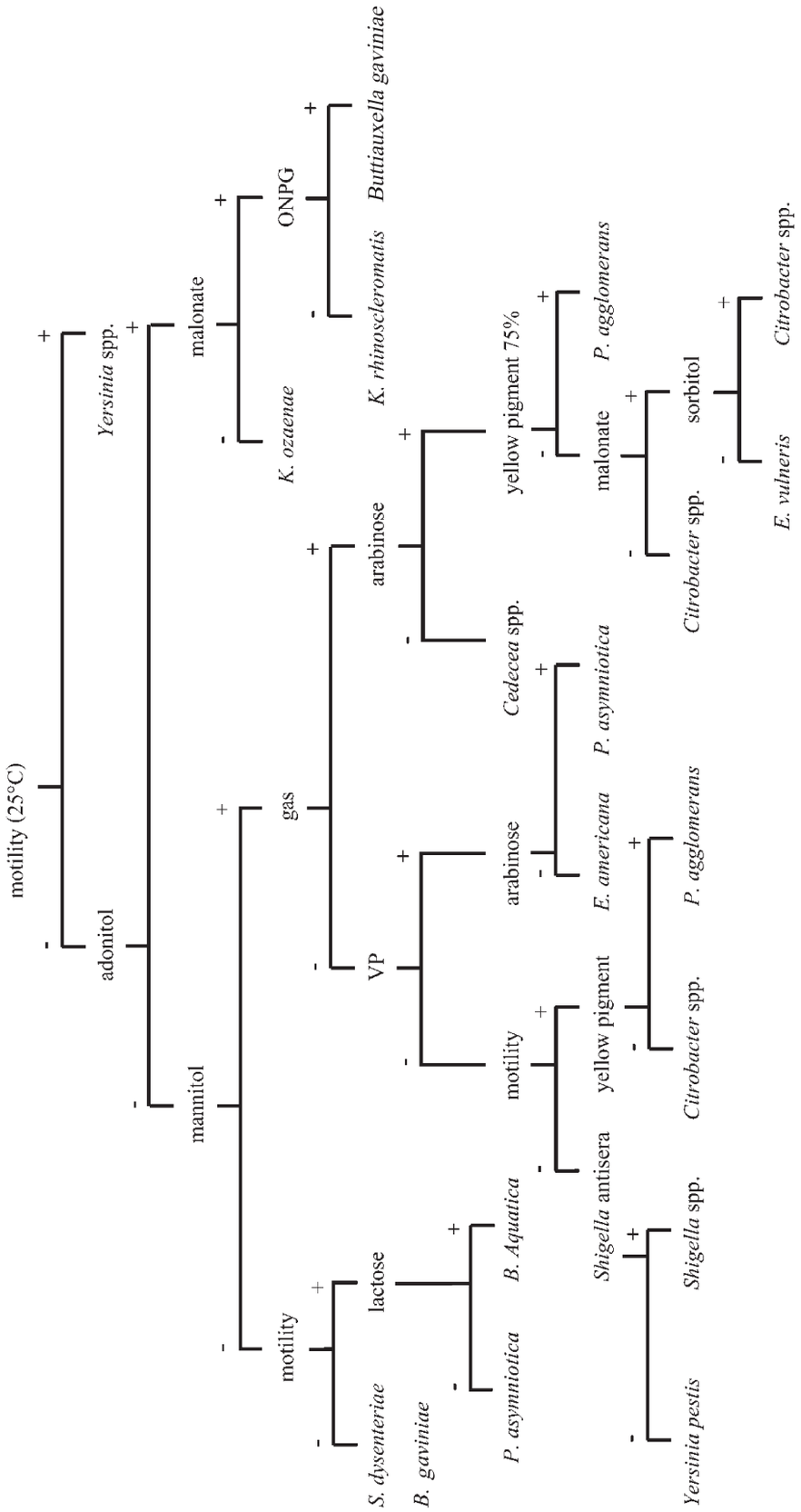
ตารางที่ 5.4-8 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S-, PDA (-), LDC (-) ODC (-)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Yellow pigment	Indole production	Motility	Motility (25 °C)	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	Malonate utilization	ONPG test	D-Glu cose, gas	Fermentation of					
														Lactose	Sucrose	Adonitol	D-Mannitol	L-Arabinose	Sorbitol
Budvicia aquatica	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	V	+	-	-	V	+	-
Buttiauxella gaviniae	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	+	+	V	V	-	+	+	+	-
Cedecea spp.	-	-	-	-	-	+	-	V	+	-	V	+	+	V	V	-	+	-	-
Citrobacter spp.	-	-	-	-	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	V	-	+	+	+
Pantoea agglomerans	V	-	-	V	V	+	-	V	V	V	V	+	V	V	V	-	+	+	V
Escherichia coli (inactive)	-	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	V	V	-	+	+	V
Escherichia vulneris	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	V	-	-	+	+	-
Ewingella americana	-	-	-	-	-	V	-	+	+	-	-	+	-	V	-	-	+	-	-
Klebsiella ozaenae	-	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	+	V	V	V	+	+	+	V
Klebsiella rhinoscleromatis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	+	+	+	+
Photorhabdus asymniotica	-	-	-	V	-	+	-	-	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae serogroup A	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	V
Shigella spp.	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	V
Yersinia pestis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	V
Yersinia spp.	-	-	V	-	-	-	+	-	-	V	-	V	-	-	V	-	+	V	V

V, >11 - <80% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 152 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-9 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H2S-, PDA (-), LDC (-), ODC (-)



บทที่ 5

14-0992(001-354)editnew060158.indd 153 1/14/58 BE 10:41 AM

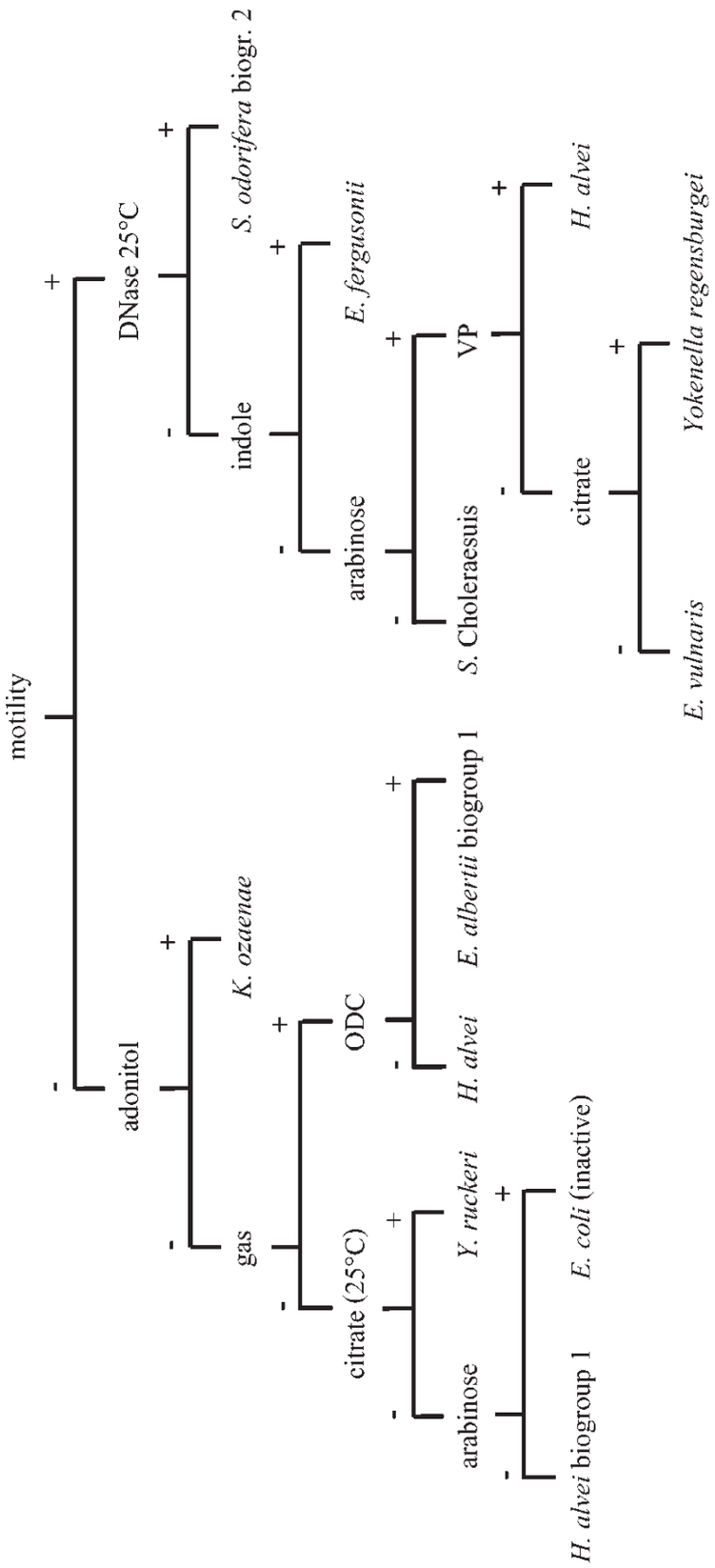
ตารางที่ 5.4-9 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H2S-, PDA (-), LDC (+)

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Indole production	Motility	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Urea hydrolysis	Malonate utilization	DNase (25 °C)	Gas from Glucose	Fermentation of			
												Lactose	Sucrose	Adonitol	L-Arabinose
Escherichia albertii biogroup 1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Escherichia coli (inactive)	-	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	V	V	-	V
Escherichia fergusonii	-	+	+	+	+	-	V	-	V	-	+	-	-	+	+
Escherichia vulneris	-	V	-	-	+	-	-	-	V	-	+	V	-	-	+
Hafnia alvei	-	+	+	-	V	V	-	-	V	-	+	-	-	-	+
Hafnia alvei biogroup 1	-	+	V	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Klebsiella ozaenae	-	V	-	-	-	-	V	-	-	-	V	V	V	+	+
Salmonella enterica (Group I) serotype Choleraesuis	-	+	+	-	+	-	V	-	-	-	+	-	-	-	-
Serratia odorifera biogroup 2	-	+	-	V	+	+	+	-	-	+	V	+	-	V	+
Yersinia ruckeri	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yokenella regensburgei	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

V, >10 - <89% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 154 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-10 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 3 TSI : K/A หรือ K/AG, H2S-, PDA (-), LDC (+)


motility
-
+
adonitol
DNase 25°C
-
+
-
+
gas
indole
citrate (25°C)
ODC
arabinose
arabinose
citrate
VP
-
+
-
+
-
+

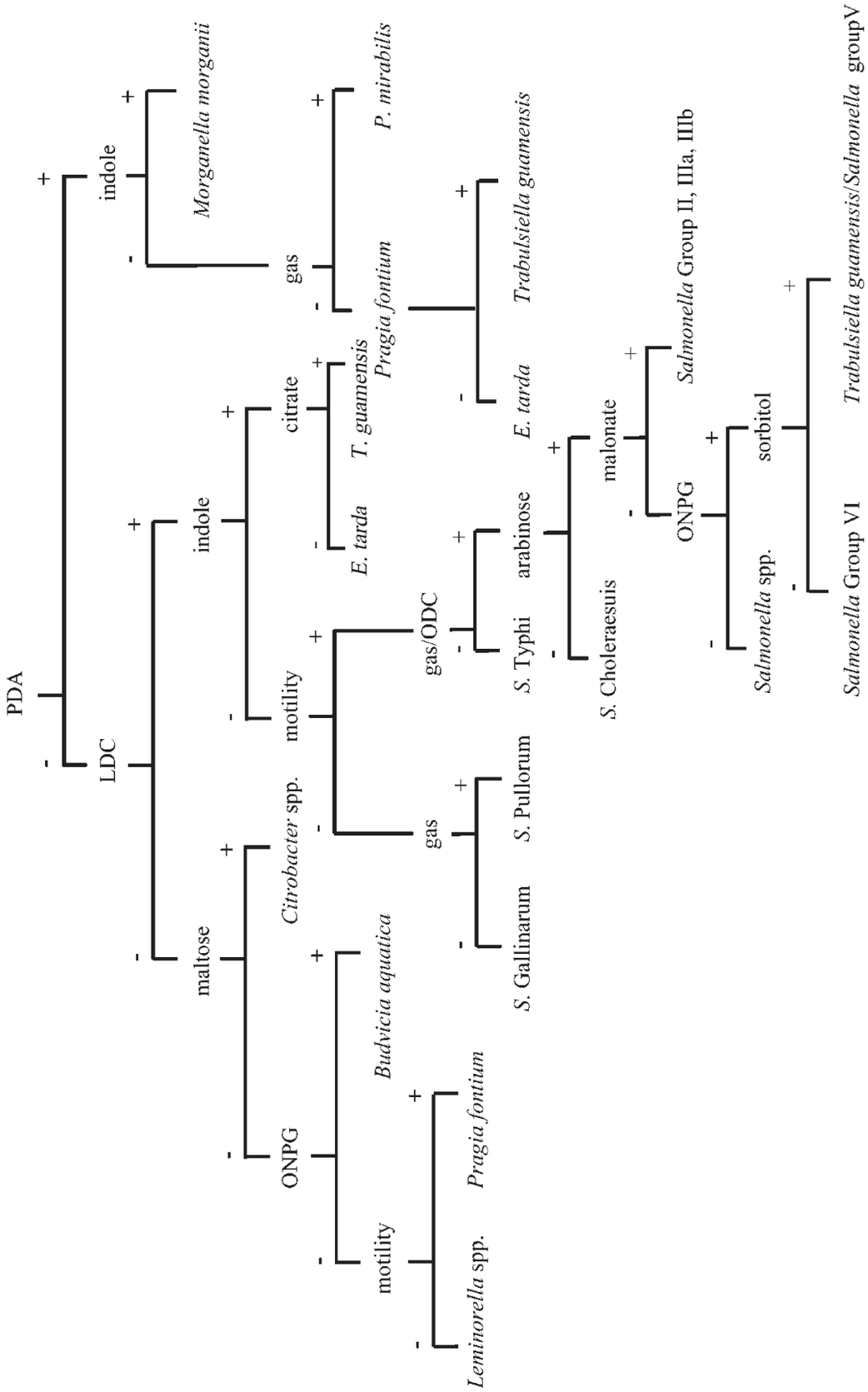
ตารางที่ 5.4-10 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 4 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S+

Organisms	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Indole production	Motility	Citrate (Simmons)	Hydrogen sulfide (TSI)	Malonate utilization	ONPG test	Gas from Glucose	Fermentation of				
											Lactose	Sucrose	L-arabinose	D-sorbitol	Maltose
Budvicia aquatica	-	-	-	-	V	-	V	V	+	V	V	-	+	+	-
Citrobacter spp.	-	-	-	V	V	V	V	V	V	V	V	V	-	-	+
Edwardsiella tarda	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Leminorella spp.	-	-	-	-	-	V	+	-	-	V	-	-	+	-	-
Morganella morganii	+	V	+	+	V	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-
Proteus mirabilis	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	V	-	-	-
Salmonella enterica (group I)	-	+	+	-	+	V	+	-	-	+	V	-	+	+	+
Salmonella Typhi	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Salmonella Choleraesuis	-	+	+	-	+	V	V	-	-	+	-	-	-	+	+
Salmonella Gallinarum	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-	+
Salmonella Pullorum	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Salmonella group II, IIIa, IIIb strains	-	+	+	-	+	+	+	+	V	+	V	-	+	+	+
Salmonella group IV strains	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Salmonella bongori (group V)	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Salmonella group VI strains	-	+	+	-	+	+	+	-	V	+	V	-	+	-	+
Trabulsiella guamensis	-	+	+	V	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+

V, >10 - <89% positive

14-0992(001-354)editnew130158.indd 156 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.4-11 การแยกพิสูจน์เชื้อกลุ่มที่ 4 TSI : K/A หรือ K/AG, H_2S+



บทที่ 5

14-0992(001-354)editnew060158.indd 157 1/14/58 BE 10:41 AM

เอกสารอ้างอิง

1. Abbot, S L. 2007. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and Other *Enterobacteriaceae*. In: P. R. Murray editor Manual of Clinical Microbiology 9th ed., Washington, DC : ASM Press. p. 698-715.
2. Farmer III, J. J., K. D. Boatwright, and J. M. Janda. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: P. R. Murray (ed.), Manual of clinical microbiology, 9th ed. Washington, DC:ASM Press; 2007. p. 649-669.
3. Nataro, J. P., C. A. Bopp, P. I. Fields, J. B. Kaper, and N. A. Strockbine. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: P. R. Murray editor. Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington, DC:ASM Press; 2007. p. 670-687.
4. Walker, K. E., A. J. Horneman, C. R. Mahon, and G. Manusells. *Enterobacteriaceae*. In C. R. Mahon, D. C. Lehman, and G. Manuselis editor. Textbook of Diagnositic Microbiology 4th ed. Maryland Height. Mo:Saunder Elsevier; 2011. p. 427-461.
5. Wanger, A. *Yersinia*. In: P. R. Murray editor. Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington, DC:ASM Press; 2007. p. 688-697.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 158 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.5 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย Family *Vibrionaceae*

บุญช่วย เอี่ยมโภคลาภ

เชื้อใน genus *Vibrio* เป็นเชื้อประเภทแกรมลบรูปแท่งบางชนิดมีรูปร่างโค้งงอ สามารถ ferment น้ำตาล glucose ได้ บางชนิดสร้างก๊าซ เกือบทั้งหมดสร้าง oxidase enzyme บางชนิดต้องการเกลือในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีรายงานว่าทำให้เกิดอุจจาระร่วง บางชนิดเกิดการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆได้ เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้บน highly selective medium เช่น TCBS ในบทนี้จะกล่าวถึงการเพาะแยกและวินิจฉัยเชื้อใน family *Vibrionaceae* รวมถึงเชื้อในกลุ่มใกล้เคียง เช่น *Aeromonas* และ *Plesiomonas* (ซึ่งอยู่ในตระกูล *Enterobacteriaceae*) ด้วย

1. การเพาะแยกและวินิจฉัยเชื้อ *Vibrio* จากอุจจาระ

1.1 การเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อ (enrichment)

การเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อ *Vibrio* ทำได้โดยใส่สิ่งตรวจลงในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น APW แล้วอบที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C ประมาณ 6 ชม. เชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้น การเพาะเชื้อจาก APW ลงบน plate ควรใช้ loop ตักเฉพาะบริเวณผิวด้านบน เพราะจะมีเชื้อจำนวนมาก (ไม่ควรเขย่าหลอด) ถ้าอบนานกว่า 6 ชม. เชื้อที่เป็น normal flora บางชนิดอาจเจริญเพิ่มจำนวน ทำให้ตรวจหา *Vibrio* ได้ยากขึ้น สำหรับเชื้อ *Aeromonas* และ *Plesiomonas* นั้น ยังไม่มีการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อเป็นการเฉพาะ จึงเพาะหาเชื้อนี้โดยวิธี direct plating จากอุจจาระ หรือจาก transport medium ลงบนอาหารเพาะเชื้อโดยตรง

1.2 การเจริญบนอาหารเพาะเชื้อ

โดยทั่วไปเชื้อ *Vibrio* เจริญได้ดีบนอาหารเพาะเชื้อหลายชนิดโดยเฉพาะอาหารชนิด non-selective medium เช่น BA ซึ่ง *Vibrio* โดยทั่วไปจะให้ลักษณะ β-hemolysis บางชนิดอาจให้ α-hemolysis เช่น *Vibrio vulnificus* แต่บางชนิดอาจไม่แสดงลักษณะ hemolysis ก็ได้

อาหารเพาะเชื้อชนิด selective medium ที่นิยมใช้คือ TCBS agar เชื้อที่เจริญได้บนอาหารนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งจะมีขนาดโคโลนีค่อนข้างใหญ่ (2-3 mm ขึ้นไป) และเชื้ออื่นบางชนิดก็อาจเจริญได้ แต่โดยทั่วไปโคโลนีจะเล็กกว่า เชื้อที่เจริญบน TCBS agar ถ้าหมักย่อยน้ำตาล sucrose ได้ จะให้โคโลนีสีเหลือง ถ้าหมักย่อยน้ำตาล sucrose ไม่ได้ จะให้โคโลนีสีเขียว

สำหรับเชื้อ *Aeromonas* และ *Plesiomonas* โดยทั่วไปไม่เจริญบน TCBS แต่สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดอื่นที่ใช้อยู่ตามปกติ เช่น SS หรือ MAC เป็นต้น ลักษณะโคโลนีของ *Plesiomonas* อาจคล้าย *Shigella* และลักษณะโคโลนีของ *Aeromonas* จะค่อนข้างใหญ่ อาจแบนหรือนูนได้ และไม่ ferment น้ำตาล lactose ลักษณะของเชื้อทั้งสองอาจไม่สามารถแยกจากเชื้ออื่นที่เป็น normal flora ได้ชัดเจน จึงควรทำ oxidase test ก่อน แล้วเลี้ยงเชื้อลงใน TSI และดูลักษณะของ TSI ในวันรุ่งขึ้น

1.3 การวินิจฉัยเชื้อ

เมื่อได้ลักษณะโคโลนีบน TCBS แล้ว ในขั้นต้นมักจะทดสอบว่าเชื้อนั้นคือ *Vibrio cholerae* O1 หรือ O139 หรือไม่ ซึ่งทำได้โดยเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองใส ทำปฏิกิริยา agglutination กับ antisera (โดยทั่วไปใช้ *Vibrio cholerae* O1 antiserum ได้แก่ polyvalent, Ogawa, Inaba และ *Vibrio cholerae* O139 antiserum) โดยอาจทดสอบกับ *Vibrio cholerae* polyvalent antiserum ก่อน ถ้าให้ผลลบก็ทดสอบกับ O139 antiserum ถ้าให้ผลบวกกับ polyvalent antiserum ก็ควรทดสอบกับ monovalent antiserum ทั้งสองชนิดคือ Ogawa และ Inaba จึงจะสามารถรายงานผลการตรวจในขั้นต้นได้ เชื้อที่ขึ้นบน TCBS agar และสงสัยว่าเป็นเชื้อ *Vibrio* ทั้งโคโลนีสีเหลือง และโคโลนีสีเขียว ให้ทดสอบ biochemical test เพื่อวินิจฉัย species การทดสอบ biochemical test ของเชื้อ *Vibrio*, *Aeromonas* และ *Plesiomonas* ดูในตารางที่ 5.5-1 และตารางที่ 5.5-2

1.4 การรายงานผล

ถ้าเชื้อที่นำมาวินิจฉัยให้ผลบวกกับ *Vibrio cholerae* O1 antiserum ให้รายงานผล serotype เช่นรายงานว่า *Vibrio cholerae* O1, Ogawa serotype หรือ *Vibrio cholerae* O1, Inaba serotype ถ้าเชื้อให้ผลบวกกับ O139 antiserum รายงานว่า *Vibrio cholerae* O139 เป็นต้น ถ้าให้ผลลบกับ antiserum แต่ผลการทดสอบ biochemical test ได้เป็น *Vibrio cholerae* ให้รายงานว่า *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 สำหรับเชื้อ *Vibrio* อื่น หรือเชื้อ *Aeromonas* และ *Plesiomonas* รายงานตามผลปฏิกิริยาชีวเคมีที่ทดสอบได้

1.5 ข้อควรระวัง

ในการวินิจฉัยเชื้อ *Vibrio* species จาก TCBS agar มีข้อควรระวังบางประการคือ

1. หลอด APW ซึ่งเพาะเชื้อลงบน TCBS agar แล้วยังไม่ควรทิ้งในวันนั้น ควรเก็บไว้อย่างน้อยอีก 1 วัน เพื่อว่าในบางกรณีมีปัญหา อาจต้องนำหลอดมาตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้ง
2. ในการทดสอบความทนเกลือ (salt tolerance) ต้องระวังไม่ใส่เชื้อมากเกินไปจน broth ขุ่น เพราะจะทำให้อ่านเป็นค่าบวก ซึ่งอาจเป็นผลบวกปลอม

14-0992(001-354)editnew130158.indd 160 1/14/58 BE 3:51 PM

3. antiserum ที่ใช้ทดสอบต้องไม่หมดอายุ เพราะ antiserum ที่หมดอายุ อาจให้ผลลบปลอม หรือผลบวกปลอมได้ และ antiserum เมื่อใช้งานเสร็จไม่ควรวางไว้ที่โต๊ะ ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 ^{o}C

2. การเพาะแยกและวินิจฉัย *Vibrio* จากสิ่งตรวจอื่นที่มิใช่อุจจาระ

โดยทั่วไปการเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจอื่นที่มิใช่อุจจาระนั้น จะใช้อาหารเพาะเชื้ออย่างน้อย 2 ชนิด คือ BA และ MAC ซึ่งการเจริญของเชื้อบนอาหารเพาะเชื้อทั้งสองชนิดนี้อาจให้ลักษณะบางประการ ซึ่งจะทำให้นึกถึงว่าอาจเป็นเชื้อ *Vibrio* ลักษณะดังกล่าวได้แก่

2.1 การเจริญบน BA โดยทั่วไปเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* นี้มักจะให้ลักษณะ β-hemolysis ถ้าโคโลนีบน BA มีลักษณะคล้ายเชื้อแกรมลบ (ใหญ่, มันวาว) และมี β-hemolysis ก็ควรทดสอบ oxidase ถ้าให้ผลบวกก็อาจเป็นเชื้อในกลุ่ม non-fermenter หรือเชื้อ *Vibrio* ได้

2.2 การเจริญบน MAC เชื้อ *Vibrio cholerae* หรือเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เมื่อเจริญบน MAC มักจะไม่ ferment น้ำตาล lactose แต่จะให้โคโลนีที่มีสีค่อนข้างคล้ำกว่าสีของเชื้อ non-lactose fermenter ทั่วไป ซึ่งควรทดสอบ oxidase ทุกครั้ง

2.3 ในห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจนำเชื้อที่เพาะได้ไปทดสอบ biochemical test โดยไม่ได้ทดสอบ oxidase ก่อน ซึ่งเชื้อ *Vibrio* และเชื้อในกลุ่มที่ใกล้เคียงบางชนิด อาจให้ปฏิกิริยาที่คล้ายกับเชื้อใน family *Enterobacteriaceae* และอาจรายงานผลผิดพลาดได้ แต่มีข้อสังเกตประการหนึ่งคือ ในการทดสอบ indole production โดยเลี้ยงเชื้อใน SIM medium เมื่อหยด Kovac's reagent ลงไป ถ้าเป็นเชื้อกลุ่ม *Vibrio* มักจะให้ผล indole บวก แต่สีแดงที่เกิดขึ้นมักจะเกิดค่อนข้างช้า และสีมักจะไม่แดงจัดเหมือนกับที่เกิดจากเชื้อ *Enterobacteriaceae* ชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

1. Abbott SL, Cheung WKW and Janda JM. The genus Aeromonas: biochemical characteristics, atypical reaction, and phenotypic schemes. J Clin Microbiol. 2003; 41:2348-57.
2. Abbott SL, Janda JM, Farmer III JJ. Vibrio and Related Organisms. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 666-676.
3. Horneman AJ, Ali A. Aeromonas. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 658-665.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 161 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.5-1 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อ *Vibrio* และ *Plesiomonas*

Test[b]	% Positive for[a]:												
	P. shigelloides	*V. cholerae*	*V. mimicus*	*V. merschnikovii*[c]	*V. cincinnariensis*	*G. hollisae*	*P. damselae*	*V. fluvialis*	*V. fumisii*	*V. alginolyticus*	*V. parahaemolyticus*	*V. tulnificus*[d]	*V. harveyi*
Indole(HIB)	100	99	98	20	8	97	0	13	11	85	98	97	100
VP	0	75	9	96	0	0	95	0	0	95	0	0	50
Moeller's													
Arginine	98	0	0	60	0	0	95	93	100	0	0	0	0
Lysine	99	99	100	35	57	0	50	0	0	99	100	99	100
Ornitine	95	99	99	0	0	100	0	0	0	50	95	55	0
Motility	95	99	98	74	86	0	25	70	89	99	99	99	0
Gelatin hydrolysis (22°C)	0	90	65	65	0	0	6	85	86	90	95	75	0
D-Gluclose, gas production	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0	0	0	0
Acid production from:													
L-Arabinose	0	0	1	0	100	97	0	93	100	1	80	0	0
Cellobiose	0	8	0	9	100	0	0	30	11	3	5	99	50
Lactose	80	7	21	50	0	0	0	3	0	0	1	85	0
myo-Insitol	95	0	0	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Salicin	0	1	0	9	100	0	0	0	0	4	1	95	0
Sucrose	0	100	0	100	100	0	5	100	100	99	1	15	50
ONPG	90	94	90	50	86	0	0	40	35	0	5	75	0
Salt tolerance (growth in nutrent broth with):													
0% NaCl	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6% Nacl	NA	53	49	78	100	83	95	96	100	100	99	65	100
O/129 susceptibility[e]	100	99	65	90	25	40	90	31	0	19	20	98	100

Abbreviations: HIB, heart infusion broth: VP, Voges-Proskauer: ONPG, a-nitrophenyl-b-D-galacropyranoilder; NaCl, sodium chloride: NA, not available

[a] Percentage of strians positive after 48 h of incubation at 36 ^{O}C unless otherwise indicated. Most positive reactions occur within 24 h.

[b] 1% NaCl added to all media except salt tolerance tests.

[c] This organism is oxidase negative and does not reduce nitrate to nitrite.

[d] Biogroup 1 strians.

[e] Zone of inhibition percent(disk content. 15 µg). Data for *Plesiomonas* are from the Microbial Diseases Laboratory.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 162 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.5-2 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อ *Aeromonas*

Test	Result[a]									
	A. hydrophila	*A. bestiarum*	*A. salmonicida*	*A. caviae*	*A. media*	*A. eucrenophila*	*A. veronii*[b]	*A. jandaei*	*A. schubertii*	*A. trota*
Utilization of :										
Citrete	+ (92)[c]	V (38)	+ (85)	+ (88)	V (82)	- (0)	V (52)	+ (87)	V (58)	+ (94)
DL-Lactate	V (84)	- (0)	- (0)	+ (96)	V (56)	- (0)	- (0)	- (7)	V (58)	+ (88)
Urocanic acid	V (16)	+ (94)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	- (0)	- (0)	- (7)	- (0)	V (75)
Gluconate oxcidation	V (64)	- (13)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	V (60)	V(60)	- (0)	- (0)
Gas from D-glucose	+ (92)	V (69)	V (77)	- (0)	- (0)	V (78)	+ (92)	+ (100)	- (0)	V (69)
PZA	V (24)	V 50)	V (31)	+ (88)	V (18)	+ (100)	ND	ND	ND	ND
Indole	+ (96)	+ (100)	+ (100)	V (84)	+ (100)	+ (89)	+ (100)	+ (100)	V (17)	+ (100)
Voges-Proskauer	+ (92)	V (63)	V (62)	- (0)	- (0)	- (0)	+ (92)	+ (87)	V (17)	- (0)
Lipase (corn oil)	+ (100)	+ (88)	+ (92)	V (76)	V (82)	+ (89)	+ (92)	+ (100)	+ (100)	- (0)
Acid from :										
Cellobiose	- (4)	V (38)	V (69)	+ (100)	+ (100)	V (56)	V 20)	V 20)	- (0)	+ (100)
Lactose	V (64)	- (13)	+ (92)	V (60)	V (64)	- (11)	- (12)	- (0)	- (0)	- (0)
L- Rhamnose	V (24)	V (69)	- (0)	- (0)	- (0)	V (22)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
D-Sorbitol	- (0)	- (0)	+ (85)	- (4)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
Glucose-l-phosphate	ND	ND	ND	- (4)	+ (100)	+ (100)	ND	ND	ND	ND
Glucose-6-phosphate	ND	ND	ND	- (4)	+ (100)	+ (100)	ND	ND	ND	ND
Lactulose	ND	ND	ND	V (68)	V (55)	- (0)	ND	ND	ND	ND
D-Mannose	+ (100)	+ (100)	+ (100)	V (32)	+ (100)	+ (100)	ND	+ (100)	+ (92)	+ (100)
Glycerol	+ (96)	+ (100)	+ (100)	V (68)	V(55)	- (11)	+ (100)	+ (100)	- (0)	+ (94)
D-Mannitol	+ (96)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	- (0)	V (69)
Sucrose	+ (100)	+ (94)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	V (33)	+ (100)	- (0)	- (0)	V (19)
Amp[γ]	+ (100)	+ (94)	+ (85)	+ (100)	V (73)	+ (100)	+ (100)	+ (93)	+ (92)	- (6)

[a] Data compiled from Tables 2, 6, 7 and 8 in reference 2 and reprinted with permission. +. ≥85% of the strains positive; -, <15% positive; V, 15 to 85% positive (result at 48 h). Numbers in parentheses indicate percent positive for test at the final day of reading. Gluconate, 2 day; DL-lactate and urocanic acid, 3 days; citrate, 4 day; carbohydrates, indole, and lipase, 7 days; pyrazinamidaes (PZA), 2 days; Amp[R], resistance to 10 μg of ampicillin, 1 day; Voges-Proskauer, 3 days ND, not done.

[b] Blovar sobria (DNA hybridization group 8); the separation of *A.veronii* bv. veronii (DNA hybridization group 10) from *A.veronii* bv. sobria is achieved with *A.veronii* bv. veronii having positive reactions for omithtne decarboxylase and esculin hydrolysis and a negative reaction for arginine dihydrolase.

[c] For each of the three *Aeromonas* species complexes, the discriminatory reactions between the species within each complex are presented in bold type.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 163 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.6 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Glucose Nonfermentative Gram-Negative Bacilli

สุรางค์ เดชศิริเลิศ
เพ็ญแข รัตนพิริยกุล

แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม glucose nonfermentative gram-negative bacilli (NF) มีคุณสมบัติที่เหมือนกันคือไม่ ferment glucose ให้เกิดกรด เชื้อในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในคน สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สลาย glucose โดยขบวนการ oxidation ในหลอดอาหาร OF (glucose) ที่ไม่ได้ปิดทับด้วย liquid paraffin เรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า oxidizer (oxidative bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas*, *Burkholderia* เป็นต้น และกลุ่มที่ไม่สลาย glucose ทั้งในหลอดอาหาร OF (glucose) ที่ปิดและไม่ปิดทับด้วย liquid paraffin เรียกกลุ่มนี้ว่า nonoxidizer (nonoxidative bacteria) เชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่เชื้อกลุ่ม *Alcaligenes*, *Moraxella* เป็นต้น บาง genus อาจเป็นเชื้อที่เจริญช้าหรือต้องการสารอาหารพิเศษในการเจริญ ซึ่งอาจไม่เจริญในอาหารวุ้นที่ใช้ทำ OF test เช่นเชื้อ *Bordetella*, *Brucella*, *Eikenella* และ *Francisella* โดยในบทนี้จะกล่าวถึงเชื้อในกลุ่ม NF เฉพาะเชื้อที่เจริญได้ง่ายบนอาหารเพาะเชื้อทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ glucose nonfermentative gram–negative bacilli

1. รูปร่างแท่ง (rod) ค่อนข้างกลม (coccobacilli) หรือกลม (cocci: *Moraxella catarrhalis*)
2. เป็น strictly aerobic bacteria คือเจริญเติบโตในบรรยากาศที่มีออกซิเจน แต่เชื้อบางชนิดเจริญได้ในสภาพไร้อากาศที่มี electron acceptor อื่นที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น ไนเตรท ด้วยขบวนการ denitrification ได้แก่ *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *Achromobacter xylosoxidans* และ *A. denitrificans*
3. TSI ให้ผลเป็น neutral หรือ alkaline slant และ neutral butt (N/N หรือ K/N) ยกเว้น *Burkholderia pseudomallei* ให้ acid slant และ neutral butt (A/N) หลังอบนานกว่า 24 ชม.
4. ไม่ใช้ glucose โดยขบวนการ fermentation แต่ใช้ glucose โดยวิธี oxidation หรือไม่สามารถใช้ glucose ได้เลย (nonsaccharolytic) (ยกเว้น *Flavobacterium* บางสายพันธุ์สามารถ weakly ferment)
5. ไม่สร้าง Spore

ปกติเชื้อกลุ่ม NF พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ สิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล เช่น อ่างล้างมือ พื้นห้อง เครื่องมือต่างๆ และอาศัยบนเยื่อเมือกในคนและสัตว์โดยไม่ทำให้เกิดอันตราย เชื้อนี้ทำให้เกิดโรคในคนต่อเมื่อมีภูมิต้านทานต่ำ เช่น ในผู้ที่รับยาลดภูมิต้านทาน ผู้ป่วยมะเร็ง, เบาหวาน, น้ำร้อนลวก หรือโดยผ่านเครื่องมือแพทย์ที่ปนเปื้อน เช่น เครื่องมือผ่าตัด เครื่องช่วยหายใจ ฯลฯ จึงถือว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ดังนั้นเชื้อกลุ่มนี้จึงมักเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อในสถานพยาบาล (healthcare associated infections) ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มักดื้อสารต้านจุลชีพและเป็นปัญหาสาธารณสุข

เทคนิคการแยกและวินิจฉัยเชื้อ nonfermenter

1. **Nitrate reduction** กลุ่มเชื้อ NF ที่ใช้ nitrate (denitrification) และให้ก๊าซไนโตรเจนประกอบด้วย *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, *Ochrobactrum anthropi* และ *Rhizobium radiobacter*
2. **Pigmentation** กลุ่มเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีเหลืองอ่อน-เหลืองแก่ ประกอบด้วย *Chryseobacterium, Elizabethkingia*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *P. luteola*, *P. oryzihabitans*, *B. cepacia*, *S. maltophilia* และ *Brevundimonas vesicularis*

   กลุ่มเชื้อที่ให้ pigment สีชมพูเยิ้ม-ชมพูออกแดงปูนอิฐ เช่น *Roseomonas*, *Methylobacterium*
3. **Esculin hydrolysis** กลุ่มเชื้อที่ให้ผลบวกในการทดสอบ esculin ประกอบด้วย *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas luteola*, *Sphingomonas*, *Sphingobacterium*, *Rhizobium* และ *Ochrobactrum anthropi*
4. **การย้อมแกรม** *Paracoccus yeeii* มีลักษณะเป็น coccobacilli ค่อนข้างกลมและใหญ่เรียงตัวเป็นระเบียบ ลักษณะเด่นเป็น O - shape ใหญ่กลมเหมือนขนมโดนัท กลุ่ม *Moraxella* spp. เป็น coccobacilli หรือ diplococci และ *Neisseria* spp. เป็น rod ขนาดเล็ก
5. **การทดสอบการใช้น้ำตาล** เชื้อกลุ่ม NF ใช้อาหารทดสอบ OF medium ที่เป็น semisolid มีปริมาณ peptone 0.2% และ น้ำตาล 1.0% (เชื้อแบคทีเรียทั่วไปใช้อาหารเหลวที่มี peptone 1% และน้ำตาล 0.5%) เนื่องจากการใช้น้ำตาล โดยวิธี oxidation ของเชื้อ NF ให้ผลกรดน้อยกว่าการใช้น้ำตาลโดยวิธี fermentation ดังนั้นการใช้ peptone ต่ำสำหรับ NF ทำให้ด่างที่เกิดจากการใช้ peptone ของเชื้อมีปริมาณไม่มากพอที่จะกลบเกลื่อนความเป็นกรดที่เกิดจาก oxidation น้ำตาลของเชื้อ NF ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี indicator ให้เราสังเกตเห็นผลบวกจากการใช้น้ำตาลได้ สำหรับการใช้ semisolid media แทนอาหารเหลวเพื่อให้กรดที่เกิดขึ้นไม่เจือจางหายไปในอาหารเหลว ผลบวกที่ได้คือเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวเป็นเหลืองที่บริเวณผิว OF medium

14-0992(001-354)editnew130158.indd 165 1/14/58 BE 3:51 PM

6. **Motility** การทดสอบ motility ใน semisolid เป็นวิธีที่ไม่ดีสำหรับเชื้อ NF เนื่องจากเชื้อ NF ส่วนใหญ่ไม่ขึ้นในส่วนลึกของหลอดอาหาร semisolid แม้ว่าเชื้อบางชนิดอาจเจริญในส่วนใต้ผิวได้ แต่อาจสังเกตเห็นการเคลื่อนที่ไม่ชัดเจนเสมอไป ดังนั้นการดูการเคลื่อนไหวโดยวิธี wet mount หรือ hanging drop เป็นวิธีที่ดีที่สุด เมื่อพบว่าเชื้อมีการเคลื่อนที่ ให้ทำการย้อม flagella
7. **การย้อม flagella** เป็นวิธีที่ง่ายกว่าการย้อมแกรม และมีประโยชน์ในการแยกชนิดเชื้อกลุ่ม NF มาก เช่น *Pseudomonas* มี flagella ที่ขั้วเซลล์ (polar flagella) *Bordetella* และ *Alcaligenes* มี flagella ล้อมรอบเซลล์ (peritrichous flagella)
8. **การทดสอบ oxidase** ควรใช้น้ำยา 1% N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ซึ่งมีความไวน้อยกว่า (อ่านผลภายใน 30 วินาที) tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (อ่านผลภายใน 10 วินาที) เนื่องจากเมื่อใช้ 1% N-dimethyl-p-phenylenediamine เชื้อ *B. cepacia* และ *S. maltophilia* สายพันธุ์ที่ให้ผล oxidase ลบ อาจให้ผลบวกโดยใช้ tetramethyl-p-phenylenediamine ในการทดสอบควรใช้น้ำยาที่เตรียมใหม่ๆ หรือเก็บในขวดสีชาในตู้เย็น 4-10 ^{o}C ไม่เกิน 1 สัปดาห์ เชื้อที่ใช้ทดสอบควรเป็นเชื้อใหม่ที่อายุไม่เกิน 18-24 ชม. และไม่ควรเป็นเชื้อที่เพาะในอาหารที่มี carbohydrate เช่น TSI ควรทดสอบกับเชื้อที่เพาะใน TSA หรือ NA
9. **อุณหภูมิ** ที่เหมาะสมในการอบเพื่อทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ NF คือ 30-35 ^{o}C และอ่านผลหลังอบนาน 48 ชม.
10. **Indole production** เนื่องจากเชื้อ NF บาง species สร้าง indole ในปริมาณต่ำ การใช้ SIM ในการทดสอบบางครั้งอาจไม่ได้ผล จึงควรใช้อาหารทดสอบที่เตรียมจาก BHI ที่เติม tryptophan และควรสกัด indole ด้วย xylene และเขย่า ก่อนเติม Ehrlich's หรือ Kovac's reagent ควรระวังอย่าเติม xylene, Ehrlich's หรือ Kovac's reagent ปริมาณมากเกินไปเพราะจะทำให้ indole ที่เกิดขึ้นเจือจาง ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการเกิด indole ส่วนเชื้อ *Delftia acidovorans* ให้ผลสีส้มซึ่งเกิดจาก anthranilic acid ไม่ได้เกิดจากการสร้าง indole
11. **การทดสอบ lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase หรือ arginine dihydrolase** ควรใช้อาหารทดสอบสูตรของ Moeller (แทนสูตรของ Falkow) ใส่ในหลอดปริมาตร 1-2 ml และลงเชื้อปริมาณมาก ปิดทับด้วย liquid paraffin สูง 4 mm และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีหลอดอาหารทดสอบควบคุมที่ไม่ได้เติม lysine, ornithine หรือ arginine เพื่อช่วยในการแปลผล

14-0992(001-354)editnew130158.indd 166 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม NF 4 ชนิดเป็นเชื้อก่อโรค (Pathogen) ได้แก่

1. *Pseudomonas aeruginosa*
2. *Burkholderia pseudomallei*
3. *Burkholderia mallei*
4. *Elizabethkingia meningoseptica*

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม NF ที่เป็นเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) หรือโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบบ่อย ดังนี้

1. *Pseudomonas*
2. *Acinetobacter*
3. *Burkholderia*
4. *Stenotrophomonas*
5. *Flavobacterium*
6. *Achromobacter*
7. *Chryseobacterium*
8. *Brevundimonas*
9. *Comamonas*
10. *Ochrobactrum*
11. *Ralstonia*
12. *Shewanella*
13. *Rhizobium*
14. *Alcaligenes*
15. *Moraxella*
16. *Methylobacterium*
17. *Roseomonas*
18. *Sphingomonas*

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม NF ที่ ก่อโรค ได้แก่

1. *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นได้ทั้งเชื้อก่อโรค (pathogen) ที่ก่อโรคติดเชื้อในชุมชน และฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) สามารถเจริญได้บน BA และ MAC ที่ 30-35 ^{o}C นาน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 167 1/14/58 BE 3:51 PM

18-24 ชม. มักมี hemolysis มีกลิ่นคล้ายองุ่น โคโลนีมักจะแบนและแผ่ ขอบอาจจะหยัก (serrated) และมีหลายลักษณะ เช่นหยาบ (rough), เรียบ (smooth), เยิ้ม (mucoid) บางสายพันธุ์มีขนาดเล็กฝอย เชื้อนี้สามารถเคลื่อนที่โดยใช้ flagella 1 เส้นที่ขั้วเซลล์ (monotrichous flagellum) สามารถสร้าง pigment ได้ เช่น

- pyocyanin (สีน้ำเงิน) pigment นี้สร้างได้เมื่อเพาะเชื้อใน King A medium หรือ *Pseudomonas* agar P
- pyoverdin หรือ fluorescein (สีเหลืองแกมเขียวหรือเหลืองแกมน้ำตาลเรืองแสงภายใต้แสงยูวีคลื่นสั้น) pigment นี้สร้างได้ดีเมื่อเพาะเชื้อใน King B medium หรือ *Pseudomonas* agar F
- pyocyanin ผสมกับ pyoverdin จะเห็นโคโลนีเป็นสีเขียวสว่าง
- pyomelanin (สีน้ำตาลดำ) pigment นี้สร้างได้ดีเมื่อเพาะเชื้อใน King B medium หรือ *Pseudomonas* agar F
- pyorubrin (สีแดง)

เชื้อนี้บางสายพันธุ์ไม่มีสี (non-pigment) สายพันธุ์เยิ้ม (mucoid) ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ อาจจะมีลักษณะทางสรีรวิทยาเปลี่ยน ได้แก่ เจริญช้า ไม่เคลื่อนที่ ไม่มี pigment ไม่สามารถเคลื่อนที่ฝังตัวบนผิว agar และเมื่อละลายในอาหารเหลวจะเกิด autoaggregate

2. *Burkholderia pseudomallei* (ชื่อเดิม *Pseudomonas pseudomallei*)

พบในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ เช่น ดินชื้น บ่อน้ำ เข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจ รับประทานหรือเข้าบาดแผลบริเวณผิวหนัง ก่อโรค melioidosis หรือเรียกว่าโรค Vietnamese time bomb ในผู้ป่วยพบได้ในเลือด เสมหะ หนอง ปัสสาวะ เชื้อนี้เจริญได้บน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 18-24 ชม. ลักษณะโคโลนีมีสีเทา ใส ขอบเรียบและมันวาว เมื่ออายุเกิน 48 ชม. จะมีลักษณะขาวขุ่นและย่น (wrinkle colony) กลิ่นคล้ายดินหลังฝนตก (musty odor) เมื่อย้อมแกรมจะติดสีเข้มที่ปลายทั้ง 2 ข้าง (bipolar staining) ตรงกลางติดสีจาง คล้ายเข็มกลัดซ่อนปลาย (closed safety pin) TSI ให้ A/K ให้ก๊าซไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ทดสอบ nitrate reduction เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase, motility, arginine dihydrolase, เชื้อสามารถ oxidize น้ำตาล glucose และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 ^{o}C

3. *Burkholderia mallei*

เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค glander ในม้าแต่สามารถติดต่อสู่คน ลักษณะโคโลนีบน BA มีขนาดเล็กและบางสายพันธุ์ไม่เจริญบน BA ขึ้นได้ดีบน BHI agar ที่เติม glycerol โคโลนีสีขาวเทา translucent หลังจากอบนานกว่า 48 ชม. โคโลนีมีสีเหลืองขุ่น ไม่เคลื่อนที่เนื่องจากไม่มี flagella ย้อมติดสีแกรมลบ coccobacilli

14-0992(001-354)editnew130158.indd 168 1/14/58 BE 3:51 PM

บางครั้งเป็นเส้นยาว (filament) และมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) เชื้อให้ผล oxidase บวก และสามารถ oxidize glucose ได้

4. *Elizabethkingia meningoseptica*

(ชื่อเดิม *Chryseobacterium meningosepticum*, *Flavobacterium meningosepticum*)

เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบหรือ septicemia ในเด็กแรกเกิดหรือเด็กคลอดก่อนกำหนด (neonatal meningitidis) และในผู้ใหญ่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เจริญได้ทั้งบน BA และ MAC อบที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. เชื้ออายุ 24 ชม. มีโคโลนีขนาด 1-2 mm อายุ 48 ชม. มีโคโลนีขนาด 2-3 mm ลักษณะกลม เรียบ สีเหลืองอ่อน ย้อมติดสีแกรมลบ coccobacilli , TSI ให้ผล K/N หรือ K/K ให้ผลบวกในการทดสอบ esculin, gelatin, oxidase, indole และ DNase ให้ผลลบในการทดสอบ motility, starch hydrolysis และ flexirubin เชื้อสามารถ oxidize น้ำตาล glucose, mannitol และ fructoseได้

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม NF ที่เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) และโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections หรือ healthcare associated infections)

1. *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas putida*

มักพบเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ส่วนใหญ่ให้สี pyoverdin และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42 ^{o}C ได้ เชื้อทั้งสองชนิดสามารถแยกจากกันได้โดยใช้การทดสอบ gelatin โดย *Pseudomonas fluorescens* ให้ผลบวก แต่ *Pseudomonas putida* ให้ผลลบ

2. *Pseudomonas stutzeri*

เป็นเชื้อฉวยโอกาส สามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล พบได้ทั้งใน clinical specimens และสิ่งแวดล้อม เชื้อนี้เจริญได้ทั้งบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ลักษณะโคโลนี สีเทาปนเหลือง ผิวหยาบ ย่น และให้ก๊าซไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ทดสอบ nitrate reduction คล้าย *B. pseudomallei* เชื้อ *P. stutzeri* ไม่ oxidize lactose ทำให้โคโลนีที่ขึ้นบน MAC ไม่เป็นสีชมพูอ่อน ส่วน *B. pseudomallei* สามารถ oxidize lactose และให้โคโลนีสีชมพูบน MAC

3. *Burkholderia cepacia* complex

เชื้อกลุ่มนี้มี 17 species จากเชื้อที่โรงพยาบาลส่งทดสอบยืนยันที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า species ที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยคือ *B. cenocepacia* การที่จะแยกชนิดว่าเป็น species ใดไม่สามารถใช้วิธีแยก

14-0992(001-354)editnew130158.indd 169 1/14/58 BE 3:51 PM

ทางชีวเคมีได้ ต้องใช้วิธีทางอณูชีวโมเลกุล เชื้อกลุ่มนี้พบในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำยาฆ่าเชื้อในโรงพยาบาล มักเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล สามารถเจริญได้ทั้งบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ย้อมติดสีแกรมลบรูปแท่ง ลักษณะโคโลนีกลม สีเทาปนเหลืองอ่อน บางสายพันธุ์มีสีเหลืองบน TSI, oxidase บวกช้า (20-30 วินาที) หรือลบ ให้ผลบวกในการทดสอบ motility, glucose, lysine decarboxylase และ ornithine decarboxylase ให้ผลลบในการทดสอบ arginine dihydrolase และไม่ให้ก๊าซไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ทดสอบ nitrate reduction

4. *Stenotrophomonas maltophilia* (ชื่อเดิม *Xanthomonas maltophilia*)

เชื้อนี้เดิมจัดอยู่ใน genus *Pseudomonas* ต่อมา พ.ศ. 2526 ถูกจัดอยู่ใน genus *Xanthomonas* และล่าสุด พ.ศ. 2536 จัดอยู่ใน genus ใหม่คือ *Stenotrophomonas* ปัจจุบันเชื้อใน genus นี้มี 2 species คือ *S. maltophilia* และ *S. africana* เชื้อนี้สามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เจริญบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ลักษณะโคโลนีกลม เทาปนเหลืองอ่อน หรือไม่มีสี บางสายพันธุ์มีสีเหลืองบน TSI, oxidase บวกช้า (20-30 วินาที) เคลื่อนที่โดยมี flagella หลายเส้นที่ขั้วเซลล์ (multitrichous flagella) สามารถ oxidize glucose ได้ และให้ผลบวกในการทดสอบ lysine decarboxylase, gelatinase, esculin และ DNase

5. *Acinetobacter* spp.

เชื้อใน genus *Acinetobater* พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ พืช อาหาร ผิวหนังคนและสัตว์ ในบรรดาเชื้อกลุ่ม NF ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยในโรงพยาบาลพบ genus นี้มากเป็นอันดับสองรองจาก *P. aeruginosa* เชื้อกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบในคนมี 26 species จากเชื้อที่ รพ. ส่งทดสอบยืนยันที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า species ที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยคือ *Acinetobacter baumannii* และ *A. pittii* (*Acinetobacter* DNA group 3) การที่จะแยกชนิดให้แน่นอนว่าเป็น species ใดไม่สามารถใช้วิธีแยกทางชีวเคมีได้ ต้องใช้วิธีทางอณูชีวโมเลกุล อย่างไรก็ตามในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลสามารถแยกชนิดเบื้องต้นและออกผลได้ดังแสดงในตารางที่ 5.6-11 เชื้อทั้งสองนี้ (พร้อมทั้งเชื้ออีก 3 ชนิดได้แก่ *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* DNA group TU13 และ *A. nosocomialis* ซึ่งมีผลทางชีวเคมีคล้ายกันจึงแนะนำให้ออกผลเป็น *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex มักทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและเป็นเชื้อดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multiple drug resistant: MDR) สามารถเจริญได้ทั้งบน BA และ MAC อบที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C โคโลนีมีลักษณะกลมสีเทาบน MAC โคโลนีใส (translucent) ย้อมติดสีแกรมลบมีรูปร่างค่อนข้างกลม (coccobacilli) ให้ผล oxidase ลบ และไม่เคลื่อนที่

14-0992(001-354)editnew130158.indd 170 1/14/58 BE 3:51 PM

6. *Achromobacter xylosoxidans* (ชื่อเดิม *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*)

เป็นเชื้อฉวยโอกาส สามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล พบใน clinical specimens โดยเฉพาะในเลือด เจริญได้ทั้งบน BA และ MAC ที่ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ให้ลักษณะโคโลนีกลมเทาบางครั้งอาจเยิ้ม (mucoid) oxidase บวก เคลื่อนที่โดยใช้ flagella รอบเซลล์ (peritrichous flagella), oxidize glucose, xylose โดยเฉพาะ xylose ให้ผลบวกเร็ว ให้ก๊าซไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ทดสอบ nitrate reduction เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 ^{o}C

7. *Chryseobacterium indologenes*

เป็นเชื้อฉวยโอกาสและก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เจริญได้บน BA อบที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. หลังอบนาน 24 ชม. โคโลนีมีขนาด 1-2 mm และเมื่ออบนาน 48 ชม. มีขนาด 2-3 mm โคโลนีลักษณะกลม เรียบ สีเหลืองอ่อน-แก่ ย้อมติดสีแกรมลบ coccobacilli TSI ให้ผล K/N หรือ K/K เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ esculin, gelatin, oxidase, indole, glucose, fructose, starch, flexirubin และให้ผลลบในการทดสอบ motility, mannitol, DNase

8. *Alcaligenes* spp.

พบได้ในสิ่งแวดล้อม อาจพบอาศัยแบบ colonization ในระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหารของผู้ป่วยในโรงพยาบาล เป็นเชื้อฉวยโอกาสและก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล พบในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ เจริญได้ทั้งบน BA และ MAC ที่ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. โคโลนีสีเทา บางสายพันธุ์สามารถเปลี่ยนสี BA เป็นสีเขียว และโคโลนีแผ่ย้อมติดสีแกรมลบ coccobacilli, oxidase บวก เคลื่อนที่โดยใช้ flagella รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ให้ผลลบในการทดสอบ glucose, lysine, ornithine decarboxylase, arginine, dihydrolase, gelatin, DNase, indole และ esculin

9. *Sphingomonas* spp.

เดิมอยู่ใน genus *Pseudomonas* พบอาศัยอยู่ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและในโรงพยาบาล เป็นเชื้อฉวยโอกาสและสามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลได้ เชื้อ *Sphingomonas* spp. ที่สำคัญทางคลินิกและพบบ่อยที่สุดมี 2 species คือ *S. paucimobilis* และ *S. parapaucimobilis* เจริญได้บน BA ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. โคโลนีกลมเรียบเทาปนเหลือง เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase, motility, glucose, lactose, maltose, xylose และ fructose และให้ผลลบในการทดสอบ mannitol

14-0992(001-354)editnew130158.indd 171 1/14/58 BE 3:51 PM

10. *Brevundimonas* spp.

เดิมอยู่ใน genus *Pseudomonas* เชื้อ *Brevundimonas* spp. ที่สำคัญทางคลินิกและพบบ่อยมี 2 species คือ *B. diminuta* และ *B. vesicularis* การก่อโรคของทั้ง 2 species พบในคนได้ไม่บ่อย แต่มีรายงานก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ในกระแสเลือดโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง

11. *Ochrobactrum* spp.

Species ที่พบก่อโรคในคนได้คือ *Ochrobactrum anthropi* (ชื่อเดิม *Achromobacter* sp. Vd-1, Vd-2) ก่อโรคได้ในหลายระบบ เช่น การติดเชื้อของบาดแผล ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และในกระแสเลือด การติดเชื้อในโรงพยาบาลมักสัมพันธ์กับการใส่สายสวน เช่น สายให้สารน้ำทางเส้นเลือด ส่วน species อื่นที่พบก่อโรคได้คือ *Ochrobactrum intermedium* โดยก่อให้เกิดการติดเชื้อในเลือด เจริญบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ลักษณะโคโลนีกลมเทา เยิ้ม เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase, motility, glucose, mannitol, xylose, nitrate, urea และ esculin ให้ผลลบในการทดสอบ lactose

12. *Rhizobium radiobacter* (ชื่อเดิม *Agrobacterium tumefaciens*)

เป็นเชื้อฉวยโอกาสและก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลพบใน clinical specimens และสิ่งแวดล้อมทั่วไป เจริญบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ลักษณะโคโลนีกลมเหลือง เยิ้ม เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase, motility, glucose, mannitol, xylose, nitrate, urease, esculin และ lactose

13. *Methylobacterium mesophilicum* (ชื่อเดิม *Pseudomonas mesophilicum*)

เป็นเชื้อฉวยโอกาสและก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลพบใน clinical specimens และสิ่งแวดล้อม สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาล ไม่เจริญบน MAC แต่เจริญบน BA ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 2-3 วัน และเจริญได้ดีบน SDA ลักษณะโคโลนีชมพูออกแดงปูนอิฐแห้ง มีเมือกเล็กน้อย ติดสีแกรมลบ bacilli ขนาดใหญ่ เซลล์ติดสีแกรมได้ไม่ดีและมี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ภายในเซลล์ เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ motility, glucose, xylose และ urease ให้ผลลบในการทดสอบ oxidase, fructose, mannitol, esculin และ nitrate

14. *Roseomonas* spp.

เป็นเชื้อฉวยโอกาส สามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลพบใน clinical specimens และสิ่งแวดล้อม สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาลเจริญบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 ^{o}C นาน 2-3 วัน เชื้อนี้เจริญได้ดีบน SDA ลักษณะโคโลนี สีชมพูเยิ้ม ติดสีแกรมลบ, nonvacuolated, coccoid, plump rods เซลล์

14-0992(001-354)editnew130158.indd 172 1/14/58 BE 3:51 PM

ค่อนข้างกลมเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase, motility, fructose, xylose และ urease เจริญที่อุณหภูมิ 42 °C ให้ผลลบในการทดสอบ glucose, mannitol, esculin และ nitrate

15. *Shewanella* spp.

เดิมจัดอยู่ใน genus *Pseudomonas* เป็นเชื้อฉวยโอกาส สามารถก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลร่วมกับเชื้ออื่นๆ พบใน clinical specimens และพบอาศัยอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมหรือตามแหล่งน้ำ เจริญบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 °C นาน 24-48 ชม. genus *Shewanella* มี 2 species คือ *S. algae* และ *S. putrefaciens* ที่พบในคนมากคือ *S. algae* เชื้อทั้งสองนี้ให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase, motility, nitrate, gelatinase, DNase และสร้าง H_2S เจริญได้ที่ 42 °C ให้ผลลบในการทดสอบ lactose, xylose, mannitol และ esculin

S. algae และ *S. putrefaciens* ต่างกันที่ *S. algae* ขึ้นที่ 6.5% NaCl ส่วน *S. putrefaciens* ไม่ขึ้น

16. *Ralstonia* spp.

เชื้อ *Ralstonia* ที่ก่อโรคมี 3 species คือ *R. pickettii*, *R. mannitolilytica* และ *R.insidiosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลพบได้ใน clinical specimens ก่อโรคในคนได้น้อย อาจ colonize ได้ชั่วคราวในระบบทางเดินหายใจส่วนบน โดยไม่ก่อให้เกิดโรค เจริญบน BA และ MAC ที่อุณหภูมิ 30-35 °C นาน 24-48 ชม. โคโลนีสีเทาถึงเหลือง อาจย่นเล็กน้อย เชื้อให้ผลบวกในการทดสอบ catalase, oxidase, urease, lactose และ motility เจริญได้ที่ 42 °C ให้ผลลบในการทดสอบ lysine

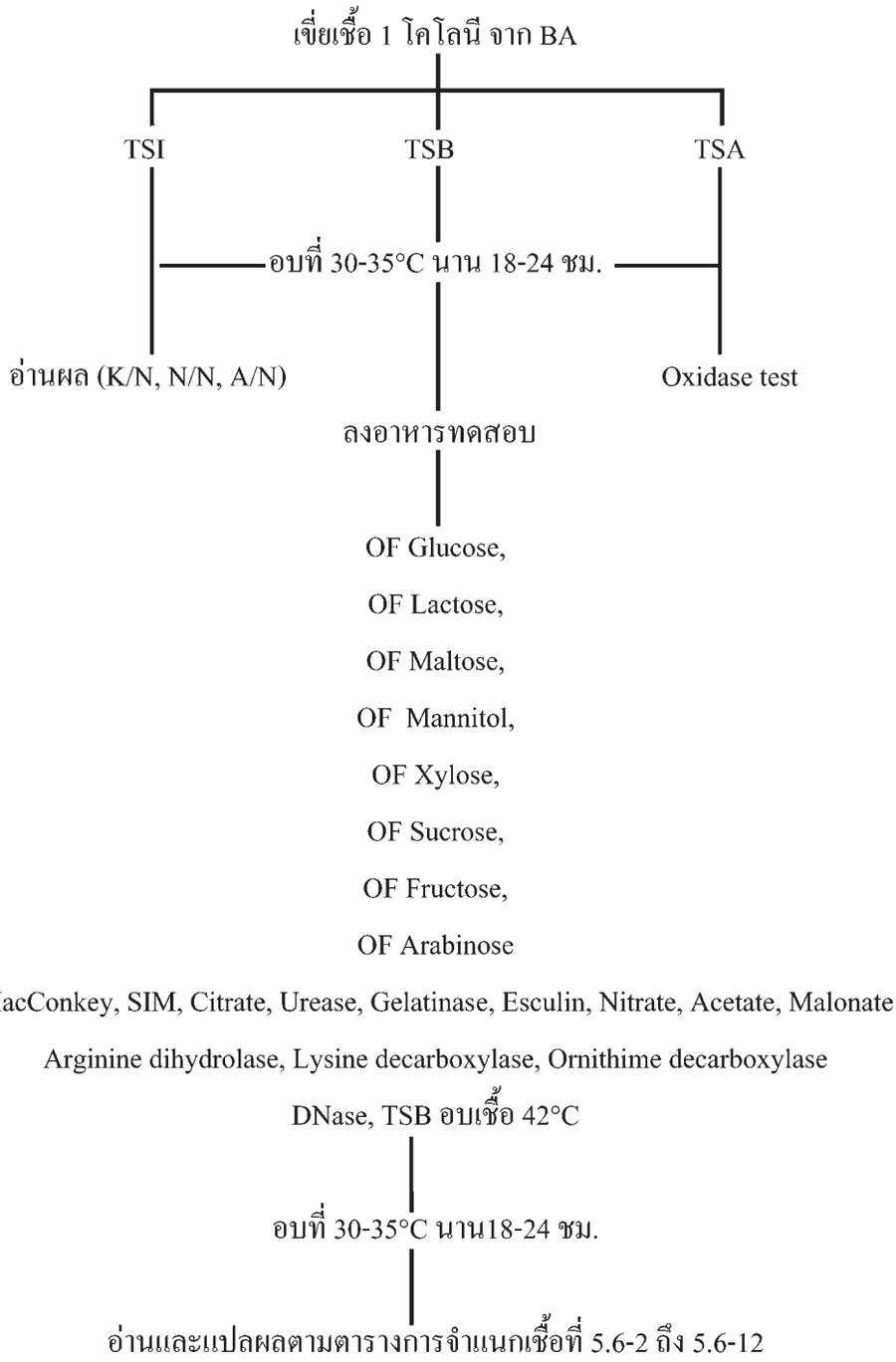
17. *Moraxella* spp. และเชื้อที่ใกล้เคียงกับ *Moraxella*

เชื้อใน genus *Moraxella* อาศัยอยู่บนผิวหนังและเยื่อเมือกของคนและสัตว์ ไม่ค่อยพบในสิ่งแวดล้อม ยกเว้น *Psychrobacter phenylpyruvicus* (ชื่อเดิม *Moraxella phenylpyruvica*) พบในเนยแข็งและน้ำ เจริญบน BA ที่อุณหภูมิ 30-35 °C นาน 24-48 ชม. โคโลนีขนาดเล็ก สีเทา เซลล์รูปร่าง coccobacilli ติดสีแกรมลบ อาจอยู่เป็นคู่หรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เชื้อบาง species บางครั้ง decolorize ยาก ทำให้ย้อมติดเป็นสีแกรมบวก oxidase บวก ไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่ไม่ใช้น้ำตาล glucose (nonoxidizer)

เชื้อ *Moraxella* และเชื้อที่ใกล้เคียงกับ *Moraxella* ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ *M. osloensis*, *M. catarrhalis*, *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. atlantae*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Paracoccus yeei*, *Neisseria weaveni*, *N. elongata*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 173 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.6-1 ขั้นตอนการวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม nonfermentative gram-negative bacilli เบื้องต้น เพาะเชื้อจาก Specimen ลงบน BA และ MAC อบที่ 30-35 °C นาน 18-48 ชม.



14-0992(001-354)editnew060158.indd 174 1/14/58 BE 10:41 AM

ตารางที่ 5.6-1 จำแนกชนิดเชื้อตามผล oxidase, motility และ OF (glucose)

ตาราง	Oxidase	Motility	OF (Glucose)	หมายเหตุ
5.6-2	+	+	+	peritrichous flagella
5.6-3	+	+	+	polar flagella
5.6-4	+	+	-	peritrichous flagella
5.6-5	+	+	-	polar flagella
5.6-6	+	-	+	indole +
5.6-7	+	-	+	indole -
5.6-8	+	-	-	indole +
5.6-9	+	-	-	indole -
5.6-10	-	+	+	
5.6-11	-	-	+/-	*Acinetobacter*
5.6-12	+/-	+	+/-	pink pigmented nonfermenter

ตารางที่ 5.6-2 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose บวก, peritrichous flagella

Peritrichous flagella	Flagella	Esculin	Urease	Susceptible to Colistin	Mannitol	Xylose
Achromobacter xylosoxidans (135)	Pt, L	0	0	ND	0	100
Ochrobactrum anthropi (39)/ *Ochrobactrum intermedium* (3)	Pt, L	12	98	100/0*	55	100
Pannonibacter phragmitetus (7)	Pt, L	86	100	0	28	100
Rhizobium radiobacter (19)	Pt, L	100	95	68	100	100

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested. Values are percentages of positive.

Pt = Peritrichous flagella, L = Lateral flagella, ND = not determined.

**Ochrobactrum anthropi* strains are colistin susceptible, whereas *O. intermedium* strains are colistin resistant.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 175 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-3 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose บวก, polar flagella

Polar flagella	No. of flagella	42 °C	Pyoverdin	N_2 gas	Arginine	Lactose	Maltose	Mannitol	Gelatin	Urease	Note
Acidovorax delafieldii (2)	1-2	50	0	0	100	0	0	50	0	100	citrate +
A. facilis (2)	1-2	0	0	0	0	0	0	100	100	100	citrate -
A. temperans (2)	1-2	1	0	100	0	0	0	50	0	50	citrate -
Balneatrix alpica (2)	1-2	0	0	ND	ND	ND	100	100	0	0	indole +, nitrate +
Brevundimonas diminuta (68) (Glucose +21%)	1-2	38	0	0	0	0	5	0	68	13	esculin +5%
Brevundimonas vesicularis (94) (Glucose +87%)	1-2	19	0	0	0	0	88	0	25	2	esculin +88%
Burkholderia pseudomallei (7)	>=2	100	0	100	100	100	100	100	100	43	TSI A/N arabinose -
Burkholderia thailandensis	>=2	+	-	+	+	+	+	+	v	v	arabinose +
Burkholderia cepacia complex (211)	>1	60	0	0	0	99	98	100	74	45	
Burkholderia gladioli (27)	>1	-	-	-	ND	-	-	ND	V	ND	oxidase V
Inquilinus limosus (3) (Motility 33%)	1-2	+	-	-	-	ND	ND	100	0	(33)	nonpigment, very mucoid, esculin +
Pandoraea spp. (9)	>1	V	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	oxidase V
Pseudomonas aeruginosa (201)	1	100	65	93	100	<1	<1	70	82	48(9)	
P. fluorescens (155)	>1	0	96	3	97	24	2	53	100	21(31)	
Pseudomonas like group 2	>1	ND	0	<10	ND	ND	<10	>90	<10	>90	PAD (+)
P. mendocina (4)	1	100	0	100	100	0	0	0	0	50	
P. monteilii (10)	ND	0	100	0	100	0	0	0	0	50	
P. mosseilii (12)	1	0	100	0	100	0	17	75	92	ND	
P. pertucinogena (2)	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<10	PAD (+)
P. putida (16)	>1	0	93	0	100	25(13)	31	25	0	31(44)	
P. stutzeri (28)	1	69	0	100	0	0	100	89(4)	0	33(22)	wrinkle colony
P. veronii (8)	1	0	100	100	100	ND	ND	ND	13	25	
P. stutzeri–like (CDC group Vb-3)	1	ND	0	>90	>90	<10	>90	ND	ND	ND	
Ralstonia pickettii	1	V	-	ND	ND	V	V	-	ND	+	xylose +
Ralstonia mannitolilytica	1	+	-	ND	ND	+	+	+	ND	+	xylose +
Stenotrophomonas maltophilia (Glucose +85%) (228)	>2	48	0	0	0	60	100	0	93	3	esculin +39%
Sphingomonas paucimobilis (184)	1	0	0	0	0	100	100	0	0	0	yellow, esculin +, DNase +, citrate -
Sphingomonas parapaucimobilis	1	-	-	ND	ND	V	V	-	-	ND	esculin +, DNase -, citrate +
Shewanella putrefaciens biotype 1 (13)	1	0	0	0	0	15	100	100	100	0	H_2S +
Shewanella putrefaciens biotype 2 (60)	1	92	92	0	0	0	0	0	100	8	H_2S +
Shewanella putrefaciens biotype 3 (15)	1	0	0	0	0	0	0	0	73	0	H_2S +
WO-1	>1	ND	ND	V	(-)	(-)	ND	(-)	(+)	V	

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested.

Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity.

+, positive for 90 to 100% of strains; -, positive for 0 to 10% of strains; V = positive for 11 to 89% of strains; ND = not determined.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 176 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-4 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose ลบ, peritrichous flagella

Peritrichous flagella	Urease	Nitrate	N_2 gas	Acetate	Note
Alcaligenes faecalis (152)	0	0	0	100	1-day BA: 0.5-3 mm, smooth sometime rough; 2-day BA: α-haemolysis; fruity odor
Bordetella hinzii I (7)	0	0	0	ND	2-day BA: colonies flat, spreading
Achromobacter denitrificans (52)	31	98	98	87	
Achromobacter piechaudii (7)	0	100	0	0	1-day BA: 0.1-0.5 mm; 2-day BA: 1.5 mm
Bordetella bronchiseptica (24)	100 (rapid)	100	0	100	1-day BA: 0.5 mm; 2-day BA: 1-2.5 mm
Cupriavidus pauculus (31)	100 (rapid)	0	0	97	
Cupriavidus respiraculi	-	V	ND	ND	
Cupriavidus gilardii	-	-	-	ND	
Oligella ureolytica (19)	100 (rapid)	100	58	79	1-day BA: < 0.1mm 2-day BA: 0.3-1 mm
Ralstonia insidiosa	V	+	ND	ND	

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested

Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity

+, positive for 90 to 100% of strains; -, positive for 0 to 10% of strains; V = positive for 11 to 89% of strains; ND = not determined.

บทที่ 5

ตารางที่ 5.6-5 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility บวก, OF glucose ลบ, polar flagella

Polar flagella	No. of flagella	Fructose	Nitrate	Esculin	Acetate	Xylose	Maltose	Mannitol	H_2S
Brevundimonas diminuta (68) (21% glucose +)	1-2	0	3	5	0	0	0	0	0
Brevundimonas vesicularis (94) (98% oxidase+, 87% glucose +)	1-2	0	5	88	0	27	94	0	0
Comamonas testosteroni (27)	>1	0	93	ND	100	0	0	0	0
Comamonas terrigena (11)	>1	0	100	ND	0	0	0	0	0
Cupriavidus gilardii	1	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	0
Delftia acidovorans (69)	>2	100	99	0	100	0	0	100	0
Pseudomonas alcaligenes (26)	1	0	54	0	92	0	0	0	0
Pseudomonas pertucinogena (2) (some strains glucose +weak)	1	ND	<10	ND	ND	ND	ND	ND	0
Pseudomonas pseudoalcaligenes (34) (9% glucose+)	1	79(21)	100	0	99	18(12)	ND	0	0
Ralstonia insidiosa	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	0
Shewanella algae (6)	1	ND	89	0	ND	0	ND	0	100
Shewanella putrefaciens (2)	1	ND	0	0	ND	0	ND	0	100
Stenotrophomonas maltophilia (228)	>2	ND	39	39	ND	ND	100	0	0

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested

Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity. ND = not determined.

+, positive for 90 to 100% of strains; -, positive for 0 to 10% of strains; V = positive for 11 to 89% of strains;

Ralstonia spp. and *Cupriavidus* spp. may grow slowly on primary isolation media, requiring >= 72 h of incubation before colonies are visible. Species level identification in these genus with standard biochemical testing is difficult.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 177 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-6 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose บวก, indole บวก

Species	Beta-hemolysis (after 3 days on SBA)	Production of flexirubin pigment	Production of other pigment*	Growth on MAC	Growth at 42 °C	Mannitol	Xylose	L-Arabinose	Maltose	Sucrose	Esculin hydrolysis	Gelatinase	Urease	Nitrate
Balneatrix alpica (1)	0	0	PY	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100
Chryseobacterium anthropi (9)	0	0	-/PS	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
Chryseobacterium gleum (11)	0	100	-	100	100	0	27	100	100	0	100	100	73	73
Chryseobacterium hominis (12)	0	0	-/PY	0	0	0	0	0	100	33	100	100	0	75
Chryseobacterium indologenes (14)	100	72	-	66	0	0	0	0	100	21	100	100	0	28
Elizabethkingia meningoseptica (16)	0	0	-/PY/ PS	88	50	100	0	0	100	0	100	100	0*	0
Empedobacter brevis (7)	0	0	PY	100	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
Flavobacterium mizutaii (4)	0	0	PY	0	0	0	100	75	100	100	100	0	0	0
Wautersiella falsenii (45)	0	0	-/PY	100	0	0	0	0	100	0	55	55/ (45)	100	0

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested.
Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity. PY, pale yellow; PS, pale salmon-pink.
**Elizabethkingia miricola* is urease positive

ตารางที่ 5.6-7 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose บวก, indole ลบ

Species	Growth on MAC	Mannitol	Nitrate	Esculin	Xylose	Urease	Note
Alishewanella fetalis (1)	100	0	100	0	0	100	
Burkholderia mallei (8)	+	-	+	-	V	V	
EO-3 (5)	100	100	0	0	100	+	
Haematobacter missouriensis (4)	100	(50)	0	ND	100	100	arginine 100%
Inquilinus limosus (3)	(100)	100	0	100	100	(33)	motility 33%
Paracoccus yeeii (93)	74	45w	85	0	100	100	arginine 0%
Psychrobacter faecalis (10)	100	0	100	ND	100	0	arginine 0%
Psychrobacter immobilis (13)	92	0	77	0	85	+	arginine 0%
Sphingobacterium multivorum (22)	100	0	0	100	100	100	
Sphingobacterium spiritivorum (11)	55	100	0	100	100	100	
Sphingobacterium thalpophilum (7)	100	0	100	100	100	(100)	
Sphingomonas spp. (15)	0	0	7	100	87	0	glucose 87(13)%, motility 66%

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested; w=weak
Values are positive percentages; those in parentheses represent delayed positivity; ND = not determined+, >=90% positive; -,<10% positive; v, 10% to 90% positive; ND, not determined.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 178 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-8 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose ลบ, indole บวก

Species	Maltose	Urease	Gelatin	Growth on MAC	Note
Bergeyella zoohelcum (6)	0	100 (rapid)	100	0	colony: sticky, tan and yellow
Weeksella virosa (87)	0	0	100	0	1-day BA plate colonies: 0.2-0.8 mm in diameter; mucoid and adherent to the agar 2-3 days BA plate colonies: 2-3 mm in diameter; colonies become yellowish, tan to brown

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested.
Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity

ตารางที่ 5.6-9 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก, motility ลบ, OF glucose ลบ, indole ลบ

Species	Growth on MAC	Arginine	Urease	Gelatinase	Nitrate reductase	Acetate	Note
Haematobacter massiliensis (5)	80	100	100	0	0	100	mannitol 0%
Haematobacter genomospecies1 (1)	100	100	100	0	0	100	mannitol (100)%
Moraxella atlantae (5)	100	0	0	0	0	0	
Moraxella canis (5)	60	0	0	0	80	100	
Moraxella catarrhalis (7)	0	0	0	0	100	0	DNase +
Moraxella lacunata (4)	0	0	0	100	100	75	poor growth on OF medium
Moraxella lincolnii (2)	0	0	0	0	0	0	
Moraxella nonliquefaciens (15)	0	0	0	0	100	0	
Moraxella osloensis (21)	50	0	0	0	24	100	
Myroides odoratimimus (20)	100	ND	100	100	0	ND	produce flexirubin pigment
Myroides odoratus (4)	75	ND	100	100	0	ND	produce flexirubin pigment
Oligella ureolytica (3)	0	0	100	0	100	100	motility +67% (peritrichoust)
Oligella urethralis (6)	50	0	0	0	0	100	
Psychrobacter phenylpyruvicus (7)	100	0	100	0	28	71	
Psychrobacter pulmonis (5)	(25)	0	0	0	100	100	

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested.
Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity
ND, not determined

14-0992(001-354)editnew130158.indd 179 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-10 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase ลบ, motility บวก, OF glucose บวก

Species	Oxidase	Glucose	No. polar flagella	Pyoverdin	Esculin	Maltose	Lactose	Mannitol	Gelatin	42 °C	Lysine
Burkholderia cepacia complex* (211)	V	+	>1	0	67	98	99	100	74	V	V
Burkholderia gladioli (3)	V	+	1	0	0	0	0	100	100	-	-
Brevundimonas vesicularis (94)	98	87	1-2	0	88	94	0	0	25	19	0
Pseudomonas aeruginosa (201)	99	97	1	65	0	<1	<1	70	82	100	0
Pseudomonas fluorescens (155)	97	100	>1	93	0	2	24	53	100	0	0
Pseudomonas luteola (34)	0	100	>1	0	100	100	3(24)	76(18)	61	94	0
Pseudomonas oryzihabitans (36)	0	100	1	0	0	97	14(22)	100	17	33	7
Stenotrophomonas maltophilia (228)	20	85	>2	0	39	100	60	0	93	48	93

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested.
Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity
+ positive for 90 to 100% of strains; - positive for 0 to 10% of strains; V, positive for 11 to 89% of strains.
*Most *Burkholderia cepacia* complex are slow, weak-positive oxidase test, some species are oxidase negative and most clinical isolate strains are nonpigmented, but on iron-containing media ie. TSI, many strains produce a bright yellow pigment.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 180 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-11 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase ลบ, motility ลบ , OF glucose บวก/ลบ

Species	Acidification of D-Glucose	Gelatinase	Hemolysis of sheep blood	Growth at 37 °C	Growth at 41 °C	Growth at 44 °C	Simmons Citrate	Malonate
Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex (70) (DNA group 1,2, 3, TU13)	+	-	-	+	V1	V2	+	V
Acinetobacter haemolyticus (21) (DNA group 4)	V	+	+	+	V	-	V	-
Acinetobacter radioresistens (22) (DNA group 12)	-	-	-	+	V	-	-	+
Acinetobacter lwoffii (26) (DNA group 8, 9, TU15)	V	-	-	V	-	-	V	-
Acinetobacter junii (21) (DNA group 5)	-	-	V	+	V	-	V	-
Acinetobacter schindleri (22)	-	-	-	+	+	-	V	-
Acinetobacter parvus (14)	-	-	-	+	-	-	-	-
Acinetobacter ursingii (29)	-	-	-	+	-	-	+	-
Acinetobacter johnsonii (20) (DNA group 7)	-	-	-	-	-	-	+	V
Acinetobacter beijerinckii (15)	-	V	+	+	-	-	+	+
Acinetobacter bereziniae (16) (DNA group 10)	V[3]	-	-	+	-	-	+	-
Acinetobacter guillouiae (17) (DNA group 11)	-	-	-	-	-	-	+	V
Acinetobacter gyllenbergii (9)	-	+	+	+	-	-	+	V

Numbers between parentheses are the numbers of strains tested. + positive for 90 to 100% of strains; - positive for 0 to 10% of strains; V, positive for 11 to 89% of strains.
[1] Typically negative only for *A. calcoaceticus* strains
[2] Typically positive only for *A. baumannii* and most strains of genomic species 13TU.
[3] Positivity, 88%.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 181 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-12 การจำแนกเชื้อกลุ่ม oxidase บวก/ลบ, motility บวก, OF glucose บวก/ลบ, pink pigmented nonfermenter

Species	Oxidase	No. of flagella	Growth on MAC	Glucose	Fructose	Mannitol	Xylose	Arabinose	Urease	Nitrate	Esculin
Asaia spp. (2)	0	P1-2/ L	ND	100	100	100	10	100	0	0	0
Azospirillum spp. (3)	100	P1-2	ND	0	(100)	0	100	100	100	100	100
Methylobacterium spp.* (4)	0	P1	-	(25)	0	0	100	100	100	0	0
*Roseomonas cervicalis*** (2)	100	P1-2	+	0	50	0	(100)	100	100	0	0
Roseomonas gilardii subsp. *gilardii*** *Roseomonas gilardii* subsp. *rosea*** (5)	100[w]	P1-2	+	(20)	60/(40)	(80)	0	100	100	0	0
*Roseomonas mucosa*** (8)	0	P1-2	+	100	100	100	0	100	100	0	0
Roseomonas genomospecies 4** (1)	100	P1-2	+	(100)	100	0	0	0	100	100	0
Roseomonas genomospecies 5** (3)	100[w]	P1-2	+	0	(100)	0	0	0	100	0	0

Numbers in parentheses after organism names are numbers of strains tested.
Values are percentages of positive; those in parentheses represent delayed positivity
+ positive for 90 to 100% of strains; - positive for 0 to 10% of strains
P and number=Number of polar flagella; L = Lateral flagella; ND = not determined
Gram's stain(Gram negative) *Bacilli with vacuole, **Coccoid rod

14-0992(001-354)editnew130158.indd 182 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.6-13 Nomenclature of glucose nonfermentative gram-negative bacilli

Current names	Former names/Synonyms
Achromobacter denitrificans	CDC group Vc *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans*
Achromobacter incenata	-
Achromobacter insolitus	-
Achromobacter piechaudii	*Alcaligenes piechaudii*
Achromobacter xylosoxidans	*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* CDC group IIIa, CDC group IIIb
Achromobacter spanius	-
Acidovorax temperans	*Pseudomonas temperans*
Acidovorax delafieldii	*Pseudomonas delafieldii*
Acidovorax facilis	*Hydrogenomonas facilis* *Pseudomonas facilis*
Acinetobacter baumannii	*Acinetobacter calcoaceticus* var. anitratus *Acinetobacter* genospecies 2 *Acinetobacter* DNA group 2
Acinetobacter beijerinckii	-
Acinetobacter bereziniae	*Acinetobacter* DNA group 10 (genospecies 10)
Acinetobacter guillouiae	*Acinetobacter* DNA group 11 (genospecies 11)
Acinetobacter gyllenbergii	*Acinetobacter* phenon 3
Acinetobacter haemolyticus	*Acinetobacter* genospecies 4 *Acinetobacter* DNA group 4
Acinetobacter johnsonii	*Acinetobacter* genospecies 7 *Acinetobacter* DNA group 7
Acinetobacter junii	*Acinetobacter* genospecies 5 *Acinetobacter* DNA group 5 *Acinetobacter grimontii*
Acinetobacter lwoffii	*Acinetobacter* DNA group 8 (genospecies 8) *Acinetobacter* DNA group 9 (genospecies 9) *Moraxella lwoffii* *Acinetobacter calcoaceticus* var. lwoffii
Acinetobacter nosocomialis	*Acinetobacter* DNA group TU13 (genospecies TU13)
Acinetobacter parvus	*Acinetobacter* phenon 4
Acinetobacter pittii	*Acinetobacter* DNA group 3 (genospecies 3)
Acinetobacter radioresistens	*Acinetobacter* DNA group 12 (genospecies 12)
Acinetobacter schindleri	*Acinetobacter* phenon 2
Acinetobacter soli	-

14-0992(001-354)editnew130158.indd 183 1/14/58 BE 3:51 PM

Current names	Former names/Synonyms
Acinetobacter ursingii	-
Acinetobacter DNA group 6 (genospecies 6)	-
Acinetobacter DNA group BJ13/TU14 (genospecies BJ13/TU14)	-
Acinetobacter DNA group BJ14 (genospecies BJ14)	-
Acinetobacter DNA group BJ15 (genospecies BJ15)	-
Acinetobacter DNA group TU15 (genospecies TU15)	-
Acinetobacter DNA group 16 (genospecies 16)	-
Acinetobacter DNA group 17 (genospecies 17)	-
Acinetobacter DNA group between 1 and 3 (genospecies between 1 and 3)	-
Acinetobacter DNA group close to TU13 (genospecies close to TU13)	-
Acinetobacter septicus (=*Acinetobacter ursingii*)	*Acinetobacter* phenon 1
Alcaligenes faecalis	Alcaligenes odorans CDC VI
Alishewanella fetalis	-
Azospirillum brasilense	Roseomonas fauriae
Balneatrix alpica	-
Bergeyella zoohelcum	CDC group IIj *Weeksella zoohelcum*
Bordetella bronchiseptica	*Bordetella bronchicanis*, *Alcaligenes bronchicanis* *Alcaligenes bronchisepticus* *Brucella bronchispetica*, *Alcaligenes bronchicanis* *Haemophilus bronchiseptica*
Bordetella parapertussis	*Bacillus parapertussis* *Haemophilus parapertussis* *Acinetobacter parapertussis*
Bordetella holmesii	CDC nonoxidizer group 2 (NO-2)
Bordetella hinzii	*Alcaligenes faecalis* type II
Bordetella trematum	-
Bordetella ansorpii	-
Bordetella avium	-
Bordetella petrii	-
Brevundimonas diminuta	*Pseudomonas diminuta* CDC group Ia
Brevundimonas vesicularis	*Pseudomonas vesicularis* *Corynebacterium vesiculare*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 184 1/14/58 BE 3:51 PM

Current names	Former names/Synonyms
Burkholderia cepacia	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar I *Pseudomonas kingii* *Pseudomonas multivorans* EO-1
Burkholderia multivorans	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar II
Burkholderia cenocepacia	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar III
Burkholderia stabilis	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar IV
Burkholderia vietnamiensis	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar V
Burkholderia dolosa	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar VI
Burkholderia ambifaria	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar VII
Burkholderia anthina	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar VIII
Burkholderia pyrrocinia	*Pseudomonas pyrrocinia* *Burkholderia cepacia* complex Genomovar IX
Burkholderia ubonensis	*Burkholderia cepacia* complex Genomovar X
Burkholderia latens	-
Burkholderia diffusa	-
Burkholderia arboris	-
Burkholderia seminalis	-
Burkholderia metallica	-
Burkholderia contaminans	-
Burkholderia lata	-
Burkholderia gladioli	*Pseudomonas gladioli* *Pseudomonas marginata* *Burkholderia cocovenenans* *Pseudomonas antimicrobica*
Burkholderia mallei	*Pseudomonas mallei* *Bacillus mallei* *Pfeifferella mallei* *Malleomyces mallei* *Actinobacillus mallei* *Loefferella mallei* *Acinetobacter mallei*
Burkholderia pseudomallei	*Pseudomonas pseudomallei* *Bacillus pseudomallei* *Bacterium whitmori* *Malleomyces pseudomallei* *Loefflerella pseudomallei*
Burkholderia thailandensis	-
Burkholderia oklahomensis	*Burkholderia pseudomallei* strain Oklahoma
Burkholderia fungorum	-

14-0992(001-354)editnew130158.indd 185 1/14/58 BE 3:51 PM

Current names	Former names/Synonyms
CDC *Alcaligenes*-group 1	-
Chryseobacterium anthropi	CDC group IIe
Chryseobacterium hominis	CDC group IIh, CDC group IIc
Chryseobacterium indologenes	*Flavobacterium indologenes*, *Flavobacterium* group IIb
Chryseobacterium gleum	*Flavobacterium gleum*
Comamonas testosteroni	*Pseudomonas testosterone*
Comamonas terrigena	*Comamonas terrigena* DNA group 1 *Aquaspirillum aquaticum*, CDC group EF-19
Comamonas aquatica	*Comamonas terrigena* DNA group 2 *Aquaspirillum aquaticum*
Comamonas kerstersii	*Comamonas terrigena* DNA group 3, EF group 10
Cupriavidus pauculus	CDC group IVc-2, *Ralstonia paucula*, *Wautersia paucula*
Cupriavidus gilardii	*Ralstonia gilardii*, *Wautersia gilardii*
Cupriavidus respiraculi	*Ralstonia respiraculi*, *Wautersia respiraculi*
Cupriavidus taiwanensis	*Ralstonia taiwanensis*, *Wautersia taiwanensis*
Delftia acidovorans	*Pseudomonas acidovorans*, *Comamonas acidovorans*, *Pseudomonas indoloxidans*, *Pseudomonas desmolytica*
Elizabethkingia meningoseptica	*Chryseobacterium meningosepticum*, *Flavobacterium meningosepticum*, CDC group IIa
Empedobacter brevis	*Flavobacterium breve* *Flavobacterium brevis* *Pseudobacterium brevis*
Flavobacterium mizutaii	*Sphingobacterium mizutaii* *Flavobacterium mizutaii* CDC group IIi
Haematobacter massiliensis	*Rhodobacter massiliensis*
Haematobacter missouriensis	-
Halomonas venusta	*Alcaligenes venustus*, *Deleya venusta*
Inquilinus limosus	-
Kerstersia gyiorum	*Alcaligenes faecalis*-like organism
Laribacter hongkongensis	-
Massilia timonae	-
Methylobacterium mesophilicum	*Pseudomonas mesophilica*, *Pseudomonas extorquens*, *Vibrio extorguens*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 186 1/14/58 BE 3:51 PM

Current names	Former names/Synonyms
Moraxella atlantae	CDC group M-3
Moraxella catarrhalis	*Branhamella catarrhalis*, *Neisseria catarrhalis*
Moraxella lacunata	*Moraxella liquefaciens*
Myroides odoratus	*Flavobacterium odoratum*, CDC group M4-f
Myroides odoratimimus	*Flavobacterium odoratum*
Neisseria elongata subsp. *nitroreducens*	CDC group M-6, *Neisseria elongata*
Neisseria weaveri	CDC group M-5, *Neisseria parelongata*
Ochrobactrum anthropi	CDC group Vd-1 and Vd-2 *Achromobacter* spp. biotypes 1 and 2 *Achromobacter* group A, C and D
Ochrobactrum intermedium	-
Ochrobactrum pseudointermedium	-
Ochrobactrum pseudogrignonense	-
Ochrobactrum haematophilum	-
Oligella ureolytica	CDC group IVe
Oligella urethralis	*Moraxella urethralis*, CDC group M-4
Pandoraea sp.	CDC group WO-2
Pannonibacter phragmitetus	*Achromobater* group B and E
Paracoccus yeei	CDC group EO-2
Pedobacter heparinus	*Flavobacterium heparinum* *Cytophaga heparina* *Sphingobacterium heparinum*
Pedobacter piscium	*Sphingobacterium piscium*
Pseudomonas luteola	*Chryseomonas luteola* CDC group Ve-1
Pseudomonas mendocina	CDC group Vb-2
Pseudomonas mosselii	-
Pseudomonas monteilii	-
Pseudomonas oryzihabitans	*Flavimonas oryzihabitans* CDC group Ve -2
Pseudomonas stutzeri	CDC group Vb-1
Pseudomonas stutzeri-like	CDC group Vb-3
Pseudomonas veronii	-
Pseudomonas-like group 2	CDC group IVd, CDC group EF-1
Psychrobacter immobilis	-

14-0992(001-354)editnew130158.indd 187 1/14/58 BE 3:51 PM

Current names	Former names/Synonyms
Psychrobacter phenylpyruvicus	*Moraxella phenylpyruvica*, CDC group M-2
Raltonia pickettii	*Burkholderia pickettii*, *Pseudomonas pickettii* CDC group Va-1 and Va-2
Ralstonia insidiosa	*Ralstonia pickettii*-like isolates
Ralstonia mannitolilytica	*Ralstonia pickettii* biovar 3, CDC group Va-3
Ralstonia solanacearum	*Burkholderia solanacearum* *Pseudomonas solanacearum*
Rhizobium radiobacter	*Agrobacterium tumefaciens*, CDC group Vd-3, *Agrobacterium radiobacter*
Roseomonas cervicalis	-
Roseomonas gilardii subsp. *gilardii*	-
Roseomonas gilardii subsp. *rosea*	-
Roseomonas mucosa	-
Shewanella algae	*Shewanella putrefaciens* biovar 2, CDC biotype 2, CDC group Ib-2
Shewanella putrefaciens	*Pseudomonas putrefaciens* *Alteromonas putrefaciens* *Achromobacter putrefaciens*, CDC group Ib-1
Sphingomonas paucimobilis	*Pseudomonas paucimobilis* CDC group IIk-1 *Flavobacterion devorans*
Sphingomonas parapaucimobilis	-
Sphingobacterium multivorum	*Flavobacterium multivorum* CDC group IIk-2
Sphingobacterium spiritovorum	CDC group IIK-3, *Flavobacterium spiritovorum* *Flavobacterium yabuuchiae*, *Sphingobacterium versatilis*
Sphingobacterium thalpophilum	*Flavobacterium thalpophilum*
Stenotrophomonas maltophilia	*Xanthomonas maltophilia* *Pseudomonas maltophilia*, CDC group I *Stenotrophomonas africana*
Wautersia eutropha	*Alcaligenes eutrophus* *Ralstonia eutropha* *Cupriavidus necator*
Wautersiella falsenii	phenotypically resembling members of the genera *Chryseobacterium* and *Empedobacter.*
Weeksella virosa	CDC group IIf *Flavobacterium genitale*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 188 1/14/58 BE 3:51 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Deborah A. Henry and David P. Speert, *Pseudomonas*. p. 677-738. In James V. et al. (eds.) Manaul of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, Washington, DC 2011.
2. Gilardi GL. Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative rods. Department of Laboratory. New York: North General Hospital, 1990.
3. James V,Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevudimonas*, *Comamonas*, *Deftia*, and *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Non-fermentative Gram-Negative Bacteria.In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10thed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 677-738.
4. John J. Lipuma, Bart J. Currie, Sharon J. Peacock, and Peter A.R.Vandamme. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In James V. et al. (eds.) Manaul of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, Washington, DC 2011. p. 692-713.
5. Lipuma JJ, Currie BJ, Peacock SJ, Vandamme PAR. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia* and *Acidovorax*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10thed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 692-713.
6. Mario Vaneechoutte, Lenie Dijkshoorn, Alexandr Nemec, Peter Kampfer, and Georges Wauters. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* and Other Nonfermentative Gram-negative Rods. James V. et al. (eds.) Manaul of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, Washington, DC 2011. p. 714-738.
7. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Nemec A, Kampfer P, Wauters G. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* and Other Nonfermentative Gram-negative Rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editor. Manual of Clinical Microbiology 10thed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 714-38.
8. Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Enberge S, Woods GL. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 303-91.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 189 1/14/58 BE 3:51 PM

9. ภัทรชัย กีรติสิน. ตำราแบคทีเรียทางการแพทย์.กรุงเทพมหานครฯ:ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549. หน้า 439-62.
10. สุรางค์ เดชศิริเลิศ. การวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม Non-fermentative Gram negative bacilli.ใน: คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปกองโรงพยาบาลภูมิภาค. กรุงเทพมหานครฯ: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2540.หน้า 85-110.
11. Appa.szu.cz [homepage on the Internet]. Bratislava: Species of the genus Acinetobacter, [cite 2014 Oct 27]. Available from: http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf
12. Dsmz.de [homepage on the Internet]. Braunschweig: List of Prokaryotic Names Validly Published updated Octber 2014, [cite 2014 Oct 27]. Available from: http://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/ChiefEditors/BacterialNomenclature/DSMZ_Bactnames.pdf

14-0992(001-354)editnew130158.indd 190 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.7 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Higher Bacteria

ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน

หลักการ higher bacteria เป็นเชื้อในกลุ่ม actinomycetes จัดอยู่ใน Order Actinomycetales ซึ่งมีการเจริญเป็นเส้นสายเล็กๆ แตกกิ่งก้าน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.8 μm ขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์หรือแตกหักเป็นท่อนของเส้นสาย มีทั้งเชื้อที่เป็น aerobic actinomycetes, facultative anaerobes และ obligate anaerobes เชื้อก่อโรคที่สำคัญในกลุ่ม aerobic actinomycetes ได้แก่ *Nocardia*, *Actinomadura*, *Rhodococcus* และ *Streptomyces*

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. **สิ่งตรวจ** เสมหะ สิ่งตรวจจากระบบหายใจ หนองจากแผล เลือด น้ำไขสันหลัง ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง ปอด เป็นต้น
2. **การตรวจโดยตรงทางกล้องจุลทรรศน์**

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจโดยตรงทางกล้องจุลทรรศน์

ในกรณีที่สิ่งตรวจเป็นหนองจากแผล (non-sterile site) ที่สงสัยโรค actinomycotic mycetoma นำตัวอย่างหนองจากแผลถ่ายลงในจานเพาะเชื้อตรวจหา grains หรือ granules ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อก่อโรค (microcolonies) ดูสี รูปร่าง ขนาด ความนุ่มหรือความแข็งของ grains หรือ granules ด้วยตาเปล่า จากนั้นใช้ pasteur pipette ดูดแยก grains ออกมาหยดลงบนแผ่นสไลด์แก้วและใช้แผ่นสไลด์แก้วอีกแผ่นหนึ่งปิดทับ บดให้ grains แตก แล้วเกลี่ยให้เป็นแผ่นบาง ปล่อยให้แห้งและลนผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง

ชิ้นเนื้อ ใช้กรรไกรที่ปราศจากเชื้อตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใช้คีมคีบปราศจากเชื้อคีบชิ้นเนื้อกดลงบนแผ่นสไลด์แก้วหลายๆครั้ง ปล่อยให้แห้งและลนผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง

Body fluids (เลือด น้ำไขสันหลัง น้ำจากตำแหน่งที่ไม่มีเชื้อประจำถิ่น) นำเข้าเครื่องปั่น (centrifuge) โดยใช้ความเร็ว 2800 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่อยู่ก้นหลอดมา smear บนแผ่นสไลด์แก้วปล่อยให้แห้งและลนผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง

2.1.1 <u>การย้อมแกรม</u> โดยวิธีการย้อมเหมือนกับการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

เชื้อควบคุมคุณภาพ Gram-positive control *Streptomyces flavus* DMST 15342

Gram-negative control *Escherichia coli* DMST 4212

2.2.2 <u>การย้อม modified Kinyoun acid-fast</u>

วิธีย้อม

1. หยดสารละลาย carbol fuchsin ลงบนแผ่น smear จนทั่ว ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ไม่ต้องอุ่น
2. ล้างด้วยน้ำ
3. ล้างด้วย 50% ethyl alcohol ราดทับและเททิ้งสลับกันไปหลายๆครั้งจนกว่าสีแดงส่วนเกินจะจางลง
4. ล้างด้วยน้ำ
5. ล้างด้วย 1% sulfuric acid ในน้ำ เป็นเวลา 3 นาที
6. ย้อมทับด้วย methylene blue เป็นเวลา 1 นาที
7. ล้างด้วยน้ำ ปล่อยให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เชื้อควบคุมคุณภาพ

modifiied AFB positive control *Nocardia asteroides* DMST 15332

modifiied AFB negative control *Streptomyces flavus* DMST 15342

2.2 การเพาะเชื้อ

การตรวจแยกเชื้อ aerobic actinomycetes จากสิ่งตรวจที่ไม่มีเชื้อประจำถิ่น (sterile sites) หรือ concentrated sterile body fluid สามารถเพาะโดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BA, CA, BHA, SDA และ Lowenstein-Jensen medium

สิ่งตรวจจากตำแหน่งที่มีเชื้อประจำถิ่น (nonsterile sites) เช่น สิ่งตรวจจากทางเดินหายใจ และ mycetoma ให้ pretreat ด้วย low-pH (2.2) HCl-KCl solution (46.8 ml 0.2M HCl และ 300 ml 0.2M KCL) ใช้ 1 ml low-pH (2.2) HCl-KCl solution ผสมกับตัวอย่าง 10 ml ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที เพาะลงบน selective media เช่น MTM, Buffered charcoal yeast extract (BCYE) เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C และ 35 ^{o}C นาน 1-3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อทุกวันในสัปดาห์ที่หนึ่ง และสัปดาห์ละครั้งของสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เมื่อเชื้อเจริญ ส่งต่อฝ่ายเชื้อราวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

นำโคโลนีที่ได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติการติดสี acid-fast ดูการสร้าง aerial mycelium ด้วยกล้องจุลทรรศน์

14-0992(001-354)editnew130158.indd 192 1/14/58 BE 3:51 PM

3. การอ่านผล

ตารางที่ 5.7-1 ลักษณะของ grains หรือ granules ของเชื้อก่อโรค actinomycotic mycetoma

Organisms	Grains
Nocardia asteroides	rare; white, soft, irregular, 1 mm
Nocardia brasiliensis	white to yellow, soft, lobe, 1 mm
Nocardia otitidiscaviarum	white to yellow
Actinomadura madurae	white, soft, oval to lobe, 5 mm
Actinomadura pelletieri	red, hard, oval to lobe, 1 mm
Streptomyces somaliensis	yellow, hard, round to oval, 2 mm

Actinomadura spp. ติดสีแกรมบวก ไม่ติดสี modified acid-fast รูปร่างลักษณะเป็นเส้นสายสั้นๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 μm

Nocardia spp. ติดสีแกรมบวกและติดสี modified acid-fast เป็นบางส่วน รูปร่างลักษณะเป็นเส้นสาย เส้นสายแตกหักเป็นรูปท่อน จนถึงรูปกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 μm

Rhodococcus spp. ติดสีแกรมบวกและติดสี modified acid-fast เป็นบางส่วน รูปร่างลักษณะเป็น coccobacilli หรือมีลักษณะคล้าย diphtheroids

Streptomyces spp. ติดสีแกรมบวก ไม่ติดสี modified acid-fast รูปร่างลักษณะเป็นเส้นสาย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 μm ไม่มีการแตกหักของเส้นสายเป็นท่อน

ตารางที่ 5.7-2 Morphologic characteristics of aerobic actinomycetes

Genus	Substrate hyphae	Aerial hyphae	Conidia	Modified acid-fast	Microscopic morphology	Colonial morphology
Actinomadura	+	V	V	-	Thin, short branching flament	Powdery aerial hyphae may be blue, brown, cream, gray, green, pink, white, violet, or yellow. Colonies are wrinkled and may have a leathery or cartilaginous appearance when aerial myceliumis absent.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 193 1/14/58 BE 3:51 PM

Genus	Substrate hyphae	Aerial hyphae	Conidia	Modified acid-fast	Microscopic morphology	Colonial morphology
Nocardia	+	+	V	W	Thin, filamentous branching rods, 0.5-1.0 µm in diam; beading generally apparent.	Chalky, matte or velvety, powdery (usually), irregular, wrinkled, heaped, or smooth on surface; may be brown, tan, pink, orange, red, purple, gray, yellow, peach, or white on reverse; smooth or granular; soluble brown or yellow pigments may be produced
Rhodococcus	+	-	-	W	Coccoid to bacillary forms	Rough, smooth, or mucoid; buff, cream, yellow, orange, or red; colorless variants occur; may become increasingly pigmented and rough with age.
Streptomyces	+	+	+	-	Filamentous branching rods, 0.5-2.0 µm in diam; filaments may fragment into short rods; may stain more solidly gram-positive than Nocardia; may show beading.	Colonies are discrete and lichenoid, leathery, or butyrous; variety of pigments; aerial hyphae may appear floccose, granular, powdery, or velvety; may produce a colored soluble pigment.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 194 1/14/58 BE 3:51 PM

ตรวจดูการสร้าง aerial mycelium ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ส่วนขอบของโคโลนีจะเห็นลักษณะที่เป็นเส้นสายคล้ายกับเส้นซิกแซก

4. การรายงานผล

การตรวจโดยตรงทางกล้องจุลทรรศน์

รายงานผล *Nocardia* "Gram-positive, modified acid fast positive (partially acid fast), branching filament, beading filament, fragment bacilli, suggesting *Nocardia*."

รายงานผล *Rhodococcus* "Gram-positive, modified acid fast positive (partially acid fast), coccoid to bacillary forms, suggesting *Rhodococcus*."

รายงานผล *Streptomyces* "Gram-positive, modified acid fast negative, branching filament, suggesting *Streptomyces*."

รายงานผล *Actinomadura* "Gram-positive, modified acid fast negative, short branching filament, suggesting *Actinomadura*."

กรณีที่พบ grains หรือ granules ในสิ่งตรวจ ให้พิจารณาสี ขนาด ความนุ่มหรือแข็งและขนาดของ grains หรือ granules ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 5.7.1 ลักษณะของ grains หรือ granules ของเชื้อก่อโรค actinomycotic mycetoma มาประกอบในการรายงานผลด้วย

การรายงานผลเพาะเชื้อเบื้องต้น สามารถรายงานผลได้ในระดับ genus โดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การติดสี AFB และการสร้าง aerial mycelium โดยพิจารณาคุณสมบัติของเชื้อที่ทำการทดสอบประกอบกับคุณสมบัติของเชื้อแต่ละgenus ที่แสดงไว้ในตารางที่ 5.7.2

เอกสารอ้างอิง

1. Conville PS and Witebsky FG. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinimadura*, *Streptomycetes*, and Other Aerobic Actinomycetes. In: Versalovic J, editor in chief. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 443-471.
2. Engelkirk PG and Engelkirk DJ. Laboratory Diagnosis of Selected Fungal Infections. In: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 507-540.
3. Hazen KC and Howell SA. Aerobic Actinomycetes. In: Garcia LS.editor in chief.Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Vol 2. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 6.0.1-6.2.10.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 195 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.8 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Miscellaneous Gram-Negative Bacteria

วรดา สโมสรสุข
อนุศักดิ์ เกิดสิน

***Francisella* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดงของ safranin บางๆ รูปร่าง coccobacilli ประกอบด้วย 3 species ดังนี้ *F. tularensis*, *F. novicida* และ *F. philomiragia* สำหรับ *F. tularensis* สามารถจำแนกออกได้อีก 3 subspecies คือ *tularensis*, *holarctica* และ *mediasiatica* โรคที่เกิดจากเชื้อนี้คือ โรคทูลารีเมีย (tularemia) ซึ่งเชื้อที่ก่อโรคนี้คือ *F. tularensis* โดยเฉพาะ *F. tularensis* subsp. *tularensis* มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงสุดและถือเป็นอาวุธชีวภาพอีกด้วย เชื้อนี้มีสัตว์ป่าเป็นแหล่งรังโรค เป็นทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง การติดต่อสู่คนสามารถเกิดขึ้นโดยผ่านทางบาดแผลจากการสัมผัส การถูกกัดหรือข่วน การรับประทานเนื้อสัตว์ป่าที่ปรุงไม่สุก หรือการหายใจเอาละอองหรือสารคัดหลั่งที่มีการปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าสู่ร่างกาย ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานผู้ป่วยโรคทูลารีเมีย จากเชื้อ *F. tularensis* แต่พบรายงานการติดเชื้อ *F. novicida* ในกระแสโลหิตในผู้ป่วย เมื่อปี พ.ศ. 2551

เชื้อ *F. tularensis* สามารถเพาะได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BA หรือ CA ที่เสริมด้วยสารประกอบจำพวก sulhydryl ได้แก่ cysteine, cystine, thiosulfate หรือ IsoVitaleX นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ buffered charcoal-yeast extract agar (BCYE) ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ *Legionella* spp. สามารถใช้ได้ อย่างไรก็ตาม *F. novicida* และ *F. philomiragia* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BA หรือ CA ที่ไม่ต้องเสริมด้วยสารประกอบจำพวก sulhydryl เชื้อนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C ไม่ต้องการ CO_2 ในการเจริญเติบโต ระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนเป็นโคโลนีโดยเฉลี่ยมากกว่า 2 วัน โดยทั่วไปโคโลนีมีขนาดประมาณ 1-2 mm สีเทาถึงเทาขาว บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA การทดสอบเบื้องต้นเพื่อจำแนก *Francisella* ออกจากเชื้ออื่นๆ ที่ใกล้เคียง เช่น *Brucella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* ได้แก่ การทดสอบ oxidase, X, V factor และ urease ซึ่งให้ผลลบทั้งหมด

***Brucella* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง coccobacilli ขนาดเล็ก ติดสีแดงของ safranin บางๆ ไม่มี capsule, flagella และ endospore ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้ ประกอบด้วย 9 species มีสัตว์ที่เป็นพาหะจำเพาะตามแต่ละ species

ได้แก่ *B. melitensis* มีแพะหรือแกะหรืออูฐ เป็นสัตว์รังโรค *B. abortus* มีสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค กระบือ เป็นสัตว์รังโรค *B. suis* มีสุกรเป็นสัตว์รังโรค *B. ovis* มีแกะเป็นสัตว์รังโรค *B. canis* มีสุนัขเป็นสัตว์รังโรค *B. neotomae* มีหนูเป็นสัตว์รังโรค *B. delphini*, *B. pinnipediae*, *B. cetaceae* มีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเล อาทิ แมวน้ำ ปลาวาฬ ปลาโลมา เป็นสัตว์รังโรค

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Brucella* เรียกว่า โรค brucellosis นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอย่างอื่นแตกต่างกันไปตามสภาพภูมิศาสตร์ เช่น Malta fever, Mediterranean fever, Cyprus fever, Gibralta fever เป็นต้น การติดต่อสู่คนสามารถเกิดขึ้นโดยผ่านทางบาดแผลจากการสัมผัส การรับประทานนมดิบ เนย ชีสที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และการหายใจเอาละอองหรือสารคัดหลั่งที่มีการปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าสู่ร่างกาย เชื้อนี้ยังถูกจัดให้เป็นอาวุธชีวภาพอีกด้วย

การเพาะเชื้อ *Brucella* สามารถเพาะลงอาหารเลี้ยงเชื้อ BA, CA, Thayer-Martin, Martin-Lewis เชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C ที่มีหรือไม่มี CO_2 (5-10%) สามารถพบโคโลนีได้หลังจากอบแล้ว 1-2 วัน โคโลนีมีขนาดเล็กประมาณ 1-2 mm ลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ นอกจากนี้ เครื่อง automated blood culture เช่น Bactec, BacT Alert ให้ผลการเจริญของเชื้อดีกว่า วิธี nonautomated blood culture อย่าง biphasic Ruiz-Castañeda bottle ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7-35 วันในการเจริญ ขณะที่เครื่อง automated blood culture จะใช้เวลาไม่เกิน 10-14 วัน ในการจำแนกเชื้อ *Brucella* เบื้องต้น ได้แก่ การทดสอบ oxidase, catalase และ urease ซึ่งให้ผลบวกทั้งหมด โดยเฉพาะการทดสอบ urease จะให้ผลบวกที่ค่อนข้างเร็ว ภายใน 5 นาที สำหรับ species ที่แยกได้จากคนอยู่บ่อยๆ เช่น *B. melitensis*, *B. abortus*

***Pasteurella* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างทรงแท่งหรือ coccobacilli ปัจจุบันมี 8 species โดย *P. multocida* เป็น species ที่แยกได้จากผู้ป่วยบ่อยที่สุด อย่างไรก็ตาม *P. multocida* สามารถจำแนกออกได้อีก 3 subspecies ดังนี้ *multocida*, *septica* และ *gallicida* เชื้อ *Pasteurella* พบได้ทั่วไปทั้งในสัตว์ป่าและสัตว์บ้าน

การเพาะเชื้อ *Pasteurella* สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการอย่าง BA หรือ CA ที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C ไม่ต้องการ CO_2 โคโลนีมีขนาดประมาณ 1-2 mm nonhemolysis อย่างไรก็ตามบางสายพันธุ์อาจพบโคโลนีที่มีลักษณะเยิ้มได้ (mucoid) การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การทดสอบ catalase, oxidase, indole ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวกทั้งหมด นอกจากนี้การใช้ penicillin disk ขนาด 10 U สามารถช่วยในการจำแนกได้ เนื่องจาก *Pasteurella* จะไวต่อยา penicillin โดยมีขนาดของ inhibition zone $\geq$ 15 mm

14-0992(001-354)editnew130158.indd 197 1/14/58 BE 3:51 PM

***Bartonella* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขนาดเล็ก รูปร่างทรงแท่งหรือ curve rod เล็กน้อย คล้ายกับ *Helicobacter*, *Campylobacter* หรือ *Haemophilus* เชื้อติดสีแกรมไม่ค่อยดี ไม่ว่าจะใช้ safranin หรือ basic fuchsin เชื้อเป็น facultative intracellular สามารถอาศัยอยู่ในเซลล์ของคนและสัตว์ มีมากกว่า 22 species มีสัตว์บ้าน สัตว์ป่า และแมลงเป็นแหล่งรังโรค

Bartonella สามารถเพาะได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ อย่าง BA และ CA แต่เนื่องจากเป็นเชื้อที่ fastidious ดังนั้นระยะเวลาในการเพาะอาจนานตั้งแต่ 5 วัน จนถึง 30 วัน ณ อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C ที่มี CO_2 (5%) และความชื้นสูง (high humidity) ลักษณะโคโลนีมี 2 แบบ คือ (1) แบบขรุขระ ผิวไม่เรียบ แห้ง ลักษณะคล้ายกับดอกกะหล่ำ (cauliflower-like) (2) แบบกลม ผิวเรียบ ขนาดเล็ก และอาจฝังอยู่ในเนื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *Bartonella* ค่อนข้าง inert ต่อการทดสอบทางปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งจะให้ผลลบต่อการทดสอบทั้งหมด ดังนั้นวิธีในการตรวจยืนยันเชื้อดังกล่าวควรใช้วิธีทางอณูชีววิทยา เช่น DNA sequencing, PCR ซึ่งเหมาะสมที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น อาจสันนิษฐานได้ว่าเป็นเชื้อดังกล่าว

อาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่ช่วยเสริมให้เชื้อ *Bartonella* เจริญเติบโตได้ดี คือ *Bartonella Alphaproteo* bacteria growth medium (BAPGM) อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่เลี้ยงเชื้อในเครื่อง automated blood culture system ที่อาศัยการตรวจจับสัญญาณจาก CO_2 มักล้มเหลวในการตรวจหาเชื้อนี้ เพราะว่าเชื้อมีความ inert ในการย่อยสลายอาหาร และผลิต CO_2 ได้น้อยมาก ดังนั้นการทำ blind subculture จากขวด hemoculture จะมีประโยชน์ในกรณีที่สงสัยเชื้อดังกล่าว

***Chromobacterium* spp.**

เฉพาะ *C. violaceum* เท่านั้น ที่ก่อโรคในคนเท่านั้น เชื้อนี้ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง ส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 90 มีรงควัตถุ violacein v ทำให้มีโคโลนีสีม่วง แต่อย่างไรก็ตามบางสายพันธุ์ที่ไม่มีรงควัตถุก็สามารถพบได้

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ เช่น BA หรือ CA หรือ TSA สามารถใช้เพาะได้ดี เชื้อโตง่ายคล้ายกับแบคทีเรียกลุ่ม enteric อาจพบ β-hemolysis บน BA ได้ในบางสายพันธุ์ เชื้อสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-37 ^{o}C ไม่ต้องการ CO_2 โคโลนีมีขนาด 1-2 mm หลังจาก 24 ชม. ลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ และส่วนใหญ่มีสีม่วง เนื่องจากรงควัตถุ violacein ดังนั้นการจำแนกเบื้องต้นค่อนข้างง่าย ถ้าพบโคโลนีมีสีม่วงดังกล่าว oxidase ให้ผลบวก อย่างไรก็ตามถ้าพบเชื้อที่ไม่ให้โคโลนีสีม่วง อาจทำให้สับสนกับ *Aeromonas* แต่สามารถจำแนกออกจาก *Aeromonas* ได้โดยการทดสอบ lysine, maltose และ mannitol ให้ผลลบทั้งหมด

14-0992(001-354)editnew130158.indd 198 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.8-1 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียในกลุ่ม miscellaneous gram negative และแบคทีเรียอื่นที่ใกล้เคียง

Test	*Francisella* spp.	*Brucella* spp.	*Pasteurella* spp.	*Bartonella* spp.	*Haemophilus* spp.	*Chromobacterium violaceum*	*Bordetella bronchiseptica*	*Ochrobactrum anthropi*
Growth on BA	v	+	+	+	-	+	+	+
Growth on CA	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on MAC	-	-	v	-	-	+	+	+
Oxidase	-	+	+	-	V	v	+	+
Urease	-	+	v	-	V	ND	+	+
Motility	-	-	-	-	-	+	+	+
Indole	-	-	+**	-	V	v	-	-
X and/or V factor requirement	-	-	-	-	+	-	-	-
Cysteine enhancement	+*	-	-	-	-	-	-	-

* *F. philomiragia* และ *F. novicida* ไม่ต้องการ cysteine ในการเจริญ

** *P. aerogenes* และ *P. caballi* ให้ผลลบ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 199 1/14/58 BE 3:51 PM

***Campylobacter* spp.**

เชื้อ *Campylobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ใน family *Campylobacteraceae* รูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curved) S-shaped หรือเป็นเกลียว (spiral) ขนาด 0.2-0.9 x 0.5-5.0 μm ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ แต่อาจพบเป็นรูปร่างกลมหรือรี หากเพาะไว้นานหลายวัน เชื้อนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยใช้ polar flagellum ส่วนใหญ่เป็น microaerobic bacteria เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ เวลาเลี้ยงเชื้อต้องใช้บรรยากาศที่มี 5% O_2, 10% CO_2, and 85% N_2 บางสายพันธุ์เจริญได้ในสภาวะ aerobic หรือ anaerobic ได้ เดิมจัดอยู่ใน genus *Vibrio* เนื่องจากมีรูปร่างคล้ายกัน เชื้อ *Campylobacter* มี 21 species (ตารางที่ 5.8-2) ได้แก่ *C. jejuni, C. coli, C. fetus, C. upsaliensis, C. lari, C. hyointestinalis, C. helveticus, C. sputorum, C. concisus, C.curvus, C. rectus, C. showae, C. gracilis, C. mucosalis, C. lanienae, C. insulaenigrae, C. canadensis, C. hominis, C. avium, C. cuniculorum,* และ *C. subantarcticus*

เชื้อใน genus *Campylobacter* มีทั้งเป็นสาเหตุของโรคและกลุ่มที่ไม่ก่อโรคเชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญ *C. jejuni* และ *C. coli* เป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อมากที่สุด เชื้อสามารถอยู่ในอาหาร น้ำ หรือสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ทนต่อความร้อน ความแห้งแล้ง ดื้อต่อสารต้านจุลชีพในอัตราที่สูง นอกจากนี้ เชื้อ *C. fetus, C. lari, C. upsaliensis* และ *C. hyointestinalis* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจการติดเชื้อ *C. jejuni* สามารถตรวจโดยใช้อุจจาระผสมน้ำเกลือหยดบนแผ่นแก้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด dark field หรือ phase contrast โดยตรวจหาแบคทีเรียรูปร่างโค้งงอ ที่มีการเคลื่อนที่เร็ว ปัจจุบันใช้วิธีการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย โดยเก็บใส่ขวดที่สะอาด หรือเก็บเป็น rectal swab ใส่ใน Cary-Blair transport medium นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชม. หรือหากไม่สามารถเพาะเชื้อได้ให้เก็บที่ 4 ^{o}C การเพาะเชื้อสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด เช่น 5% BA โดยใช้แผ่นกระดาษกรอง ขนาด 0.45 μm วางลงบนอาหาร BA นำ rectal swab ของผู้ป่วย มาป้ายบนแผ่นกระดาษกรอง ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นคีบเอาแผ่นกระดาษกรองทิ้งไป แล้วนำไปอบในสภาวะ microaerobic (5% O_2 10% CO_2 85% N_2) หรือใช้ anaerobic jar ที่ใส่ Campy pak (BBL) 1 ซอง ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 48 ชม.

นอกจากนี้อาจป้ายอุจจาระลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective medium ที่มีส่วนผสมของสารต้านจุลชีพ เช่น Skirrow's medium ที่มีส่วนผสมของ vancomycin, trimethoprim และ polymyxin B, Butzler's medium ที่มีส่วนผสมของ bacitracin, cycloheximide, colistin sulphate, cephazolin sodium และ novobiocin หรือ Campy-BAP ที่มีส่วนผสมของ vancomycin, polymyxin B, cephalothin sodium และ amphotericin B จากนั้นนำไปอบในสภาวะ microaerobic ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ตรวจดูโคโลนีของเชื้อหลังจากอบเพาะเชื้อนาน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 200 1/14/58 BE 3:51 PM

2-3 วัน โคโลนีของเชื้อจะมีลักษณะมันวาวคล้ายหยดน้ำค้าง ขนาด 1-2 mm สีเทาขาว เมื่อนำไปย้อมแกรมจะเห็นเป็นรูปตัว S หรือ ปีกนก (Gull wing) ติดสีแกรมลบ แต่เชื้อไม่ค่อยติดสี safranin ควรใช้ 0.05-0.1% carbol fuchsin เป็น counter stain แทน

การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเบื้องต้น

เชื้อ *Campylobacter* ทดสอบ oxidase ให้ผลบวก ทำการเพาะโคโลนีที่พบลงใน BA 3 จาน นำไปอบที่สภาวะ microaerobic ที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ อุณหภูมิ 25 ^{o}C, 37 ^{o}C และ 42 ^{o}C เป็นเวลานาน 24-48 ชม. สังเกตผลดังนี้ คือ ถ้าเป็นเชื้อ *Campylobacter* เชื้อจะเจริญได้ดีในสภาวะ microaerobic อุณหภูมิ 37 ^{o}C/42 ^{o}C แต่เจริญได้ไม่ดีที่สภาวะ microaerobic อุณหภูมิห้อง (25 ^{o}C) การแยกพิสูจน์เชื้อให้ได้แต่ละ species สามารถดูได้จากตารางที่ 5.8-2

C. jejuni แยกออกจาก *Campylobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ ด้วย hippurate hydrolysis ซึ่ง *C. jejuni* ให้ผลบวก ขณะที่สายพันธุ์อื่นให้ผลลบ วิธีการทดสอบ hippurate hydrolysis ดังต่อไปนี้

1. เขี่ยเชื้อทดสอบ 2 loopful ลงใน 0.4 ml ของ 1% hippurate solution ใน หลอดขนาด 13 x 100 mm อบที่ 37 ^{o}C 2 ชม.
2. หยด 0.2 ml ninhydrin reagent เขย่า และอบที่ 37 ^{o}C 10 นาที

   ผลบวก: เกิดสีม่วง

   ผลลบ: ไม่เปลี่ยนสี หรือเกิดสีม่วงอ่อน

บทที่ 5

14-0992(001-354)editnew130158.indd 201 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 5.8-2 การแยกพิสูจน์เชื้อ *Campylobacter* spp.

Species	α-hemolysis	Oxidase	Catalase	Hippyrate hydrolysis	Urease production	Nitrate reduction	Alkaline phosphatase	H_2S, TSI	Acid and H_2S, TSI	Indoxyl acetate hydrolysis	Growth at/ in/on											Resistance to nalidixic acid	Resistance to cephalothin	Requirement for H_2	γ-Glutamyl transpeptidase	Flagella
											25 °C (microaerobic)	30 °C (microaerobic)	37 °C (microaerobic)	42 °C (microaerobic)	37 °C (anaerobic)	Ambient O_2	Nutrient agar	CCDA	MacConkey agar	1% glycine	3.5% NaCl					
C. upsaliensis	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	(+)	-	-	+	+	-	+	-	-	(-)	-	-	+
C. sputorum	+	+	V	-	-	+	-	+	-	-	-	(+)	+	+	+	-	+	(+)	V	+	V	(+)	-	+	-	+
C. showae	+	V	+	-	-	+	-	V	-	V	-	+	V	V	+	-	V	+	+	V	-	-	-	+	NA	+
C. rectus	+	+	(-)	-	-	+	-	-	-	+	-	V	-	(-)	+	-	(-)	-	-	+	-	(+)	-	+	NA	+
C. mucosalis	-	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	(+)	V	-	(+)	-	+	NA	+
C. lari	V	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	V	+	-	-	+
C. lanienae	-	+	+	-	-	+	+	-	V	-	-	NA	+	+	+	-	NA	NA	+	-	-	+	+	-	-	+
C. jejuni subsp. *jejuni*	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
C. jejuni subsp. *doylei*	+	+	V	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	(-)	-	-	-	-	NA	+
C. insulaenigrae	NA	+	+	-	-	+	NA	-	NA	-	-	NA	NA	-	-	-	NA	NA	NA	+	-	+	+	NA	NA	NA
C. hyointestinalis subsp. *lawsonii*	V	+	+	-	-	+	(-)	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	v	v	-	+	-	V	-	+
C. hyointestinalis subsp. *hyointestinalis*	V	+	+	-	-	+	-	+	-	-	(-)	+	+	+	-	-	+	+	V	+	-	+	(-)	V	-	+

14-0992(001-354)editnew130158.indd 202 1/14/58 BE 3:51 PM

Species	α-hemolysis	Oxidase	Catalase	Hippyrate hydrolysis	Urease production	Nitrate reduction	Alkaline phosphatase	H_2S, TSI	Acid and H_2S, TSI	Indoxyl acetate hydrolysis	Growth at/ in/on											Resistance to nalidixic acid	Resistance to cephalothin	Requirement for H_2	γ-Glutamyl transpeptidase	Flagella
											25 °C (microaerobic)	30 °C (microaerobic)	37 °C (microaerobic)	42 °C (microaerobic)	37 °C (anaerobic)	Ambient O_2	Nutrient agar	CCDA	MacConkey agar	1% glycine	3.5% NaCl					
C. avium	-	+	w	+	-	+	-	-	-	+	-	NA	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-	+
C. hominis	-	+	-	-	-	V	-	-	NA	-	-	-	-	NA	+	-	NA	NA	-	+	+	V	-	NA	NA	-
C. helveticus	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	V	+	+	-	-	(+)	+	-	V	-	-	-	-	-	+
C. gracilis	-	-	V	-	-	(+)	-	-	-	V	-	V	-	V	+	-	+	V	(+)	+	-	V	-	NA	NA	-
C. fetus subsp. *venerealis*	V	+	(+)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	V	-	+	+	V	-	-	V	-	-	NA	+
C. fetus subsp. *fetus*	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(-)	-	+	+	(+)	+	-	+	-	-	-	+
C. curvus	(-)	+	-	(-)	-	+	V	(-)	-	V	-	+	V	V	+	-	+	(+)	(+)	+	-	+	-	+	NA	+
C. concisus	(-)	V	-	-	-	(-)	V	-	-	-	-	(+)	+	(+)	+	-	(-)	(-)	-	(-)	-	(+)	-	+	-	+
C. coli	(-)	+	+	-	-	+	-	V	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	V	+	-	-	+	-	-	+
C. canadensis	-	+	V	-	V	V	-	V	(-)	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V	-	V	-	-	(+)	+
C. cuniculorum	+	+	+	-	-	+	-	-	NA	+	-	NA	+	(+)	-	-	+	(+)	-	-	-	V	(+)	-	-	+
C. subantarcticus	+	+	+	-	NA	NA	NA	-	-	-	-	NA	+	+	+	-	+	NA	(-)	(+)	NA	+	-	-	NA	+

+, 90–100 % of strains positive; (+), 75–89 % of strains positive; V, 26–74 % of strains positive; (–), 11–25 % of strains positive; –, 0–10 % of strains positive.
w, weakly positive, NA, No data available. Data for reference species were taken from Foster *et al.* (2004), Lawson *et al.* (2001), Logan *et al.* (2000) On *et al.* (1996), Ross *et al.* (2009) and Debryne *et al.* (2010).

14-0992(001-354)editnew130158.indd 203 1/14/58 BE 3:51 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Debruyne L, Broman T, BergstrÖm S, Olsen B, On SL, Vandamme P. *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60:815-9.
2. Foster G, Holmes B, Steigerwalt AG, Lawson PA, Thorne P, Bryer DE, Ross HM, Xerry J,Thompson PM, Collins MD. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54:2369-73.
3. Holmes B, Pickett J, Holis DG. *Pasteurella*, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH editors. Manual of Clinical Microbiology 7th ed. Washington, DC: ASM Press; 1999. p. 632-7.
4. Lawson AJ, On SL, Logan JM, Stanley J. *Campylobacter hominis* sp. nov., isolated from the human gastrointestinal tract. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51:651-60.
5. Leelaporn A, Yongyod S, Limsrivanichakorn , Yungyuen T, Kiratisin P. *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. Emerg Infect Dis. 2008; 14:1935-7.
6. Logan JM, Burnens A, Linton D, Lawson AJ, Stanley J. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;2:865-72.
7. Maggi RG, Kempf VAJ, Chomel BB, Breitschwerdt EB. *Bartonella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 786-98.
8. On SL. Identification method for campylobacters, helicobacters and related organisms. Clin Microbiol Rev. 1996;9:405-22.
9. Petersen JM, Schriefer ME, Araj GF. 2011. *Francisella* and *Brucella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML,Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 751-69.
10. Rossi M, Debruyne, Zanoni RG, Manfreda G, Revez J, Vandamme P. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59:2364-9.
11. Zanoni RG, Debruyne L, Rossi M, Revez J, Vandamme P. *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59:1666-71.
12. Zbinden R, Graevenitz AV. Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurella, and other fastidious or rarely encountered gram-negative rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 574-87.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 204 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.9 การวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม Anaerobic Bacteria

ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์

หลักการ

การติดเชื้อ anaerobic bacteria ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อประจำถิ่นของร่างกาย ดังนั้นตำแหน่งการติดเชื้อจึงอยู่ใกล้กับตำแหน่งที่มีเชื้อ anaerobe เป็นเชื้อประจำถิ่น เช่น การติดเชื้อในลำไส้ ช่องท้อง อุ้งเชิงกราน เป็นต้น การก่อโรคมักเกิดจาก aerobic bacteria และตามด้วย anaerobic bacteria จึงพบว่าการติดเชื้อ anaerobe มีเชื้อก่อโรคหลายชนิด การติดเชื้อ anaerobic bacteria ที่เกิดจากเชื้อนอกร่างกายก็พบได้เช่นกัน เช่น บาดทะยัก อาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Clostridium botulinum* แผลติดเชื้อ (gas gangrene) จากเชื้อ *C. perfringens* เป็นต้น

ขอบเขต

การเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วย เพื่อตรวจหาเชื้อ anaerobic bacteria ที่เป็นสาเหตุของโรค ตลอดจนการตรวจสอบลักษณะตัวเชื้อด้วยวิธีการย้อมแกรมและการตรวจสอบลักษณะโคโลนีเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ anaerobic bacteria เบื้องต้น

การเก็บตัวอย่างและการนำส่งตัวอย่างตรวจวินิจฉัย anaerobic bacteria

1. การเลือกและเก็บสิ่งตรวจ การเลือกสิ่งตรวจเพื่อตรวจวินิจฉัย anaerobic bacteria นอกจากดูประวัติผู้ป่วย ผลการตรวจของแพทย์หรือข้อมูลทางห้องปฏิบัติการอื่นๆแล้ว ต้องคำนึงถึงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บวัตถุตัวอย่าง เก็บตัวอย่างในบริเวณที่มีการติดเชื้อโดยหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่น (normal flora) บริเวณใกล้เคียงและจากสิ่งแวดล้อมภายนอก
2. สิ่งตรวจที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อ anaerobic bacteria
   - 2.1 หนองจากแผลลึก หนองจากอวัยวะภายใน เช่น สมอง ปอด ตับ ช่องท้อง เป็นต้น
   - 2.2 สารน้ำในร่างกายที่ได้มาจากการเจาะดูด (aspirate) จากตำแหน่งที่อยู่โดยตรง เช่น เลือด น้ำในช่องท้อง (peritoneal fluid) น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid) น้ำจากข้อ (synovial fluid) น้ำคร่ำ (amniotic fluid) น้ำดี (bile) เป็นต้น
   - 2.3 เนื้อเยื่อจากการเก็บชิ้นเนื้อ (biopsy)
   - 2.4 สิ่งตรวจที่เก็บโดยวิธีพิเศษเช่นการเจาะผ่านหลอดคอ การเจาะดูดจากกระเพาะปัสสาวะ

3. สิ่งตรวจที่ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อ anaerobic bacteria

3.1 เสมหะ

3.2 swab ที่ป้ายจากในคอและในจมูก

3.3 อุจจาระ และ rectal swab

3.4 ปัสสาวะจากการขับถ่ายหรือการสวนปัสสาวะ (catheterized urine)

3.5 swab ที่ป้ายจากปากมดลูกหรือบริเวณช่องคลอด (cervical swab)

3.6 สิ่งตรวจที่ปนเปื้อนเชื้อประจำถิ่น (normal flora)

3.7 swab หนองจากปากแผลหรือแผลตื้น

4. การเก็บสิ่งตรวจและการนำส่งห้องปฏิบัติการ นอกจากการเลือกสิ่งตรวจที่เหมาะสมส่งตรวจวินิจฉัย anaerobic bacteria แล้ว ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อเชื้อในสิ่งตรวจซึ่งควรกระทำให้เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณตัวอย่างที่เพียงพอ ขนาดและความสะอาดของภาชนะที่ใช้ใส่ตัวอย่าง ความชื้น ปริมาณออกซิเจน (Eh) อุณหภูมิในระหว่างการนำส่ง ระยะเวลาหลังการเก็บตัวอย่างจนส่งถึงห้องปฏิบัติการ transport medium ที่ใช้ในการนำส่ง สารที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ สาร anticoagulant และการปนเปื้อนของสารต้านจุลชีพในตัวอย่าง

สิ่งตรวจที่เก็บมาแล้วควรนำส่งห้องปฏิบัติการทันที เพื่อดำเนินการตรวจเพาะเชื้อโดยเร็วที่สุดที่อุณหภูมิห้อง ไม่ควรใส่ตู้เย็นหรือแช่น้ำแข็งเพราะความเย็นมีผลต่อการเจริญของ anaerobic bacteria บางชนิด

4.1 การเก็บสิ่งตรวจที่เป็นของเหลว ใช้เข็มและกระบอกฉีดยาเก็บตัวอย่างแล้วไล่อากาศในกระบอกฉีดยาออกให้หมด ฉีดตัวอย่างลงในขวดปราศจากเชื้อที่บรรจุแก๊ส CO_2 หรือแก๊สผสมและ indicator ที่ใช้บ่งชี้ O_2 ในขวด (ภาพที่ 5.9-1) กรณีไม่มีขวดบรรจุแก๊ส CO_2 เมื่อไล่อากาศออกจากกระบอกฉีดยาแล้วให้ปักเข็มลงบนจุกยางที่ปราศจากเชื้อและนำใส่หลอดทดลอง หรืออาจใช้วิธีเก็บตัวอย่างบรรจุลงหลอดทดลองหรือขวดขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อให้เต็มพอดีเพื่อแทนที่อากาศทั้งหมด

ภาพที่ 5.9-1 Rubber-stoppered collection vial containing an agar indicator system

14-0992(001-354)editnew130158.indd 206 1/14/58 BE 3:51 PM

4.2 การเก็บสิ่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อเป็นสิ่งตรวจที่เหมาะสมเพราะเชื้อจะสามารถอยู่ในเนื้อเยื่อได้นานหลายชั่วโมง เก็บเนื้อเยื่อในหลอดทดลองปราศจากเชื้อที่บรรจุน้ำเกลือปริมาณเล็กน้อยเพื่อรักษาความชื้น และนำส่งตรวจในสภาวะไร้อากาศโดยบรรจุในถุง anaerobic pouch ใส่ anaerobic GasPak (GasPak pouch) (ภาพที่ 5.9-2)

ภาพที่ 5.9.2 Anaerobic transport system สำหรับสิ่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อ

4.3 การเก็บสิ่งตรวจที่เป็น swab ตัวอย่าง swab เป็นวัตถุตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากสัมผัสอากาศมาก ได้สิ่งตรวจน้อย มีการปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ง่าย แห้งง่าย อาจมีเชื้อตกค้างในใยสำลี สำลีบางชนิดมีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ หากมีความจำเป็นควรเก็บตัวอย่าง swab ใน anaerobic transport system ซึ่งมี soft agar ที่เติม reducing agent (รูปที่ 5.9-3)

ภาพที่ 5.9-3 Anaerobic transport system สำหรับตัวอย่าง swab

14-0992(001-354)editnew130158.indd 207 1/14/58 BE 3:51 PM

4.4 ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อแบคทีเรียที่สงสัยเป็น anaerobic bacteria ต้องการส่งตรวจยืนยันชนิดของเชื้อ ให้นำส่งตัวอย่างเชื้อในสภาวะไร้อากาศ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อใน enrichment media เช่น BA, cooked meat medium, enriched thioglycolate medium บรรจุใน GasPak pouch นำส่งห้องปฏิบัติการอ้างอิง

วิธีปฏิบัติงาน

1. เมื่อสิ่งตรวจถึงห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ทำการตรวจสอบสภาพของตัวอย่างก่อนรับ และดำเนินการตรวจวินิจฉัยทันที (แผนภูมิที่ 5.9-1) ถ้ายังไม่สามารถทำได้ในขณะนั้นให้นำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สังเกตลักษณะของตัวอย่างด้วยตาเปล่า (macroscopic examination) โดยสิ่งตรวจจากผู้ป่วยติดเชื้อ anaerobic bacteria มีลักษณะเด่นชัด เช่น มีกลิ่นเหม็น มีแก๊สเกิดขึ้นมาก มีสีดำคล้ำ มีสีแดงอิฐ (brick-red fluorescene) เมื่อดูภายใต้แสง ultraviolet เนื่องจากมี *Porphyromonas* spp. และ/หรือ *Prevotella* spp. มีก้อนสีขาวหรือเหลืองในสิ่งตรวจ (sulfur granules) ถ้าเป็นการติดเชื้อ *Actinomyces isaraelii*

3. นำตัวอย่างมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้ (primary plate) คือ Ana BA, BBE, EY, BA และ CA, liquid enrichment media เช่น enriched thioglycolate broth หรือ cooked meat medium และนำไปอบที่ 35-37 ^{O}C ในภาวะที่เหมาะสม คือ Ana BA, BBE และ EY อบในภาวะไร้อากาศ สำหรับ CA อบเชื้อในสภาวะ 5-10% CO_2 อาหารที่เหลืออบในตู้อบธรรมดา ดังแผนภูมิที่ 5.9-1

14-0992(001-354)editnew130158.indd 208 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.9-1 วิธีดำเนินการตรวจวินิจฉัย anaerobic bacteria เบื้องต้น

สิ่งตรวจ
(เลือด น้ำจากช่องปอด, หนอง, เนื้อเยื่อ)

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยตรง
- ตรวจดูลักษณะของตัวอย่าง **(macroscopic)**
- ตรวจดูการย้อมแกรม **(microscopic)**

เพาะเชื้อ บนอาหารแข็ง
- **Ana BA, BBE, EY** อบเชื้อในสภาวะไร้อากาศ 35 ± 2^{0}C 48 ชม.
- **BA** อบเชื้อในสภาวะอากาศปกติ 35 ± 2^{0}C 24 ชม.
- **CA** อบเชื้อในสภาวะ 5-10% CO_2 35 ± 2^{0}C 48 ชม.

เพาะเชื้อ ใน **liquid enrichment media** อบเชื้อในอากาศปกติ 35 ± 2^{0}C 48 ชม.
- **Ana BA primary plate positive**
  1) อบ เชื้อ 35 ± 2^{0}C 48 ชม
  2) ย้อมสีแกรม หากพบว่ามีเชื้อที่ยังแยกไม่ได้ให้ subculture
- **Ana BA primary plate negative**
  1) subculture และย้อมสีแกรม เมื่อบ่มครบ 7 วันหรือ อาหารขุ่น
  2) บ่มเพาะเชื้อ 14 วัน ไม่เจริญ ให้สังเกตด้วยตาแล้วจึงทิ้ง

ตรวจสอบผลการเจริญทั้งหมด

BA และ CA
บันทึกลักษณะและผลการย้อมสีแกรม

- **Ana BA**: เลือกโคโลนีลักษณะต่างๆ
- **BBE**: เลือกโคโลนีขนาด >1 mm ทดสอบ catalase
- **EY**: บันทึกผล lipase และ lecithinase เลือกโคโลนีลักษณะต่างๆ

เชื้อแต่ละลักษณะโคโลนี
- subculture บน Ana BA และ streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว
- subculture บน CA สำหรับทดสอบ aerotolerance
- ย้อมสีแกรม

CA scant or no growth → รายงานผลการทดสอบ/ลักษณะโคโลนี และการย้อมสีแกรม

CA good growth → aerobic bacteria

บทที่ 5

14-0992(001-354)editnew130158.indd 209 1/14/58 BE 3:51 PM

4 การเตรียมสิ่งตรวจและเพาะเชื้อจากสิ่งตรวจ (inoculate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากดำเนินการบนโต๊ะปฏิบัติการปกติ กระบวนการทั้งหมดควรเสร็จสิ้นภายใน 15-20 นาที เพื่อให้ตัวอย่างสัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด

4.1 สิ่งตรวจที่เป็นของเหลว เช่น หนองจากแผลลึก สารน้ำในร่างกาย ให้ผสมสิ่งตรวจโดยใช้ capillary pipette ดูดขึ้นดูดลงเบาๆ ไม่ให้เกิดฟองอากาศ จนแน่ใจว่ามีการกระจายตัวของเชื้อทั่วทั้งหลอด แล้วจึงดูดวัตถุตัวอย่างมา หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จานละ 1-2 หยด และหยดใส่ในอาหารเหลว (liquid enrichment media) ใกล้กับก้นหลอด 1-2 หยด หยดลงบนสไลด์สำหรับย้อมแกรม 1 หยด smear สไลด์ และ streak plate

4.2 สิ่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อหรือตัวอย่างที่ค่อนข้างแข็ง ให้ใช้กรรไกรปราศจากเชื้อตัดสิ่งตรวจใส่ liquid enrichment media ประมาณ 1 ml บดให้เข้ากันดีด้วย tissue grinder หรือผสมให้เข้ากันดีกับ liquid media จะได้เป็นวัตถุตัวอย่างเหลว เพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4.1

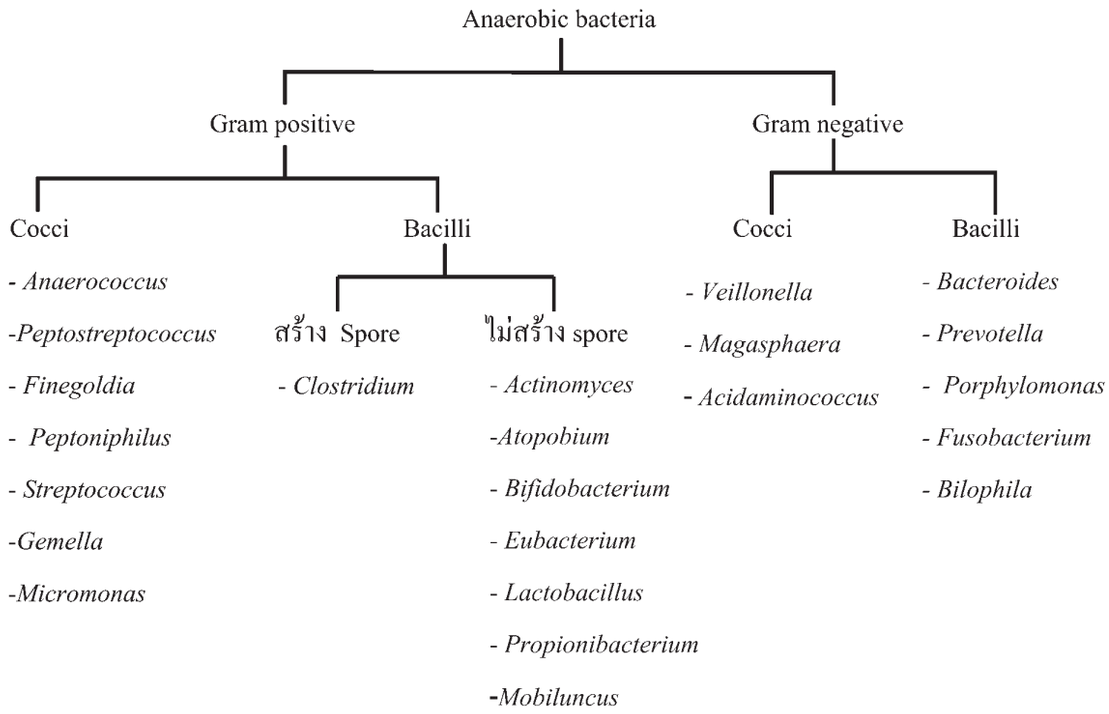
4.3 สิ่งตรวจที่เป็น swab หากมี swab 2 อัน ให้ใช้อันแรกป้ายในอาหารแข็ง โดยหมุนไปรอบๆ ให้ทั่ว ประมาณ 1 ใน 4 ของ plate อีกอันหนึ่งใส่ลงในอาหารเหลว ถ้ามี swab เพียงอันเดียว ให้ใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 0.5-1 ml บิดไปมาแล้วใช้ส่วนนี้เพาะเชื้อบนอาหารแข็งและอาหารเหลว สิ่งตรวจที่เป็น swab ไม่เหมาะที่จะย้อมแกรม

4.4 ในกรณีตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาเชื้อ *Clostridium* spp. เช่นตัวอย่างอุจจาระหรือตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ควรใช้วิธี alcohol shock โดยนำตัวอย่างผสมกับ absolute ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จึงนำตัวอย่างถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือวิธี heat shock ก็ใช้ได้ดีเช่นกัน โดยนำตัวอย่างแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 ^{o}C นาน 10-15 นาที ก่อนถ่ายตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.5 ย้อมสีแกรมจากสิ่งตรวจ (microscopic examination) ตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X10 เพื่อดูลักษณะทั่วไปก่อนจึงดูด้วยกำลังขยาย 10X100 โดยสังเกตลักษณะการติดสีของเชื้อ ขนาด รูปร่าง และจำนวนของเชื้อแต่ละชนิดในสิ่งตรวจ รวมทั้งการสร้างสปอร์ที่มีรูปไข่หรือรูปกลม และตำแหน่งของสปอร์ เช่น กลางเซลล์ (central spore) ปลายเซลล์ (terminal spore) หรือระหว่างกลางกับปลายเซลล์ (subterminal spore) เป็นต้น ข้อมูลที่ได้จากการย้อมแกรมมีความสำคัญอย่างมาก เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แพทย์สามารถนำไปใช้ประกอบการรักษาผู้ป่วยได้ และช่วยในการตัดสินใจเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (แผนภูมิที่ 5.9-2)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 210 1/14/58 BE 3:51 PM

แผนภูมิที่ 5.9-2 แสดงการแบ่งกลุ่มของ anaerobic bacteria



บทที่ 5

4.6 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Ana BA, BBE, EY และ liquid enrichment media ที่ทำการ inoculate เรียบร้อยแล้ว อบเชื้อใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 ^{o}C นาน 48 ชม. ไม่ควรเปิด anaerobic jar ก่อน 48 ชม. เพราะจะทำให้เชื้อที่กำลังเจริญและเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีสัมผัสโดนอากาศและตายได้ เนื่องจาก anaerobic bacteria ส่วนใหญ่ไวต่อ O_2 ในระหว่างช่วง logarithmic phase ของการเจริญ หากอบเชื้อใน anaerobic chamber หรือ anaerobic pouches สามารถตรวจสอบการเจริญของเชื้อได้หลังอบ 24 ชม. โดยไม่สัมผัสกับ O_2 โดยเฉพาะโคโลนีของ *Bacteroides fragilis* group บน BBE หรือโคโลนีของ *Clostridium perfringens* บน EY

4.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ BA ที่ inoculate เรียบร้อยแล้ว อบเชื้อในสภาวะอากาศปกติ (ambient air) ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 ^{o}C นาน 24 ชม.

4.8 CA ที่ inoculate เรียบร้อยแล้ว อบเชื้อในสภาวะ 5-10% CO_2 (candle jar) หรือตู้อบ CO_2 ที่อุณหภูมิ 35±2 ^{o}C นาน 48 ชม.

4.9 อ่านผลการเจริญของเชื้อบน BA หลังจากอบเชื้อในสภาวะอากาศปกติครบ 24 ชม. โดยสังเกตลักษณะของโคโลนี คุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) และย้อมสีแกรม มี *Clostridium* หลาย species สามารถเจริญได้ในสภาวะอากาศปกติ แต่ไม่สร้างสปอร์ เช่น *C. carnis*, *C. haemolyticum* และ *C. tertium*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 211 1/14/58 BE 3:51 PM

4.10 อ่านผลการเจริญของเชื้อบน CA หลังจากบ่มเพาะเชื้อในสภาวะ 5-10 % CO_2 เป็นเวลา 48-72 ชม. สังเกตลักษณะโคโลนีและย้อมสีแกรม

4.11 ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อบน Ana BA, BBE และ EY หลังจากอบเชื้อในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48-72 ชม. โดยใช้ stereoscopic microscope หรือ hand lens (X8) ช่วยในการดูลักษณะโคโลนีที่มีขนาดเล็ก อ่านลักษณะโคโลนีของเชื้อที่พบทั้งหมด ปริมาณของเชื้อแต่ละลักษณะโคโลนี โดยบันทึกรายละเอียดของโคโลนีคือ ขนาด รูปร่าง (circular, irregular, molar-tooth, breadcrumb) ขอบ (entire, rhizoid, undulate) รูปด้านข้าง (convex, umbonate, pitting) ความทึบแสง (transparent, translucent, opaque) สี และอื่นๆ เช่น fluorescence, hemolysis เป็นต้น

4.12 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทุกลักษณะที่พบบน Ana BA (primary plate) มา subculture ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บน Ana BA (secondary plate) ทดสอบ aerotolerance บน Ana BA และย้อมสีแกรม หากโคโลนีมีขนาดเล็ก ให้ inoculate บน Ana BA อย่างเดียวก่อน เมื่อเชื้อเจริญเพิ่มปริมาณแล้วจึงทำการทดสอบ aerotolerance และย้อมสีแกรม

4.12.1 การทดสอบ aerotolerance บน Ana BA แบ่ง plate เป็น 4 ช่อง ใช้ subculture เชื้อได้ 4 ลักษณะโคโลนี อบเชื้อใน 5-10% CO_2 ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 ^{o}C เป็นเวลา 48-72 ชม. เพื่อตรวจหาเชื้อที่ต้องการ CO_2 โดยเฉพาะเชื้อที่เจริญช้า (slow-growing aerobic organisms) เชื้อเจริญยาก (fastidious), facultative หรือ microaerobic species ซึ่งไม่เจริญเพียงลำพังบน BA เช่น *Haemophilus* spp. และควรคำนึงเสมอว่ามีเชื้อ aerotolerant anaerobic bacteria แกรมบวก nonsporeforming rods หลายชนิดสามารถเจริญในภาวะ CO_2 และอาจเจริญได้น้อยๆในภาวะอากาศปกติ เช่น *Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp.

4.12.2 การย้อมแกรม นำ pure colony smear บนสไลด์และย้อมแกรม บันทึกลักษณะรูปร่าง, การติดสีของเซลล์ รูปร่างและตำแหน่งของสปอร์

4.13 เลือกโคโลนีที่เจริญบน BBE มีขนาด >1 mm สังเกตปฏิกิริยา esculin hydrolysis (สีดำ = บวก) นำเชื้อแต่ละลักษณะโคโลนีไปทดสอบเอนไซม์ catalase โดยเขี่ยเชื้อลงบน glass slide หยด 15% hydrogen dioxide (15% H_2O_2) ลงบนเชื้อทดสอบ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก ถ้าไม่เกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลลบ และ subculture บน Ana BA ทดสอบ aerotolerance ย้อมสีแกรม โดยกระทำเช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้บน Ana BA (primary plate) ในข้อ 4.12

14-0992(001-354)editnew130158.indd 212 1/14/58 BE 3:51 PM

4.14 อ่านผลการสร้างเอนไซม์ lipase และ lecithinase ของเชื้อทุกลักษณะโคโลนี บน EY ถ้าเชื้อเจริญแล้วมีผิวหน้าโคโลนีเป็นสีรุ้งมันวาว แสดงว่ามีการสร้าง enzyme lipase (ให้ผล lipase บวก) ถ้าเชื้อเจริญแล้วให้โซนสีขาวขุ่นรอบโคโลนี แสดงว่ามีการสร้าง enzyme lecithinase (ให้ผล lecithinase เป็นบวก) subculture เชื้อทุกลักษณะที่พบลงบน Ana BA อบเชื้อในสภาวะไร้อากาศ ที่ 35 ± 2 ^{O}C นาน 48 ชม. EY จะช่วยแยกเชื้อที่ swarm ออกเป็นโคโลนีเดี่ยว ทำให้แยกโคโลนีได้ง่ายขึ้น

4.15 เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีบน Ana BA ที่ subculture จาก EY ที่เป็น primary plate กับเชื้อที่แยกได้จาก Ana BA ที่เป็น primary plate เลือกโคโลนีที่แตกต่างกันไปทดสอบ aerotolerance และย้อมแกรมต่อไป

4.16 อบ primary plates ซ้ำ เพื่อทำการตรวจสอบในภายหลัง

4.16.1 Ana BA อบเชื้อในสภาวะไร้อากาศ 5-7 วัน โดยตรวจสอบผลทุก 48 ชม. นำลักษณะโคโลนีใหม่ๆ ที่พบ มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และทดสอบ aerotolerance

4.16.2 Pigmented *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. และ *Actinomyces* spp. โดยปกติจะมองเห็นหลังจากบ่มในสภาวะไร้อากาศ 2-3 วัน ตรวจสอบ fluorescent และ pigmented organisms บน Ana BA ใช้ stereoscopic microscope ตรวจสอบลักษณะโคโลนี "molar tooth" ของ *Actinomyces isaraelii*

4.16.3 ทิ้ง BBE plates หลังจากอบ 2-3 วัน เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะสูญเสียคุณสมบัติความ selective เพราะการระเหยและการเสื่อมของยาปฏิชีวนะ

4.17 Liquid enrichment media

4.17.1 กรณีเชื้อเจริญบน Ana BA primary plate บ่ม liquid enrichment media ที่ 35 ± 2 ^{O}C ในสภาวะไร้อากาศ นาน 7 วัน แล้วนำมาย้อมแกรม ดูว่ามีเชื้อที่ยังแยกไม่ได้ บน plates จึงนำมา subculture แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.17.2 กรณีเชื้อไม่เจริญบน Ana BA primary plate

4.17.2.1 ตรวจสอบการเจริญของ broth culture ทุกวัน

4.17.2.2 ย้อมแกรม และ subculture ลงบน Ana BA และ CA เมื่อ broth ขุ่น หรือเมื่ออบที่ 35 ± 2 ^{O}C ในสภาวะไร้อากาศ ครบ 7 วัน

4.17.2.3 อบ broth culture ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจนครบ 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญด้วยตาเปล่าแล้วจึงทิ้ง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 213 1/14/58 BE 3:51 PM

คุณสมบัติเฉพาะที่เป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้น (presumptive identification)

1. ลักษณะเซลล์ของเชื้อที่ตรวจดูได้จากกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่รูปร่าง ขนาด การเรียงตัว การสร้างสปอร์ การติดสีแกรม
2. ลักษณะของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง ได้แก่ ลักษณะโคโลนี การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การดูดกลืนแสง fluorescence และการสร้างเม็ดสี (pigment)
3. คุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ lecithinase, lipase และ catalase
4. ความยากง่ายในการเจริญเติบโตในอาหารเหลว
5. ความทนทานต่อออกซิเจน
6. ความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 20% bile

ตารางที่ 5.9-1 การอ่านผล anaerobic bacteria

ชนิดของแบคทีเรีย	ลักษณะเมื่อย้อมแกรม	ลักษณะโคโลนี
Anaerobic แกรมลบ rods		
Prevotella melaninogenica	Coccobacilli	กลม ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ ตรงกลางสีน้ำตาลดำ ขอบสีน้ำตาลอ่อน สียิ่งเข้มขึ้นเมื่ออบไว้นานขึ้น
Bacteroides fragilis group	Pleomorphic rods ปลายเซลล์มน ติดสีซีด อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักพบเห็น vacuoles ภายในเซลล์	กลม ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ สีขุ่นมัวหรือขาว ดื้อ penicillin เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำดี 20%
Fusobacterium mortiferum	สีซีด ติดสีไม่สม่ำเสมอ pleomorphic rods เซลล์บวม หัวท้ายแหลมเรียงต่อกันเป็นเส้น	กลม ขอบโคโลนีมีเส้นใย ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย หรือเป็นรอยนูน ตรงกลางโคโลนีอ่อนนุ่ม non-hemolytic
Fusobacterium necrophorum	Pleomorphic rods ปลายเซลล์มน หรือแบน อาจเรียงต่อกันเป็นเส้น	กลม ขอบโคโลนีหยักปลายแหลม ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย หรือเป็นรอยนูน ตรงกลางหรือเป็นสันโคโลนี ใสหรือขุ่น
Fusobacterium nucleatum	ติดสีซีด ผอมยาว คล้ายกระสวย ทอผ้า ปลายแหลม อยู่เป็นเซลล์คู่ ลักษณะเหมือนเข็มหรือผลึกของ safranin	กลม ขอบโคโลนีไม่สม่ำเสมอ ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย หรือโค้งขึ้นสูง ขุ่น ด้านบนมีลาย หรือเหมือนเศษขนมปังชิ้นเล็กๆ non-hemolytic
Peptococcus niger	แกรมบวก เซลล์กลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ สี่เซลล์ หรือไม่สม่ำเสมอ	กลม ขอบเรียบ ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย สีดำ ผิวเป็นเงา ขนาดเล็กมาก

14-0992(001-354)editnew130158.indd 214 1/14/58 BE 3:51 PM

ชนิดของแบคทีเรีย	ลักษณะเมื่อย้อมแกรม	ลักษณะโคโลนี
Anaerobic Cocci		
Peptostreptococcus spp.	แกรมบวก เซลล์กลม อยู่เป็นคู่และเป็นเส้นสาย	ขอบเรียบ ผิวโค้งขึ้นเล็กน้อย สีเทาขาวขุ่น
Veillonella parvula	แกรมลบ เซลล์กลม อยู่เป็นคู่สองหรือเป็นสายสั้น ๆ	กลม ขอบเรียบ สีขาวเทา
Anaerobic แกรมบวก spore-forming rods		
Clostridium botulinum	แกรมบวก แท่งกลมตรง อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ สปอร์อยู่ใต้ส่วนปลายเซลล์ (sub-terminal)	กลม โคโลนี อาจไม่สม่ำเสมอ สีขาวเทา ผิวด้าน ให้ β-hemolytic
Clostridium difficile	แกรมบวก แท่งกลมตรง อาจเรียงต่อกันเป็นสายมี 2–6 เซลล์ สปอร์รูปไข่อยู่ใต้ส่วนปลายเซลล์ (oval sub-terminal)	กลม ผิวด้านหรืออาจเป็นเงา แบนหรือโค้งเล็กน้อย สีครีม เหลืองหรือเทา แตกเป็นแขนงคล้ายราก มีกลิ่นคล้ายคอกม้า (horse stable odor)
Clostridium perfringens	แกรมบวก แท่งตรงปลายตัด (box car appearance) มักพบแกรมลบ ปนอยู่ด้วยอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ ไม่พบสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสิ่งตรวจ	กลม เป็นเงา สีเทาหรือเทาเหลือง ให้ double zone β hemolysis บางครั้งพบโคโลนีหยาบเป็นเส้นฝอย lecithinase positive
Clostridium sordellii	แกรมบวก แท่งตรง เซลล์เดี่ยวหรือคู่ สปอร์รูปไข่อยู่ใต้ส่วนปลายเซลล์ พบ free สปอร์จำนวนมาก อยู่เป็นสาย	สีเทาขาว ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ให้ผล indole, lecithinase และ urease บวก
Clostridium ramosum	อาจติดสี แกรมบวก หรือ แกรมลบ แท่งกลมตรง อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มีสปอร์กลมอยู่ส่วนปลายเซลล์	กลม หรือ โคโลนีอาจไม่สม่ำเสมอ โค้งนูนเล็กน้อย สีขาวเทา บางทีโคโลนีหยักปลายแหลม mannitol บวก ไม่เคลื่อนไหว

14-0992(001-354)editnew130158.indd 215 1/14/58 BE 3:51 PM

ชนิดของแบคทีเรีย	ลักษณะเมื่อย้อมแกรม	ลักษณะโคโลนี
Anaerobic แกรมบวก spore-forming rods		
Clostridium septicum	แกรมบวก แต่ถ้าอายุมากอาจติดสีแกรมลบ แท่งกลมตรง หรือโค้ง อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ สปอร์รูปไข่อยู่ใต้ส่วนปลายเซลล์	กลม หรือยกขึ้นเล็กน้อย แผ่โคโลนีอาจไม่สม่ำเสมอ บางทีโคโลนีแตกแขนงคล้ายราก สีเทา ลักษณะโคโลนีคล้าย Medusa heads
Clostridium tetani	แกรมบวก แต่ถ้าอายุมากเกิน 24 ชม.จะติดสีแกรมลบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ สปอร์รูปกลมอยู่ส่วนปลาย คล้ายไม้ตีกลอง หรือไม้เทนนิส	แผ่แบนผิวด้าน โคโลนีอาจไม่สม่ำเสมอ บางทีโคโลนีแตกแขนงคล้ายราก สีเทา ให้ β-hemolysis zone แคบ ๆ

การรายงานผล

กรณี<u>พบ</u> anaerobic bacteria ให้รายงานว่า

"พบ anaerobic bacteria มีคุณสมบัติการติดสีแกรมบวก/ลบ รูปร่างลักษณะของเซลล์และลักษณะของโคโลนี"

กรณี<u>ไม่พบ</u>แบคทีเรียให้รายงานว่า

"ไม่พบเชื้อ anaerobic bacteria"

เอกสารอ้างอิง

1. Dowell VR Jr, Hawkins TM. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. In: CDC Laboratory Manual. US Dept of HEW, PHS, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia. DHEW Publication No (CDC); 1990. p. 87-8272.
2. Holdeman LV, Cato EP, and Moore WEC Editors. Anaerobe laboratory manual. 4thed. Blacksburg, Virginia : Virginia Polytechnic Institute and State University; 1977. p. 1-156.
3. ศิริพรรณ วงศ์วานิช. การตรวจวินิจฉัยเชื้อบักเตรีไร้อากาศในห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานครฯ: Text and Journal Publication; 2538. หน้า 1-52.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 216 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.10 การวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ

สมศักดิ์ เหรียญทอง

เชื้อวัณโรคและเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆจัดอยู่ใน genus *Mycobacterium* ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญร่วมกันคือ acid fastness ที่ทำให้แยกความแตกต่างไปจากแบคทีเรียอื่นๆคือ เป็นเชื้อที่ติดสียาก แต่เมื่อติดสีแล้วก็ล้างออกยากหรือล้างไม่ออกด้วยน้ำยาที่เป็นกรดหรือกรดผสมแอลกอฮอล์ จึงเรียกว่าเชื้อทนกรด (acid fast bacilli หรือ AFB) เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ที่เป็นสาเหตุของวัณโรคปอดในคนมีลักษณะที่ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทำการย้อมเชื้อด้วยสี carbol fuchsin โดยวิธี Ziehl-Neelsen จะเห็นตัวเชื้อติดสีแดง รูปร่างเป็นแท่งเรียวตรงหรือโค้งเล็กน้อย ปลายมน มักอยู่เดี่ยวๆหรือเป็นคู่ และถ้านำส่วนหนึ่งของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา smear และย้อมสีจะเห็นเชื้อรวมเกาะกลุ่มกันเป็นมัดเหมือนฟ่อนหญ้าเรียกลักษณะนี้ว่า cord formation ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในเชื้อวัณโรคเท่านั้น ส่วนเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรคมีชื่อเรียกว่า non-tuberculous mycobacteria (NTM) ซึ่งลักษณะที่ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมสี Ziehl-Neelsen จะเห็นตัวเชื้อติดสีแดง แต่รูปร่างจะมีหลายแบบทั้งที่เป็นแท่งสั้นๆ หรือแท่งยาว หรือยาวเป็นเส้นสาย

สิ่งตรวจที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคปอดคือเสมหะ แต่การกระจายของเชื้อในเสมหะไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นการเลือกเขี่ยเสมหะป้ายบนกระจกสไลด์จึงสำคัญมาก จำเป็นต้องเลือกเขี่ยส่วนที่น่าจะมีเชื้อมากที่สุดมาตรวจคือส่วนที่เป็นก้อนเมือกเหนียว สีขุ่นเข้มคล้ายหนอง การวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นวัณโรคนั้นต้องพบเชื้อจากสิ่งตรวจของผู้ป่วย ซึ่งเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่พบในเสมหะประมาณ 99% จะเป็นเชื้อวัณโรค ดังนั้นการเก็บเสมหะอย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญ การตรวจทางห้องปฏิบัติการทำได้ดังนี้

1. การตรวจหาเชื้อโดยวิธีย้อมสีและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopy)
2. การตรวจหาเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การตรวจหาเชื้อโดยวิธีย้อมสีและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopy)

การตรวจหาเชื้อทนกรด (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) โดยวิธี direct smear ในผู้ที่มีอาการสงสัยวัณโรคปอดคือการไอเรื้อรังเกิน 2 สัปดาห์ และ/หรือมีภาพเอกซเรย์ปอดผิดปกติ ซึ่งนอกจากเพื่อการวินิจฉัยโรคแล้ว ก็เพื่อตรวจหาผู้ป่วยที่อยู่ในระยะแพร่เชื้อด้วย การตรวจหาเชื้อทนกรด (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์นี้ยังเป็นวิธีหลักของการควบคุมวัณโรค ซึ่งสถานบริการสาธารณสุขทุกระดับ

ทั้งโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป รวมถึงโรงพยาบาลชุมชน สามารถให้บริการตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้กับประชาชนผู้มีอาการสงสัยวัณโรคได้ทั่วประเทศ

เหตุผลการส่งเสมหะตรวจ

การควบคุมวัณโรคตามแนวทางขององค์การอนามัยโลกได้กำหนดเหตุผลหรือวัตถุประสงค์ของการส่งเสมหะตรวจทางห้องปฏิบัติการไว้ 2 ประการคือ

1. เพื่อการวินิจฉัยโรคและแบ่งประเภทของคนไข้
2. เพื่อการติดตามผลการรักษา

1. <u>เพื่อการวินิจฉัยโรคและแบ่งประเภทของคนไข้</u>

โดยกำหนดให้ใช้กับผู้ป่วยใหม่ที่ยังไม่ขึ้นทะเบียนส่งรักษา ตรวจเสมหะ 3 ตัวอย่างติดต่อกัน ซึ่งประกอบด้วย spot sputum และ collection sputum นำผลการตรวจที่ได้มาพิจารณาดังนี้

1.1 ผู้ป่วยใหม่เสมหะบวก หมายถึง ผู้ป่วยที่มีผลการตรวจเสมหะพบเชื้ออย่างน้อย 2 ใน 3 ตัวอย่าง หรือพบเชื้อเพียง 1 ตัวอย่าง แต่มีภาพเอกซเรย์ปอดที่แพทย์วินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคและมีอาการรุนแรง

1.2 ผู้ป่วยใหม่เสมหะลบ หมายถึงผู้ป่วยที่มีผลการตรวจเสมหะไม่พบเชื้อทั้ง 3 ตัวอย่าง แต่มีภาพเอกซเรย์ปอดที่แพทย์วินิจฉัยว่าเป็นวัณโรค

2. <u>เพื่อการติดตามผลการรักษา</u>

โดยกำหนดให้ใช้กับผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนรักษาแล้วส่งเสมหะตรวจซึ่งจะเป็น spot sputum หรือ collection sputum ก็ได้ตามระยะเวลาดังนี้ คือ

2.1 เมื่อสิ้นสุดระยะ intensive phase หรือสิ้นสุดเดือนที่ 2 หรือเดือนที่ 3 เพื่อดู conversion rate (อัตราการเปลี่ยนแปลงของเสมหะจากพบเชื้อเป็นไม่พบเชื้อ)

2.2 เมื่อขึ้นเดือนที่ 5 หรือสิ้นสุดเดือนที่ 5 ของการรักษา เพื่อดูว่าการรักษาล้มเหลวหรือไม่ หากตรวจพบเชื้อแสดงว่าการรักษาล้มเหลวต้องเปลี่ยนยาใหม่

2.3 เมื่อสิ้นสุดการรักษาเพื่อดูว่าผู้ป่วยหายหรือไม่ โดยเสมหะจะต้องตรวจไม่พบเชื้อในครั้งนี้

ชนิดของเสมหะและจำนวนครั้งที่ส่งตรวจ

เสมหะที่เก็บจากผู้ป่วยมี 2 ชนิดคือ spot และ collection sputum

spot sputum คือเสมหะที่เก็บทันทีเมื่อผู้ป่วยมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาล และ collection sputum คือเสมหะที่เก็บหลังตื่นนอนตอนเช้าก่อนล้างหน้าแปรงฟัน จะเป็นเสมหะที่ดีในการใช้ตรวจหาเชื้อ เนื่องจากมีการสะสมของเชื้อในหลอดลมตลอดทั้งคืน ผู้ป่วย 1 รายควรเก็บเสมหะส่งตรวจ 3 ตัวอย่างต่างวันกัน และอย่างน้อยต้องมี collection sputum 1 ตัวอย่างดังนี้คือ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 218 1/14/58 BE 3:51 PM

ตัวอย่างที่ 1 เป็นตัวอย่างที่ให้ผู้ป่วยเก็บเสมหะทันที (spot sputum) เมื่อมาพบแพทย์ครั้งแรก

ตัวอย่างที่ 2 เป็นตัวอย่างที่ผู้ป่วยเก็บเสมหะตอนเช้าหลังตื่นนอน (collection sputum)

ตัวอย่างที่ 3 เป็นตัวอย่างที่ให้ผู้ป่วยเก็บเสมหะทันที (spot sputum) เมื่อนำเสมหะตัวอย่างที่ 2 มาส่งหน่วยตรวจ

การป้ายเสมหะบนกระจกสไลด์

ใช้ไม้เขี่ยเสมหะส่วนที่เป็นก้อนเมือกเหนียวสีขุ่นเข้มให้ติดปลายไม้ขึ้นมา ป้ายลงตรงกลางแผ่นกระจกสไลด์ที่ใหม่และสะอาด ละเลงเกลี่ยเสมหะให้เป็นแผ่นบางๆสม่ำเสมอ ไม่บางหรือหนาเกินไปให้ได้ขนาดประมาณ 2x3 cm โดยมีรูปแบบเป็นก้นหอยเล็กๆซ้ำๆต่อเนื่องกัน แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้ง โดยให้ด้านที่ละเลงเสมหะอยู่ด้านบนเพื่อตรึงให้เสมหะติดแน่นกับกระจกสไลด์ เพื่อเวลาย้อมสีจะได้ไม่หลุดออก นำสไลด์ที่ตรึงแล้วนี้ไปย้อมสีตามวิธีต่อไปนี้

- วางเรียงกระจกสไลด์บนคานย้อม เว้นระยะห่างกัน 0.5 - 1 cm
- ราดสี 1% carbol fuchsin ให้ท่วมแผ่นกระจกสไลด์
- ลนไฟใต้สไลด์ให้สีร้อน จนกระทั่งสังเกตเห็นมีไอเกิดขึ้นบนแผ่นสไลด์ (ระวังอย่าให้เดือด) แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 5 นาที
- ล้างด้วยน้ำสะอาด เทน้ำที่ค้างบนสไลด์ออกให้หมด
- ฟอกสีด้วยน้ำยา 3% acid alcohol จนกระทั่งสีแดงของ carbol fuchsin หลุดออกหมด โดยการราดน้ำยา 3% acid alcohol ให้ท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 2 นาที ล้างด้วยน้ำ หากสีแดงยังออกไม่หมดให้ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
- ล้างด้วยน้ำสะอาด เทน้ำที่ค้างบนสไลด์ออกให้หมด
- ย้อมทับโดยการราดด้วยสี 0.3% methylene blue ให้ท่วมสไลด์ แช่ทิ้งไว้ 10 วินาที
- ล้างน้ำให้สะอาดทั้งด้านหน้าและด้านหลังกระจกสไลด์
- นำมาตั้งผึ่งลมให้แห้ง และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้หัว oil immersion objective lens (x 100) จะเห็นตัวเชื้อติดสีแดงบนพื้นสีน้ำเงิน

การตรวจสไลด์ที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจสไลด์ที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ใช้กำลังขยาย x10 ตรวจดูบริเวณที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว ไม่ใช่บริเวณที่มี epithelial cell
- หยด oil immersion ลงบนแผ่นสไลด์ ระวังอย่าให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของอุปกรณ์แตะหรือสัมผัสโดนแผ่นสไลด์
- หมุนหัวเลนซ์กำลังขยาย x100 เข้าแทนที่
- ปรับความคมชัดของภาพ โดยการเลื่อนแผ่นสไลด์ออกห่างจากเลนซ์วัตถุเสมอ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 219 1/14/58 BE 3:51 PM

- อ่านโดยเริ่มจากตรงกลางริมสุดของวงเสมียร์จากซ้ายไปขวา หรือขวาไปซ้าย ภาพเชื้อที่เห็นผ่านเลนซ์กำลังขยาย x100 จะติดสีแดง ลักษณะเป็นแท่งยาวเดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม

หลักเกณฑ์การอ่านและรายงานผลสไลด์ที่ย้อมสีด้วยวิธี Ziehl-Neelsen

สไลด์ที่ตรวจพบเชื้อจำนวนมาก (>10 AFB/วงกล้อง) การรายงานผล “AFB 3+” จะต้องอ่านสไลด์ให้ได้อย่างน้อย 20 วงกล้อง จึงจะรายงานผลได้

สไลด์ที่ตรวจพบเชื้อจำนวนปานกลาง (1-10 AFB/วงกล้อง) การรายงานผล “AFB 2+” จะต้องอ่านสไลด์ให้ได้อย่างน้อย 50 วงกล้อง จึงจะรายงานผลได้

สไลด์ที่ตรวจพบเชื้อจำนวนน้อย (10-99 AFB/100 วงกล้อง) การรายงานผล “AFB 1+” จะต้องอ่านสไลด์ให้ได้อย่างน้อย 100 วงกล้อง จึงจะรายงานผลได้

สไลด์ที่ตรวจพบเชื้อจำนวนน้อยมาก (1-9 AFB/100 วงกล้อง) การรายงานผล “นับจำนวนเชื้อ AFB ที่พบ” จะต้องอ่านสไลด์ให้ได้อย่างน้อย 100 วงกล้อง จึงจะรายงานผลได้

สไลด์ที่ตรวจไม่พบเชื้อ การรายงานผล “Negative” จะต้องอ่านสไลด์ให้ได้อย่างน้อย 100 วงกล้อง จึงจะรายงานผลได้ ซึ่งหมายถึง negative เฉพาะที่อ่านดูใน 100 วงกล้องนี้เท่านั้น ไม่ได้หมายรวมถึงตัวอย่างเสมหะที่นำมาตรวจทั้งหมด

การพบเชื้อตั้งแต่ 1 ตัวขึ้นไป ก็สามารถรายงานว่า “Positive” ได้โดยยึดหลักการอ่านผลข้างต้น และรายงานผลตามตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 5.10-1 แสดงวิธีรายงานผลการตรวจสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ grading วิธี Ziehl-Neelsen

จำนวนเชื้อ AFB	การรายงานผล
0 AFB / 100 วงกล้อง	Negative
1 - 9 AFB / 100 วงกล้อง	นับจำนวน AFB ที่พบ
10 – 99 AFB / 100 วงกล้อง	1+
1 - 10 AFB / วงกล้อง	2+
>10 AFB / วงกล้อง	3+

วิธีการย้อมสีเรืองแสงด้วย auramine O ตามวิธี fluorescent acid-fast staining

- วางเรียงสไลด์บนคานย้อมสี เว้นระยะห่างระหว่างแผ่นสไลด์ 0.5-1 cm
- ราดสี auramine O solution จนท่วมทั้งแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำสะอาด เทน้ำที่ค้างบนแผ่นสไลด์ออกให้หมด
- ฟอกสีด้วย 1% acid alcohol นาน 2 นาที จนกระทั่งสี auramine O หลุดออกหมด

14-0992(001-354)editnew130158.indd 220 1/14/58 BE 3:51 PM

- ล้างออกด้วยน้ำสะอาด เทน้ำที่ค้างบนแผ่นสไลด์ออกให้หมด
- ย้อมทับด้วยน้ำยา 0.5% potassium permanganate นาน 2 นาที
- ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง
- นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (fluorescence microscope) โดยใช้ low power objective lens (x20) จะเห็นตัวเชื้อติดสีเรืองแสงสีเหลืองทองบนพื้นสีดำ

ตารางที่ 5.10-2 แสดงวิธีรายงานผลการตรวจสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงแบบ grading วิธี fluorescent acid-fast staining ด้วย objective lens x20

จำนวนเชื้อ AFB	การรายงานผล
0 AFB / 30 วงกล้อง	Negative
1 - 29 AFB / 30 วงกล้อง	นับจำนวน AFB ที่พบ
>29 AFB / 30 วงกล้อง	1+
1 - 10 AFB / วงกล้อง	2+
>10 AFB / วงกล้อง	3+

การรายงานผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะรายงานได้เพียงว่าพบเชื้อ AFB เท่านั้น และห้องชันสูตรควรจัดทำสมุดทะเบียนการตรวจเสมหะหาเชื้อวัณโรค โดยเฉพาะแยกจากการตรวจสิ่งตรวจอื่นๆ เพื่อเป็นหลักฐานการตรวจ สะดวกในการตรวจสอบ และทำรายงาน การจะรายงานว่าเป็นเชื้อวัณโรค หรือเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ ต้องนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อและทำการทดสอบเพื่อพิสูจน์ยืนยันชนิดต่อไป ในห้องปฏิบัติการที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ การตรวจพบเชื้อทนกรด (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียว ก็สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ แต่จะต้องมีจำนวนเชื้อมากพอถึง 10,000 ตัว/เสมหะ 1 ml จึงจะพบได้โดยวิธีนี้ ความแม่นยำของการตรวจขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ตรวจ การพบเชื้อใน smear แสดงว่าผู้ป่วยเป็นวัณโรคและอยู่ในระยะแพร่เชื้อที่ต้องให้การรักษาทันทีเพื่อตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อ จำนวนเชื้อ AFB ที่พบแสดงถึงความรุนแรงของการติดเชื้อในผู้ป่วย จึงเป็นความสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องอ่านและรายงานสิ่งที่ตรวจพบให้ถูกต้องมากที่สุด

การวินิจฉัยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วัตถุประสงค์ของการทำเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. เพื่อการค้นหาผู้ป่วยจากสิ่งตรวจที่ไม่สามารถตรวจหาด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์ได้
2. เพื่อยืนยันความมีชีวิตของเชื้อวัณโรค
3. เพื่อเพิ่มปริมาณและพิสูจน์ชนิด โดยการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และทางชีวเคมี

14-0992(001-354)editnew130158.indd 221 1/14/58 BE 3:51 PM

4. เพื่อทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ
5. เพื่อเฝ้าระวังการดื้อยาวัณโรคในชุมชน หรือในพื้นที่พิเศษเฉพาะ เช่นในเรือนจำ และบริเวณชายแดน เป็นต้น

การส่งสิ่งตรวจเพาะเชื้อ ให้ส่งในรายต่อไปนี้

1. ในรายที่เป็นผู้ป่วยใหม่
   1.1 เมื่อตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้งขึ้นไป
   1.2 เมื่อสงสัยเชื้อดื้อยา
   1.3 เมื่อมีประวัติสัมผัส หรือใกล้ชิดกับผู้ป่วยดื้อยาหลายขนาน หรือติดเชื้อ HIV
   1.4 เมื่อมีการเฝ้าระวังการดื้อยารักษาวัณโรค
2. ในรายที่กำลังติดตามการรักษา
   2.1 เมื่อสิ้นสุดระยะเข้มข้น (เดือนที่ 2) ตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อ AFB
   2.2 เมื่อสิ้นเดือนที่ 5 หรือในเดือนสุดท้ายของการรักษา เสมหะยังตรวจพบเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์
   2.3 เมื่อจะประเมินว่าผู้ป่วยหายจากการเป็นวัณโรค

อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่นิยมใช้ประกอบด้วย

1. อาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของไข่
   1.1 Lowenstein-Jensen media
   1.2 2% Ogawa media
2. อาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของวุ้น เช่น Middlebrook 7H11
3. อาหารเหลว
   3.1 Middlebrook 7H9
   3.2 BBL MGIT

การเพาะเชื้อวัณโรคจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อ BSC class II ที่มีระบบการดูแลบำรุงรักษาอย่างดี และต้องกำจัดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่ปนเปื้อนมากับสิ่งตรวจก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ เรียกว่าขบวนการ decontamination procedure โดยมากมักจะใช้กับเสมหะ หนอง และอื่นๆ แต่ถ้าเป็นตัวอย่างที่เก็บมาด้วยวิธี aseptic technique เช่น CSF ก็สามารถเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen ได้โดยตรง การการเพาะเลี้ยงเชื้อยังมีประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆได้ และสามารถนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ไปทำทดสอบความไวต่อยาได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้กันมากคือ Lowenstein-Jensen และ 2% Ogawa medium ซึ่งอาหารทั้งสองชนิดนี้จะมีไข่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 222 1/14/58 BE 3:51 PM

แต่ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BBL MGIT ที่ใช้กับเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ Bactec MGIT 960 ที่ตรวจหาการเจริญของเชื้อโดยใช้หลักการของ oxygen consuming ที่สามารถตอบผลที่รวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง แต่มีราคาแพงกว่า

น้ำยาที่ใช้ในการกำจัดเชื้อปนเปื้อน (digestion-decontamination solution)

1. 4% NaOH
2. NALC-2% NaOH (N-acetyl-L-cysteine-2% sodium hydroxide)

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคแบบง่าย (TB simple culture method)

วิธีนี้ใช้ได้ผลดีเฉพาะกับสิ่งตรวจที่ตรวจพบเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น และไม่ต้องใช้เครื่องปั่นตกตะกอน สามารถปฏิบัติได้ดังนี้

1. ถ่ายเสมหะจากถ้วยเก็บเสมหะใส่ในขวดแก้ว McCartney
2. เติมน้ำยา 4% NaOH ลงในขวดบรรจุเสมหะ ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาณเสมหะ ถ้าตัวอย่างเสมหะมีความหนืด เหนียว และความสกปรกมาก ก็ให้เพิ่มสัดส่วนของน้ำยา 4% NaOH เป็น 1:2 ได้
3. ปิดฝาขวดให้แน่น ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. เมื่อครบกำหนดใช้ pasteur pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารแขวนลอยที่เตรียมได้หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% Ogawa 2 ขวดๆละ 100 µl หรือประมาณ 4 หยด
5. นำเข้าตู้อบเชื้ออุณหภูมิ 35-37 ^{o}C นาน 8 สัปดาห์ และนำออกมาอ่านผลทุกสัปดาห์จนมีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นมีลักษณะแห้ง ขรุขระ ขนาด 2-3 mm คล้ายดอกกระหล่ำ เรียกลักษณะแบบนี้ว่า eugonic type แต่ถ้าโคโลนีมีลักษณะกลม แบน เรียบ และขนาด 1-2 mm จะเรียกว่า dysgonic type ซึ่งจะเป็นลักษณะของเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคแบบมาตรฐานบนอาหารแข็ง (TB conventional culture method)

วิธีนี้ใช้ได้กับเสมหะทั้งชนิดพบเชื้อและไม่พบเชื้อ รวมทั้งตัวอย่างอื่นๆ เช่น pus, plural effusion, tissue biopsy, gastric lavage เป็นต้น สำหรับสิ่งตรวจที่เป็นเสมหะสามารถปฏิบัติได้ดังนี้

1. ถ่ายเสมหะจากภาชนะบรรจุใส่ในหลอดปั่น (sterile centrifuge tube) ขนาด 50 ml ปริมาณของเสมหะต้องไม่เกิน 10 ml
2. เติมน้ำยา NALC-2% NaOH ลงในขวดบรรจุเสมหะ ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาณ เสมหะ ปิดฝาหลอดให้แน่นนำไปเขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นานไม่เกิน 30 วินาที
3. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. เปิดฝาหลอด เติมน้ำยา phosphate buffer saline pH 6.8 ให้ถึงระดับ 50 ml

14-0992(001-354)editnew130158.indd 223 1/14/58 BE 3:51 PM

5. นำเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูงปรับอุณหภูมิ (high speed refrigerate centrifuge) ปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งลงในภาชนะเฉพาะด้วยความระมัดระวัง
6. เติม 1 หยดของน้ำยา phosphate buffer saline pH 6.8 ผสมกับตะกอนที่ได้
7. ใช้ pasture pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารแขวนลอยที่เตรียมได้หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen (LJ) 2 ขวดๆละ 100 µl หรือประมาณ 4 หยด
8. นำเข้าตู้อบเชื้ออุณหภูมิ 35-37 ^{o}C นาน 8 สัปดาห์ และนำออกมาอ่านผลทุกสัปดาห์จนพบการเจริญของเชื้อ
9. บันทึกระยะเวลาที่ตรวจพบการเจริญ จำนวน และลักษณะของโคโลนี

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BBL MGIT

1. ถ่ายเสมหะจากถ้วยเก็บเสมหะใส่ในหลอดปั่น (sterile centrifuge tube) ขนาด 50 ml ปริมาณของเสมหะต้องไม่เกิน 10 ml
2. เติมน้ำยา NALC-2% NaOH ลงในขวดบรรจุเสมหะ ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาณเสมหะ ปิดฝาหลอดให้แน่นนำไปเขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นานไม่เกิน 30 วินาที
3. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. เปิดฝาหลอด เติมน้ำยา phosphate buffer saline pH 6.8 ให้ถึงระดับ 50 ml
5. นำเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูงปรับอุณหภูมิ (high speed refrigerate centrifuge) ปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g นาน 20 นาที ในภาชนะปั่นชนิด aerosol free protection
6. ระหว่างที่รอเวลาให้เตรียมเขียนหมายเลขข้างหลอด BBL MGIT tube และเตรียมสารละลาย supplement PANTA โดยดูดสารละลาย supplement ปริมาตร 15 ml ละลายผง PANTA lyophilized เขย่าให้เข้ากัน
7. เมื่อครบเวลา 20 นาที นำหลอดปั่นมาเทส่วนใสทิ้งลงในภาชนะเฉพาะด้วยความระมัดระวัง
8. เติม 1 ml ของน้ำยา phosphate buffer saline pH 6.8 ผสมกับตะกอนที่ได้
9. เติม dissolved supplement PANTA ลงใน BBL MGIT ปริมาตร 0.8 ml แล้วเติม 0.5 ml ของตะกอนที่ได้ ปิดฝาหลอดให้แน่น คว่ำหลอดไปมา 2–3 ครั้ง เช็ดหลอดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
10. นำเข้าเครื่อง Bactec MGIT 960 โดยดึงลิ้นชักตู้ออก แล้วปฏิบัติตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยกดปุ่ม icon บนหน้าจอที่เป็นรูปสัญญาลักษณ์หลอดที่มีลูกศรชี้ลง นำหลอดทดสอบไปผ่านเครื่องสแกน barcode สังเกตช่องในลิ้นชักที่ใส่หลอดทดสอบ คว่ำหลอด 2–3 ครั้ง แล้วใส่หลอดทดสอบในช่องที่มีไฟกระพริบสีเขียว ทำแบบนี้จนครบจำนวนตัวอย่างที่เตรียมไว้
11. ปิดลิ้นชักให้สนิท เครื่อง Bactec MGIT 960 จะตรวจสอบการเจริญของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย บันทึกและจัดพิมพ์รายงาน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 224 1/14/58 BE 3:51 PM

การพิสูจน์ชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย

ตารางที่ 5.10-3 ลักษณะต่างๆที่ใช้สำหรับแยกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ (NTM)

ลักษณะ	*M. tuberculosis*	NTM
1. อัตราการเจริญเติบโต	> 7 วัน	น้อยกว่า หรือมากกว่า 7 วัน
2. อุณหภูมิ	35-37 ^{o}C	25- 45 ^{o}C
3. ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง	แห้ง ขรุขระคล้ายดอกกระหล่ำ	มีทั้งแห้ง ขรุขระ และเรียบ
4. สีของโคโลนี	แบบ eugonic	แบบ dysgonic
5. Niacin test	คล้ายสีฟางหญ้าแห้ง	ครีม เหลือง ส้ม หรือ ชมพู
6. Nitrate reduction test	+	-
7. Catalase 68 ^{o}C test	+	+/ -
8. Cord formation	-	+
9. การเจริญบนอาหาร L-J ที่ผสม	+	-
PNB ความเข้มข้น 500 μg/ml	-	+
10. Immunochromatography Assay (SD-Bioline)	+	-

เมื่อแยกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อ NTM ได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องพิสูจน์ชนิดของเชื้อ NTM โดยทำการทดสอบคุณลักษณะต่างๆ เช่น growth rate, growth at different temperature (25 ^{o}C, 37 ^{o}C, 42 ^{o}C, 45 ^{o}C), pigment in the dark, photoreactivity, nitrate reduction test, catalase 68 ^{o}C, 20 min test, semi-quantitative catalase test, arylsulfatase 3 and 14 days test, Tween 80 hydrolysis 3 and 14 days test, tellurite reduction 3 and 14 days test, iron uptake, growth on L-J contain 5% NaCl เป็นต้น ซึ่งการทดสอบคุณลักษณะต่างๆ เหล่านี้สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการอ้างอิงของกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ ห้องปฏิบัติการของสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยแพทย์ต่างๆ และห้องปฏิบัติการของสถาบันโรคทรวงอก เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจากสิ่งตรวจที่ไม่ใช่เสมหะ

gastric lavage และชิ้นเนื้อ gastric lavage ต้องดำเนินการตรวจภายใน 4 ชม. นับตั้งแต่เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ (biopsy tissue) กรณีเป็นชิ้นเนื้อขนาดใหญ่ ให้ใช้กรรไกร (sterile scissor) ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆใช้ที่บดเชื้อ (sterile tissue grinder) บดเนื้อเยื่อที่ส่งตรวจในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 2 - 5 ml แล้วดำเนินการตรวจสิ่งตรวจทั้งสองชนิดดังนี้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 225 1/14/58 BE 3:51 PM

1. เก็บส่วนใสในหลอดปั่น (centrifuge tube) ขนาด 50 ml ในปริมาตรไม่เกิน 10 ml
2. ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 x g นาน 15 นาที ในภาชนะปั่นชนิด aerosol free protection
3. หลังจากนั้น เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2-5 ml
4. เติมสารละลาย NALC-2 NaOH ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน และเอียงหลอดไปมาเพื่อให้สารละลาย NALC-2% NaOH สัมผัสภายในหลอดและฝาหลอดให้มากที่สุด
5. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
6. เติมสารละลาย phosphate buffer saline pH 6.8 ให้ถึงระดับ 50 ml
7. ปิดฝาหลอดให้แน่น นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 x g นาน 15 นาที ในภาชนะปั่นชนิด aerosol free protection อีกครั้งหนึ่ง
8. เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1-2 ml ผสมให้เข้ากันดีด้วย pasture pipette 1 ml แล้วเจือจาง 1:10 เพื่อลดความเป็นพิษของสารละลาย NALC-2% NaOH
9. Inoculate 0.1 ml ของสารละลายที่เจือจางและไม่เจือจางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen media และ Middlebrook 7H11
10. นำเข้าตู้อบเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C
11. อ่านผลทุกสัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ถ้าพบการเจริญของเชื้อให้ทำการส่งต่อเพื่อวินิจฉัยเชื้อและทดสอบความไวต่อไป

เลือด (blood)

1. นำเลือด 20 ml ใส่ลงในอาหารเหลวชนิด Middlebrook 7H9 20 ml
2. นำเข้าตู้อบเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C เขย่าด้วยมือทุกวันๆละครั้ง
3. ทำ smear ย้อมสีทุกสัปดาห์
4. ถ้าพบเชื้อ AFB นำอาหารเหลวนั้นมา inoculate ลงบนอาหารแข็ง L-J 2 ขวด
5. นำเข้าตู้อบเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C
6. อ่านผลทุกสัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์

การเตรียมสีย้อมและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วิธีเตรียมน้ำยาสีย้อมแบบ Ziehl-Neelsen

ก. <u>น้ำยา 1% carbol fuchsin</u>

- basic fuchsin powder 1.0 g
- ethanol 95% 10.0 ml

(ละลายส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกัน).....(A)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 226 1/14/58 BE 3:51 PM

- phenol crystals 5.0 g
- distilled water 95.0 ml

(ละลายผลึก phenol ก่อนเติมน้ำกลั่น).....(B)

ผสม 90 ml ของสารละลาย (B) ในสารละลาย (A)

น้ำยาสีย้อม carbol fuchsin ที่ได้นี้ต้องกรองหลังจากเตรียมเสร็จ และเก็บในที่มืด ซึ่งสีย้อมที่เตรียมแต่ละครั้งควรใช้ให้หมดภายใน 6 เดือน

ข. <u>น้ำยาฟอกสี 3% acid alcohol</u>

- hydrochloric acid (conc.) 97.0 ml
- ethanol 95% 3.0 ml

(ผสมสารทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน)

ค. <u>สีย้อมทับ 0.3% methylene blue</u>

- methylene blue 0.3 g
- distilled water 100.0 ml

(ผสมสารทั้งสองจนละลายเข้ากันดี)

ตารางที่ 5.10-4 วิธีเตรียมอาหารไข่ทั้งชนิด Lowenstein-Jensen (LJ) และ 2% Ogawa medium

ส่วนประกอบ	Lowenstein-Jensen (LJ)	2% Ogawa medium
1. monopotassium dihydrogen phosphate	0.4 g	2 g
2. magnesium sulfate	0.04 g	-
3. magnesium citrate	0.1 g	0.1 g
4. asparagine	0.6 g	-
5. sodium glutamate	-	0.5 g
6. glycerol	2 ml	4 ml
7. distilled water	100 ml	100 ml
8. 2% malachite green solution	3.3 ml	4 ml
9. homogenized whole eggs	167 ml	200 ml

วิธีเตรียมอาหาร Lowenstein-Jensen (LJ) หรือ 2% Ogawa medium

ละลายส่วนประกอบอันดับที่ 1-7 (แล้วแต่ชนิดของอาหารที่จะเตรียม) นำเข้า autoclave ปล่อยทิ้งไว้ไว้ให้เย็นแล้วนำมาเติม 2% malachite green solution ตามส่วน นำสารละลายนี้มาผสมกับ homogenized whole

14-0992(001-354)editnew130158.indd 227 1/14/58 BE 3:51 PM

eggs เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แบ่งใส่ขวด McCartney ขวดละ 7 ml นำเข้าตู้นึ่งอาหารระบบไอน้ำร้อน (inspissator) ที่อุณหภูมิ 85-90 ^{o}C ในสภาพเอียง (slant) เป็นเวลา 45 นาที เพื่อทำให้ไข่สุก อาหารจะแข็งตามต้องการ จากนั้นนำเข้าตู้อบ 35-37 ^{o}C นาน 48 ชม. เพื่อเช็ค sterility แล้วนำไปเก็บในถุงพลาสติก มัดปากถุงให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

วิธีเตรียม Homogenized whole eggs

นำไข่ไก่สดประมาณ 10 ฟอง มาล้างน้ำและขัดผิวไข่ให้สะอาดด้วย 70% alcohol ปล่อยให้แห้ง แล้วเช็ดด้วยน้ำยา 70% alcohol นำมาวางเรียงบนภาชนะที่สะอาด ตอกไข่ใส่ภาชนะเช่น plate หรือ beaker เพื่อตรวจสอบคุณภาพของไข่ จากนั้นนำไปเทลงในเครื่องปั่น (blender) ตีไข่ให้เข้ากัน เทใส่กระบอกตวง โดยผ่านผ้ากรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาณที่ต้องการ

วิธีเตรียม 2% Malachite green solution

ชั่งผง malachite green 2 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

เอกสารอ้างอิง

1. Kent PT and Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory Center for Disease Control, Atlanta, Georgia; 1985.
2. Kudoh S and Kudoh T. Simple Technique for Culturing Tubercle Bacilli. Bull WHO; 1974. 51: p. 7-12.
3. Smithwick RW. Laboratory Manual for Acid fast Microscopy. 2nd ed. Center for Disease Control, Atlanta, Georgia. 1976.
4. The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network. IUATLD; 1998.
5. Vestal AL. Procedure for the Isolation and Identification of Mycobacterium. Department of health Education and welfare, UPH , Atlanta, Georgia. 1977.
6. ชัยเวช นุชประยูร. วัณโรคปฏิบัติการ. สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพมหานครฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2529.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 228 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 5
การวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มต่างๆและเชื้อราที่พบบ่อย
5.11 การวินิจฉัยเชื้อราที่พบบ่อย

ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน

โรคติดเชื้อราส่วนใหญ่ มีสาเหตุมาจากราฉวยโอกาส ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยต่อมพาราไทรอยด์ทำงานได้น้อย ผู้ป่วยที่ได้รับยาเป็นพิษต่อเซลล์ ยากดภูมิคุ้มกัน สารต้านจุลชีพ ฮอร์โมนจะทำให้ราฉวยโอกาสเพิ่มจำนวนมากขึ้นและเกิดโรครุนแรงขึ้น ตัวอย่างราฉวยโอกาสประเภทราสาย (molds) ได้แก่ *Aspergillus*, *Mucor* และ *Rhizopus* ซึ่งพบได้ไม่บ่อยนัก ประเภทยีสต์ได้แก่ *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* ราบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นราสองรูป (dimorphic fungi) คือมีรูปร่างแบบราสายเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิไม่เกิน 35 ^{o}C และเปลี่ยนรูปร่างเป็นยีสต์เมื่อเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 35 ^{o}C ตัวอย่างรา 2 รูปที่พบบ่อยในประเทศไทย คือ *Penicillium marneffei* และ *Histoplasma capsulatum* โรคติดเชื้อราที่พบบ่อยในผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วย immunocompromised อื่นๆ ได้แก่ candidiasis, cryptococcosis, penicillosis marneffei, และ histoplasmosis

1. การวินิจฉัย *Candida albicans* ก่อโรค candidiasis

หลักการ การตรวจสดสิ่งตรวจในสารละลาย potassium hydroxide (KOH) 10-30% หรือการย้อมแกรมจะทำให้เห็นลักษณะรูปร่างของ *Candida albicans* หรือ *Candida* species อื่นๆ ได้ชัดเจน และโคโลนีที่เพาะได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาทดสอบการสร้าง germ tube และการสร้างสีโคโลนีบน CHROMagar *Candida* เพื่อวินิจฉัยและรายงานผล *Candida* แบบ presumptive identification *Candida* species อื่นๆที่ก่อโรคได้นอกจาก *C. albicans* ได้แก่ *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* และ *C. glabrata* เป็นต้น

สิ่งตรวจ เยื่อบุจากช่องปาก เยื่อบุจากหลอดอาหารหรือลำไส้ เยื่อบุจากช่องคลอด เยื่อบุหัวใจ ผิวหนัง เล็บ ปัสสาวะ สิ่งตรวจจากระบบหายใจ เลือด

วิธีปฏิบัติงาน

1. การตรวจสิ่งตรวจโดยตรงทางกล้องจุลทรรศน์

   1.1 การตรวจสดด้วยสารละลาย KOH

   1.2 การย้อมแกรม (วิธีการเช่นเดียวกับการย้อมแกรมแบคทีเรีย)

2 . การเพาะเชื้อ

เพาะสิ่งตรวจบน SDA หรือ BA สิ่งตรวจจากตำแหน่งที่มีเชื้อประจำถิ่น (non sterile site) เพาะบน SDA ที่เติม chloramphenicol อบเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 ^{o}C นาน 24-48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ทางกล้องจุลทรรศน์โดยทำ mounting slide ด้วย lactophenol aniline blue

3. การสร้าง germ tube

ใช้ loop ตักเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบน SDA 24 ชม. เพาะลงในซีรัมของคนปรกติปริมาตร 0.5 ml อบที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เวลา 2.5-3 ชม. หยดเชื้อในซีรัมลงบนแผ่นสไลด์แก้วและปิดทับด้วย cover glass ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

เชื้อควบคุมคุณภาพ positive control *Candida albicans* DMST 15313

negative control *Candida tropicalis* DMST 15195

4. การสร้างสีโคโลนีบน CHROMagar *Candida*

ใช้ลูปตักเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบน SDA 24 ชม. streak บน CHROMagar *Candida* plate และ streak เชื้อควบคุมคุณภาพลงบน plate เดียวกัน อบเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิ 35-37 ^{o}C นาน 24-48 ชม.

เชื้อควบคุมคุณภาพ *Candida albicans* DMST 15313…….....โคโลนีสีเขียว (bright green)

Candida tropicalis DMST15195…….....โคโลนีสีน้ำเงินอมเขียว (dull greenish blue)

Candida krusei DMST 15317…….....โคโลนีสีชมพู (rose-colored)

การอ่านผล

1. การตรวจสดด้วยสารละลาย KOH พบเซลล์ยีสต์เป็นสีใสๆไม่มีสี เซลล์ยีสต์รูปไข่ budding yeast อยู่ร่วมกับ pseudohyphae
2. การย้อมสีแกรม เซลล์ยีสต์ติดสีแกรมบวก ลักษณะรูปร่างเช่นเดียวกับการตรวจสดด้วยสารละลาย KOH การตรวจสดสิ่งตรวจผิวหนังและเล็บทางกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Candida* ใช้การตรวจสดด้วยสารละลาย KOH เหมาะสมกว่าการย้อมสีแกรม
3. การเพาะเชื้อ ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA คล้ายครีมสีขาวผิวหน้าเรียบเป็นมัน ตรงกลางนูน ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ยีสต์รูปไข่หรือรูปกลม และเซลล์ยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 230 1/14/58 BE 3:51 PM

(budding yeast cell) อาจพบลักษณะของ short pseudohyphae

4. การสร้าง germ tube ลักษณะของ germ tube เป็นสายรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสม่ำเสมอ ไม่มีรอยคอดตรงจุดที่งอกออกจากเซลล์ยีสต์ เชื้อที่ germ tube positive นอกจาก *C. albicans* แล้วยังมี *C. dubliniensis* ระยะเวลาที่อ่านผลต้องอยู่ในช่วง 2.5-3 ชม. เนื่องจาก *Candida* species อื่นๆเช่น *C. tropicalis* สามารถสร้าง germ tube ได้หลังจากอบเพาะเชื้อไว้เกิน 3 ชม. และ *C. albicans* ทุก isolate ไม่ได้สร้าง germ tube ได้ทั้งหมด ดังนั้น การรายงานผล germ tube positive ของ *C. albicans* จัดเป็น presumptive identification
5. การสร้างสีโคโลนีบน CHROMagar *Candida* สีโคโลนีของยีสต์แต่ละ species แสดงในตาราง 5.11-1 การสร้างสีโคโลนีบน CHROMagar จัดเป็น presumptive identification

ตารางที่ 5.11-1 สีโคโลนีของ *Candida* species บน CHROMagar *Candida*

***Candida* species**	**สีโคโลนีบน CHROMagar *Candida***
Candida albicans	bright green/ dark green
Candida dubliniensis	dark green/ bright green
Candida tropicalis	dull greenish blue
Candida krusei	rose -colored
Candida parapsilosis	pale purplish pink
Candida glabrata	pale purplish pink
Candida guilliermondii	Light purple
Candida famata	dull greenish blue/ bright green

การรายงานผล

การตรวจสดด้วยสารละลาย KOH และการย้อมสีแกรม เมื่อได้ผลการตรวจสดหรือการย้อมสีแกรม รายงานให้แพทย์ทราบทันที

รายงานผลการตรวจสด “Hyaline oval yeast cells, budding yeast cells with pseudohyphae suggestive for candidiasis”

รายงานผลการย้อมแกรม “Gram positive oval yeast cells, budding yeast cells with pseudohyphae suggestive for candidiasis”

การเพาะเชื้อ รายงานผลจากการทดสอบ germ tube และ การสร้างสีโคโลนีบน CHROMagar *Candida* ซึ่งเป็น presumptive identification

14-0992(001-354)editnew130158.indd 231 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้อ *C. albicans* สีโคโลนีเป็นสีเขียวบน CHROMagar *Candida* มีบาง isolate สีโคโลนีจะเป็นสีเขียวเข้ม เชื้อ *C. dubliniensis* ส่วนใหญ่สีโคโลนีจะเป็นสีเขียวเข้ม เป็นสิ่งตรวจจาก sterile site เช่นเลือด การพบเชื้อ *C. dubliniensis* ในกระแสเลือดพบได้น้อย (rare cases)

รายงานผล การเพาะเชื้อ "*Candida albicans*, presumptive identification base on germ tube positive and bright green colony on CHROMagar *Candida*."

2. การวินิจฉัย *Cryptococcus neoformans* ก่อโรค cryptococcosis

หลักการ *Cryptococcus neoformans* เป็นยีสต์ที่สร้างแคปซูลล้อมรอบเซลล์ การตรวจสดสิ่งตรวจที่สงสัยโรค cryptococcosis ในอินเดียอิงค์ (india ink preparation) ทำให้เห็นเซลล์ยีสต์และแคปซูลที่ล้อมรอบได้ชัดเจน เชื้อที่เพาะได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อตรวจดูแคปซูลด้วยอินเดียอิงค์แล้วทำการทดสอบ urease เชื้อมีคุณสมบัติในการ hydrolyse urea เป็น ammoniaได้ และนำผลการทดสอบมาประกอบในการวินิจฉัย

สิ่งตรวจ น้ำไขสันหลัง เลือด ไขกระดูก เสมหะ น้ำล้างปอด ผิวหนัง ปัสสาวะ ต่อมน้ำเหลือง ม้าม ตับ ไต ต่อมหมวกไต ต่อมลูกหมากและต่อมไทรอยด์เป็นต้น

วิธีปฏิบัติงาน

1. การตรวจสดสิ่งตรวจใน india ink ทางกล้องจุลทรรศน์

2. การเพาะเชื้อ สิ่งตรวจที่เป็นของเหลวใช้ปริมาตรประมาณ 0.5 ml หยดบน SDA plate ถ้าเป็นชิ้นเนื้อใช้กรรไกรปราศจากเชื้อตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และใช้คีมคีบปราศจากเชื้อคีบชิ้นเนื้อแตะลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลากเป็นแนวซิกแซกตัดกัน 2 ระนาบตลอดทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ อบเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 ^{o}C ตรวจดูการเจริญของเชื้อเมื่อครบ 48 ชม. ถ้ายังไม่พบการเจริญของเชื้อ ให้เก็บไว้ 2 สัปดาห์จึงทิ้ง plate รายงานผล "no fungal growth"

3. การทดสอบ urease ใช้ลูปตักโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่จะทดสอบ streak ลงบนผิวหน้าของ Christensen's urea agar slant อบเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 ^{o}C และ 37 ^{o}C เวลา 24-48 ชม.

เชื้อควบคุมคุณภาพ positive control *Cryptococcus neoformans* DMST 15319

negative control *Candida albicans* DMST 15313

14-0992(001-354)editnew130158.indd 232 1/14/58 BE 3:51 PM

การอ่านผล

การตรวจสดสิ่งตรวจในอินเดียอิงค์ทางกล้องจุลทรรศน์ (ดูในบทที่3)

การเพาะเชื้อ ลักษณะโคโลนีบน SDA มีลักษณะเปียกเป็นมูก ผิวหน้าเรียบเป็นมัน โคโลนีสีขาวและสีเข้มขึ้นเป็นสีแทนเมื่ออายุมากขึ้น บางครั้งจะพบลักษณะโคโลนีที่แห้งแสดงว่าเชื้อไม่สร้างแคปซูลหรือสร้างได้บางมาก ลักษณะของเชื้อจากการตรวจสดในอินเดียอิงค์ทางกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นรูปร่างยีสต์และแคปซูลแบบเดียวกันแต่แคปซูลบางกว่าที่ตรวจพบในสิ่งตรวจ

การทดสอบ urease สีของ urea agar เปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มทั้ง 2 อุณหภูมิ แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบสามารถ hydrolyse urea เป็น ammonia ได้ อ่านผล urease บวก สีของ urea agar ไม่เปลี่ยนสีอ่านผล urease ลบ ทั้งนี้เปรียบเทียบผลกับ positive และ negative control เชื้อยีสต์ที่สร้างแคปซูลและให้ผล urease บวก นอกเหนือจาก *Cryptococcus neoformans* ได้แก่ *Cryptococcus* spp. และ *Rhodotorula* spp. แต่มีรายงานการก่อโรคในคนค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ *Cryptococcus neoformans*

การรายงานผล

การตรวจสดสิ่งตรวจใน india ink ตรวจพบ encapsulated yeast cells

รายงานผล "Yeast, presumptive *Cryptococcus neoformans* based on capsule production."

หรือ "presence of budding, encapsulated yeast cells presumptive diagnosis of cryptococcosis"

การเพาะเชื้อ รายงานผล "*Cryptococcus neoformans*, presumptive identification base on budding, encapsulated yeast cells and urease positive of primary culture."

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับ rapid identification ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans*

การวินิจฉัยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* นั้นอย่างน้อยห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปต้องทำการเพาะเชื้อ ทำ india ink preparation และทดสอบ urease ของ primary culture แต่ถ้าเพิ่มการทดสอบ phenoloxidase จะทำให้การรายงานผลมีความแม่นยำถูกต้องสูงขึ้น ห้องปฏิบัติการแห่งใดสนใจทดสอบเพิ่มเติมขอให้ติดต่อสอบถามได้ที่ ฝ่ายเชื้อราวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โทร. 02 5899850 ต่อ 99405 โทรสาร 02 5915449

การทดสอบ phenoloxidase

Phenoloxidase activity เป็นคุณสมบัติเฉพาะของ *Cryptococcus neoformans* ที่แตกต่างจาก *Cryptococcus* spp. และยีสต์ก่อโรคอื่นๆ คือเชื้อสร้างเอนไซม์ phenoloxidase ได้ (*Cryptococcus* บาง species สร้างเอนไซม์ phenoloxidase ได้แต่สร้างได้ในปริมาณที่น้อยกว่า *C. neoformans*) เอนไซม์ชนิดนี้เป็นตัวเร่งในการ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 233 1/14/58 BE 3:51 PM

เปลี่ยน substrate ที่เป็นสารพวก phenolic compounds เช่น caffeic acid, DOPA (dihydroxyphenylalanine) ให้เป็น melanin like pigment การทดสอบ phenoloxidase สามารถทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม phenolic compounds เพื่อใช้ทดสอบ phenoloxidase activity ได้แก่ DOPA medium modified caffeic acid-cornmeal agar และ sunflower seed agar โคโลนีของเชื้อ *C. neoformans* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม phenolic compounds จะเป็นโคโลนี สีน้ำตาลอ่านผลเป็น phenoloxidase บวก หรือทำการทดสอบโดยใช้แผ่นทดสอบ phenoloxidase ฝ่ายเชื้อราวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำการทดสอบ phenoloxidase โดยใช้ sunflower seed agar (ระยะเวลาที่อ่านผลภายใน 24 ชม.) และแผ่นทดสอบ phenoloxidase โดย phenolic compounds ที่ใช้คือ สารสกัดจากเมล็ดทานตะวัน (ผลการทดสอบ เห็นสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้มที่ภายใน 4 ชม.) sunflower seed agar ราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศ ซึ่งห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วประเทศสามารถนำไปใช้ทดสอบเพิ่มได้โดยจะไม่กระทบกับราคาค่าตรวจเดิมแต่เพิ่มคุณค่าและคุณภาพของการบริการให้แก่แพทย์ผู้ให้การรักษารวมทั้งผู้ป่วยด้วย

3. การวินิจฉัย *Penicillium marneffei* ก่อโรค penicillosis marneffei

หลักการ *Penicillium marneffei* เป็นรา 2 รูป (dimorphic fungi) ซึ่งโดยปรกติเมื่อเจริญอยู่ในดินหรือในสิ่งแวดล้อมอื่นๆที่อุณหภูมิไม่เกิน 30 ^{o}C จะมีลักษณะรูปร่างเป็น mold phase เมื่อถูกสูดดมเข้าไปในปอด อุณหภูมิเปลี่ยนเป็น 37 ^{o}C เชื้อจะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่โดยเปลี่ยนรูปร่างเป็นยีสต์ในภาวะที่ก่อโรค การตรวจสิ่งตรวจโดยตรงโดยการย้อมสีแกรม ย้อมสี Giemsa หรือย้อมสี Wright และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทำให้เห็นยีสต์เซลล์ของ *P. marneffei* ได้ชัดเจนและแยกออกได้ง่ายขึ้น การทดสอบรา 2 รูป เชื้อเปลี่ยนจาก mold phase ที่ 25-30 ^{o}C เป็น yeast phase ที่ 37 ^{o}C ได้

สิ่งตรวจ เลือด ไขกระดูก ผิวหนัง น้ำคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ ตับ ต่อมน้ำเหลือง อุจจาระ น้ำไขสันหลัง กระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก และม้าม เป็นต้น

วิธีปฏิบัติงาน

1. การตรวจสิ่งตรวจโดยตรงทางกล้องจุลทรรศน์ การย้อมสีแกรม การย้อมสี Giemsa การย้อมสี Wright ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 X และ 100 X อย่างน้อยที่สุดขอให้ทำการย้อมสีแกรม

2. การเพาะเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อใช้ SDA และ BHI agar อบเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 ^{o}C ตรวจดูการเจริญของเชื้อเมื่อครบ 48 ชม. และตรวจดูการเจริญทุก 2-3 วัน รอจนเชื้อเจริญ ส่งต่อตรวจวินิจฉัย/ ยืนยัน (definitive identification) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

14-0992(001-354)editnew130158.indd 234 1/14/58 BE 3:51 PM

การอ่านผล

การย้อมแกรมเซลล์ยีสต์ติดสีแกรมบวก การย้อมสี Giemsa และการย้อมสี Wright ติดสีไม่สม่ำเสมอ ส่วนของ polar ติดสีน้ำเงินเข้ม จะเห็นนิวเคลียส 2 นิวเคลียสชัดเจนในเซลล์ยีสต์ ส่วนของผนังตัดขวางเซลล์ไม่ติดสี

เซลล์ยีสต์ของ *P. marneffei* ตรวจพบได้ทั้งภายในและภายนอก histiocytes รูปร่างและขนาดของเซลล์ยีสต์มีความหลากหลาย ได้แก่ เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ขนาดประมาณ 2-3 μm เซลล์รูปยาวรี (elongated cells) ขนาดประมาณ 2-3 X 2-6.5 μm ตรวจพบภายใน histiocytes เซลล์ยีสต์ภายนอก histiocytes พบเซลล์รูปยาวคล้ายไส้กรอก (sausage-shaped) ความยาว 8-13 μm อาจพบเซลล์ยีสต์ที่เป็นท่อนโค้งงอคล้ายกล้วยหอม เซลล์ยีสต์ของ *P. marneffei* เพิ่มจำนวนโดยการสร้างผนังตัดขวางเซลล์ (binary fission) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *P. marneffei*

รูปร่างและขนาดของเซลล์ยีสต์ที่อยู่ภายใน histiocytes มีความแตกต่างกับเซลล์ยีสต์ที่อยู่ภายนอก histiocytes เซลล์ยีสต์ที่อยู่ภายใน histiocytes จะมีรูปร่างที่เหมือนกันทุกเซลล์และขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะเป็นรูปกลม รูปไข่ หรือรูปยาวรี ซึ่งจะใกล้เคียงกับเซลล์ยีสต์ *Histoplasma capsulatum* ทำให้เกิดการสับสนได้ต้องตรวจหาลักษณะเฉพาะ binary fission yeasts ของ *P. marneffei* และ budding yeasts ของ *H. capsulatum* ให้พบ ในกรณีที่ตรวจไม่พบลักษณะเฉพาะของเชื้อ ต้องดำเนินการเพาะเชื้อเพื่อช่วยในการวินิจฉัย

การเพาะเชื้อ โคโลนีมีลักษณะเป็นจุด คล้ายขี้ผึ้งสีแดง จะปรากฏให้เห็นหลังจากเพาะเชื้อได้ 2 วัน ต่อมาสร้างเส้นใยเป็นปุยสีขาวและสร้างสารสีแดงละลายในเนื้อวุ้น ผิวหน้าโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นผงละเอียดสีชมพูเมื่อเชื้อมีอายุการเจริญได้ 7 วัน การสร้างสารสีแดงละลายในเนื้อวุ้นของ *Penicillium marneffei* บางครั้งอาจสร้างได้น้อยมากหรือไม่สร้างเลยบน primary culture, SDA, Lowenstein-Jensen medium หรือ CA ซึ่งอาจทำให้เข้าใจผิดได้ว่าเป็น contaminated mold ได้

การรายงานผล

รายงานผลการตรวจสิ่งตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ “Binary fission yeasts, *Penicillium marneffei*”

กรณีที่ไม่พบลักษณะเฉพาะรายงานผล “Round yeast cells, oval yeast cell suggesting *Penicillium marneffei* or *Histoplasma capsulatum*”

14-0992(001-354)editnew130158.indd 235 1/14/58 BE 3:51 PM

4. การวินิจฉัย *Histoplasma capsulatum* ก่อโรค histoplasmosis

หลักการ การย้อมแกรม การย้อมสี Giemsa การย้อมสี Wright จะทำให้ เซลล์ยีสต์ของ *Histoplasma capsulatum* มีการติดสีที่จำเพาะ ทำให้ตรวจพบและแยกออกจากลักษณะอื่นๆในสิ่งตรวจได้ง่ายขึ้น การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อเพื่อตรวจดูลักษณะโคโลนีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะแสดงลักษณะของ *H. capsulatum* ซึ่งคล้อยตามกับลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์ที่ตรวจพบจากการย้อมสีสิ่งตรวจโดยตรง *H. capsulatum* เป็นรา 2 รูปเช่นเดียวกับ *P. marneffei* เชื้อเปลี่ยนจาก mold phase ที่ 25-30 ^{o}C เป็น yeast phase ที่ 37 ^{o}C ได้

สิ่งตรวจ ไขกระดูก เลือด น้ำคัดหลั่งจากระบบหายใจ ต่อมน้ำเหลือง ตับ แผลที่ผิวหนัง น้ำไขสันหลัง และสมอง

วิธีปฏิบัติงาน

1. การตรวจสิ่งตรวจโดยตรงทางกล้องจุลทรรศน์ การย้อมแกรม การย้อมสี Giemsa การย้อมสี Wright ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 X และ 100 X อย่างน้อยที่สุดขอให้ทำการย้อมแกรม

2. การเพาะเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อใช้ SDA, BHA agar อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 ^{o}C ตรวจดูการเจริญของเชื้อหลังจากเพาะเชื้อได้ 3 วัน และหลังจากนั้นตรวจดูการเจริญทุก 2-3 วัน รอจนเชื้อเจริญส่งต่อตรวจวินิจฉัย/ยืนยัน (definitive identification) ที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การอ่านผล

การย้อมแกรม เซลล์ยีสต์ติดสีแกรมบวก การย้อมสี Giemsa และการย้อมสี Wright การติดสีไม่สม่ำเสมอ ส่วนของ cytoplasm ติดสีน้ำเงินอ่อน และส่วนของ polar ติดสีน้ำเงินเข้ม

ตรวจพบเซลล์ยีสต์รูปกลม รูปไข่ มี budding cells ขนาดของเซลล์ประมาณ 3-5 μm เซลล์ยีสต์มีขนาดที่เท่ากันและรูปร่างสม่ำเสมอเหมือนกันเจริญอยู่ภายใน macrophage ขนาดใหญ่หรือ giant cells

การเพาะเชื้อ *H. capsulatum* มีการเจริญเติบโตช้า หลังจากเพาะเชื้อได้ประมาณ 3 สัปดาห์ จะพบลักษณะโคโลนีเป็นปุยนุ่นสีขาวและสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น ทางด้านล่างของโคโลนีเป็นสีน้ำตาล

การรายงานผล รายงานผลการตรวจสิ่งตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ "Round or oval yeast cells, budding yeast cells suggesting *Histoplasma capsulatum*."

14-0992(001-354)editnew130158.indd 236 1/14/58 BE 3:51 PM

เอกสารอ้างอิง

1. Engelkirk PG and Engelkirk DJ. Introduction to Medical Mycology. In: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p.489-506.
2. Engelkirk PG and Engelkirk DJ. Laboratory Diagnosis of Selected Fungal Infections. In : Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases : Essentials of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins;2008. p. 507-540.
3. Hazen KC and Howell SA. Mycology and Antifungal Susceptibility Testing. In: Garcia LS. editor in chief. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Vol 2. Washington, DC: ASM Press; 2007 Update. p. 8.3.1.1- 8.6.10.
4. Howell SA, and Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editor. Manual of Clinical Microbiology 10th ed. Vol 2. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 1793-821.
5. Peng CF, Lee KM, Lee SH. Characterization of Two Chromogenic Media of *Candida* ID2 and CHROMagar *Candida* for Preliminary Identification of Yeasts. J Biomed Lab Sci 2007;19(2): 63-69.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 237 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 6
การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ

สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์
วันทนา ปวีณกิตติพร
สุรางค์ เดชศิริเลิศ

หลักการ

การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ เป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อบ่งชี้ว่าแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากสิ่งตรวจไวหรือดื้อต่อสารต้านจุลชีพใด เพื่อเป็นแนวทางสำหรับแพทย์ในการเลือกใช้สารต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการทดสอบมีหลายรูปแบบทั้งการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ นอกจากนี้ยังมีการตรวจหาเอนไซม์ที่ทำลายสารต้านจุลชีพซึ่งผู้ปฏิบัติงานควรพิจารณาเลือกใช้การทดสอบที่เหมาะสม ให้ทำการทดสอบกับเชื้อก่อโรคที่ไม่สามารถคาดได้ว่าไวหรือดื้อต่อยา ในกรณีติดเชื้อแบคทีเรียที่ทราบแน่ชัดว่าไวต่อยาที่ใช้รักษาเสมอ ก็ไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบกับยาชนิดนั้น ได้แก่ *Streptococcus pyogenes* ไวต่อ penicillin เป็นต้น ยกเว้นทดสอบเพื่อติดตามเฝ้าระวังการดื้อยา หรือกรณีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อดื้อยาที่อุบัติใหม่

วิธีการทดสอบ

การทดสอบและการแปลผลของวิธีในบทนี้ ดำเนินตามมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) สำหรับเชื้อแบคทีเรียเจริญเร็ว (rapid growing bacteria) เชื้อแบคทีเรียเจริญยากและช้า (fastidious bacteria) และแบคทีเรียไร้อากาศ (anaerobes) หาก CLSI มีหลักฐานทางวิชาการใหม่ที่จะต้องปรับปรุงวิธีการหรือการแปลผลจะมีการแจ้งการปรับปรุงในเอกสารที่พิมพ์ใหม่ทุกปี ดังนั้นเป็นความรับผิดชอบของผู้ปฏิบัติงานที่จะต้องติดตามเอกสารของ CLSI ให้เป็นฉบับปัจจุบันเสมอ วิธีการทดสอบที่ทำในห้องปฏิบัติการมีดังนี้

1. Disk diffusion หรือ Kirby Bauer's method
2. MIC determination by broth dilution
3. β-lactamase tests
4. Extended-spectrum β-lactamases (ESBL) detection
5. Carbapenemases (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) detection
6. Screen test to detect high-level aminoglycoside resistance in enterococci

7 Agar screening to detect vancomycin resistance in enterococci

8 Agar screening to detect vancomycin resistance in staphylococci

9 D-test

10 E-test

1. วิธีการทดสอบความไวโดยใช้แผ่นยา (วิธี Disk diffusion หรือ Kirby Bauer's)

1.1 หลักการ วิธี Disk susceptibility เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ รายงานผลไว ค่อนข้างไว หรือดื้อต่อสารต้านจุลชีพ เป็นวิธีทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคชนิดเจริญไว (rapidly-growing aerobic pathogens) และชนิดเจริญยากบางชนิด (fastidious bacteria) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ CLSI ฉบับ M02-A10 และ M45-A2 ตามลำดับ ทดสอบโดยป้ายเชื้อแบคทีเรียบนผิวของวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผ่นยาทดสอบ อบเชื้อตามเวลาที่กำหนด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญรอบแผ่นสารต้านจุลชีพเทียบกับตารางแปลผลตามมาตรฐานของ CLSI (M100-S24)

1.2 วิธีปฏิบัติ

เลือกโคโลนีของเชื้อที่จะทดสอบ และเขี่ยเชื้อที่ขึ้นบนอาหารที่ไม่ใช่ selective media เพื่อทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

1.2.1 ชนิดของแบคทีเรียที่ทดสอบได้ด้วยวิธี Disk diffusion

แบคทีเรียก่อโรคชนิดเจริญไว (rapidly-growing aerobic pathogens) ดังนี้ แบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus* spp., *Aeromonas* spp. (*A. caviae* complex, *A. hydrophila* complex และ *A. veronii* complex), *Plesiomonas shigelloides*, *Moraxella catarrhalis*, *Pasteurella* spp. และ *Vibrio* spp.

แบคทีเรียก่อโรคชนิดเจริญช้าหรือเจริญยากบางชนิด (fastidious bacteria) ดังนี้ *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* (ยกเว้นทดสอบต่อยาต่อไปนี้ด้วยวิธี dilution test : penicillin, ampicillin, cefotaxime หรือ ceftriaxone, meropenem และ azithromycin), *Campylobacter jejuni/coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. β-hemolytic group (ยกเว้นทดสอบยาต่อไปนี้ด้วยวิธี dilution test : penicillin หรือ ampicillin, cefepime หรือ cefotaxime หรือ cetriaxone, doripenem, ertapenem, meropenem และ daptomycin), *Streptococcus* spp. viridans group (ยกเว้นทดสอบยาต่อไปนี้ด้วยวิธี dilution test: penicillin หรือ ampicillin, doripenem, ertapenem, meropenem และ daptomycin)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 240 1/14/58 BE 3:51 PM

1.2.2 การเลือกชนิดของแผ่นสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ในการทดสอบประจำวันและการรายงาน

การเลือกชนิดของสารต้านจุลชีพที่เหมาะสม ต้องเกิดจากการพิจารณาร่วมกันระหว่างห้องปฏิบัติการ องค์กรแพทย์ และเภสัชกรรม ตารางที่ 6.1 เป็นยาทดสอบที่แนะนำสำหรับเชื้อแต่ละกลุ่ม

- **ยากลุ่ม Primary** เป็นยาที่ใช้ทดสอบในงานประจำวันเป็นลำดับแรก และรายงานทุกยาที่ทดสอบ
- **ยากลุ่ม Supplement 1** เป็นยาที่ทดสอบเป็นลำดับแรกและเลือกรายงาน เฉพาะกรณีเชื้อที่ดื้อยา primary ที่เป็นยา class เดียวกัน หรือในกรณีผู้ป่วยแพ้ยาในกลุ่ม Primary หรือรายงานเพื่อช่วยในการควบคุมการระบาด
- **ยากลุ่ม Supplement 2** เป็นยาที่ควรทดสอบเพิ่มเติมสำหรับเชื้อที่ไวต่อยาใน primary/supplement 1 น้อยลง (reduce susceptibility) หรือ เชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance)
- **ยากลุ่ม Urine** ประกอบด้วยสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบเบื้องต้นสำหรับเชื้อก่อโรคที่แยกได้จากทางเดินปัสสาวะ

ตารางที่ 6-1 การเลือกสารต้านจุลชีพที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

Microorganisms	Primary	Supplement 1	Supplement 2	Urine
Staphylococcus spp.	Cefoxitin [1-1] Erythromycin [1-2] Clindamycin [1-2, 1-3] Gentamicin Trimethoprim-sulfamethoxazole	Teicoplanin Ciprofloxacin or Levofloxacin Fosfomycin Fusidic acid MIC of Vancomycin [1-4]	Linezolid Moxifloxacin	Norfloxacin Nitrofurantoin
S. pneumoniae	Penicillin [2-1] (Oxacillin disk) Erythromycin Clindamycin [1-3] Trimethoprim-sulfamethoxazole	Vancomycin Levofloxacin MIC of Penicillin [2-1, 2-2] MIC of Cefotaxime [2-1, 2-2] or Ceftriaxone [2-1, 2-2] or Meropenem [2-1, 2-2]	Linezolid Rifampin Tigecycline	
β-haemolytic *Streptococcus* [3-1]	Penicillin [3-2] Erythromycin [1-.2] Clindamycin [1.2, 1-3]	Levofloxacin Cefotaxime or Ceftriaxone		
Streptococcus spp. viridans group [4-1]	MIC of Penicillin [4-2]	Cefotaxime Ceftriaxone Erythromycin Clindamycin [1-2, 1-3] Vancomycin		

14-0992(001-354)editnew130158.indd 241 1/14/58 BE 3:51 PM

Microorganisms	Primary	Supplement 1	Supplement 2	Urine
Enterococcus spp. [5-1]	Penicillin [5.2] or Ampicillin Gentamicin [5-3] (120 µg) β-lactamase test	Vancomycin [5-4] or Teicoplanin Streptomycin [5-3] (300 µg)	Linezolid Tigecycline	Norfloxacin or Ciprofloxacin or Levofloxacin Nitrofurantoin
Enterobacteriaceae [6-1]	Ampicillin Amoxicillin-clavulanic acid Ampicillin-sulbactam Cefoxitin Gentamicin Trimethoprim-sulfamethoxazole Ciprofloxacin	Cefuroxime Cefotaxime [6-2] or Ceftriaxone [6-2] Cefoperazone Cefepime Amikacin Ertapenem [6-3] Imipenem [6-3] Meropenem [6-3] Doripenem		Norfloxacin Ofloxacin Nitrofurantoin
Shigella spp. [7]	Ampicillin Trimethoprim-sulfamethoxazole Ciprofloxacin or Norfloxacin			
Salmonella spp. [7]	Ampicillin Trimethoprim-sulfamethoxazole Nalidixic acid [8-1] Ciprofloxacin or Norfloxacin [8-1]	Cefotaxime or Ceftriaxone [8-2] Levofloxacin [8-1] MIC of Ciprofloxacin		
Vibrio cholerae	Ampicillin Tetracycline Trimethoprim-sulfamethoxazole Ciprofloxacin			
Vibrio spp.*	Cefotaxime Ceftazidime Tetracycline Fluoroquinolone			
Aeromonas spp.*	Amoxicillin-clavulanic acid 3rd or 4th generation cephalosporins Fluoroquinolones Trimethoprim-sulfamethoxazole			
Campylobacter jejuni/coli *	Erythromycin Ciprofloxacin			

14-0992(001-354)editnew130158.indd 242 1/14/58 BE 3:51 PM

Microorganisms	Primary	Supplement 1	Supplement 2	Urine
Pasteurella spp.*	Penicillins β-lactam/ β-lactamase inhibitor combinations Cephalosporins Tetracyclines Macrolides Fluoroquinolones Trimethoprim-sulfamethoxazole	Piperacillin-tazobactam Cefoperazone-sulbactam [9] Cefepime or Cefpirome Imipenem Meropenem Doripenem	Netilmicin	Norfloxacin Ofloxacin
Pseudomonas aeruginosa	Ceftazidime Gentamicin Ciprofloxacin Amikacin			
Acinetobacter spp.	Cefotaxime or Ceftriaxone Ceftazidime Gentamicin Ciprofloxacin Ampicillin-sulbactam	Piperacillin-tazobactam Trimethoprim-sulfamethoxazole Cefoperazone-sulbactam [9] Cefepime or Cefpirome Imipenem Meropenem Amikacin MIC of Colistin[10]	Doxycycline Tigecycline MIC of Netilmicin	
Stenotrophomonas maltophilia	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Levofloxacin		
Burkholderia pseudomallei	MIC of Trimethoprim-sulfamethoxazole MIC of Amoxicillin-clavulanic acid MIC of Ceftazidime MIC of Imipenem MIC of Tetracycline or Doxycycline			
Burkholderia cepacia	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Ceftazidime Meropenem		
Haemophilus influenzae [11-1] (CSF isolate)	Ampicillin (β-lactamase test) [11-2]	Cefotaxime or Cefriaxone Meropenem		
Haemophilus influenzae [11-1] (respiratory isolate) and *H. parainfluenzae* [11-1] (respiratory isolate)	Ampicillin (β-lactamase test) [11-2] Amoxicillin-clavulanic acid or Ampicillin-sulbactam Trimethoprim-sulfamethoxazole	Azithromycin or Clarithromycin Ciprofloxacin or Levofloxacin or Moxifloxacin	Meropenem	

บทที่ 6

14-0992(001-354)editnew130158.indd 243 1/14/58 BE 3:51 PM

Microorganisms	Primary	Supplement 1	Supplement 2	Urine
Neisseria meningitidis	Cefotaxime or Ceftriaxone Meropenem MIC of Penicillin	(Only for prophylaxis: Azithromycin Trimethoprim- sulfamethoxazole Rifampin Ciprofloxacin)	Nalidixic acid [12]	
Moraxella catarrhalis	β-lactamase test Amoxicillin-clavulanic acid MIC of Cefaclor or Cefuroxime Trimethoprim- sulfamethoxazole			

Primary = ยาที่ควรทดสอบเป็นลำดับแรก และ รายงานทุกยาที่ทดสอบ

Supplement 1 = ยาที่ควรทดสอบเป็นลำดับแรกและเลือกรายงาน เฉพาะกรณีเชื้อที่ดื้อยา primary ที่เป็นยา class เดียวกัน

Supplement 2 = ยาที่ควรทดสอบเพิ่มเติมสำหรับเชื้อที่ reduce susceptibility ต่อยาใน primary/ supplement 1 หรือ เชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multidrug resistance)

คำอธิบายตารางที่ 6-1 :

1-1 . การทดสอบ oxacillin หรือ methicillin resistance ของ *Staphylococcus* spp. ให้ทดสอบด้วย แผ่นยา cefoxitin (ห้ามใช้แผ่นยา oxacillin)

1-2. การทดสอบหาการดื้อยา clindamycin ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของยา erythromycin สามารถทำโดยการวางแผ่นยา erythromycin ใกล้กับแผ่นยา clindamycin (ระยะห่างจากขอบถึงขอบ 15-20 mm สำหรับการทดสอบเชื้อ staphylococci และ 12 mm สำหรับ β-haemolytic streptococci) เชื้อที่ให้ inhibition zone ของ clindamycin ด้านที่ติดกับ erythromycin แบนแคบลง มองเห็นเป็นตัวอักษร D คือเชื้อที่เกิดการดื้อ clindamycin แบบเหนี่ยวนำ (inducible clindamycin resistance) ให้รายงานว่า ดื้อ clindamycin ถึงแม้ว่าผลการทดสอบไวต่อแผ่นยา clindamycin

1-3. ไม่รายงานผลการทดสอบ clindamycin ต่อเชื้อ staphylococci, β-haemolytic streptococci และ *Streptococcus* spp. viridans group ที่พบในระบบทางเดินปัสสาวะ

1-4. ควรทดสอบหา MIC ของยา vancomycin ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้จาก sterile site หากต้องการทดสอบจาก specimen อื่น อาจพิจารณาเป็นรายๆไป

14-0992(001-354)editnew130158.indd 244 1/14/58 BE 3:51 PM

2-1. หากเชื้อ *S. pneumoniae* จาก sterile site ที่ให้ inhibition zone ต่อ oxacillin (1 μg) ≤ 19 mm ให้ทดสอบและรายงานผล MIC ต่อ penicillin และ cefotaxime หรือ ceftriaxone เสมอ

2-2. เชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จาก CSF ให้ทดสอบและรายงานผล MIC ต่อ penicillin และ cefotaxime หรือ ceftriaxone หรือ meropenem รวมทั้งทดสอบและรายงานผล MIC หรือ disk diffusion ต่อยา vancomycin ด้วย

3-1. β-haemolytic *Streptococcus* spp. ในที่นี้หมายถึง β-haemolytic *Streptococcus* group B (*S. agalactiae*) และ β-haemolytic *Streptococcus* ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ ใน group A (*S. pyogenes*), C, G

3-2. ในต่างประเทศยังไม่มีรายงานการดื้อ penicillin ของเชื้อ β-haemolytic *Streptococcus* หากพบว่าเชื้อนี้มีการดื้อ penicillin จากการทดสอบโดยวิธี disk diffusion ให้ทำการทดสอบชนิดเชื้อซ้ำ และทดสอบความไวโดยหา MIC หรือส่งเชื้อทดสอบยืนยันไปยังกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

4-1. *Streptococcus* spp. viridans group ในที่นี้หมายถึงเชื้อ *Streptococcus* spp.ที่อยู่ในกลุ่ม *S. mutans* group, *S. salivarius* group, *S. bovis* group, *S. anginosus* group (ชื่อเดิม "*S. milleri*" group) และ *S. mitis* group รวมถึง β-haemolytic *Streptococcus* spp. ที่มีนิคมขนาดเล็กได้แก่ group A, C, F หรือ G

4-2. ทดสอบหา MIC ของ penicillin ต่อ *Streptococcus* spp. viridans group ที่แยกได้จาก sterile site

5-1. *Enterococcus* spp. ไม่ควรทดสอบความไวต่อยาในกลุ่ม cephalosporins, aminoglycosides (ยกเว้น high-level), clindamycin และ trimethoprim-sulfamethoxazole เพราะผลในหลอดทดลองไม่สอดคล้องกับผลการรักษา

5-2. ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *Enterococcus* spp. ต่อ penicillin สามารถพยากรณ์ความไวของเชื้อนี้ต่อยา ampicillin ได้ด้วย

5-3. การทดสอบความไวของ *Enterococcus* ต่อยากลุ่ม aminoglycosides ให้ใช้ยาชนิดที่มีความเข้มข้นสูง (high level) ได้แก่ gentamicin 120 μg และ streptomycin 300 μg หากแปลผลได้ดื้อยา หมายถึงยาที่ทดสอบไม่เสริมฤทธิ์กับยากลุ่ม cell wall-active (ได้แก่ ampicillin, penicillin, vancomycin หากแปลผลไวต่อยา หมายถึงยาที่ทดสอบเสริมฤทธิ์กับยากลุ่ม cell wall-active และหากแปลผลเป็น intermediate ไม่สามารถสรุปได้ ต้องทำการทดสอบด้วยวิธี MIC

5-4. *Enterococcus* spp. ที่ให้ผล vancomycin intermediate หรือ resistant ให้ทดสอบยืนยันด้วยการทำ vancomycin agar screen plate โดยใช้ BHI agar ที่เติม vancomycin 6 μg/ml หรือหา MIC ต่อ vancomycin

6-1. CLSI ได้ปรับมาตรฐานการแปลผลของ inhibition zone และ MIC breakpoints ของ cefazolin, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime และ aztreonam ตามผลการรักษาด้วยยาขนาด 2 g ทุก 8 ชม., 1 g ทุก 24 ชม., 1 g ทุก 8 ชม., 1 g ทุก 8 ชม., 1 g ทุก 8 ชม. ตามลำดับ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 245 1/14/58 BE 3:51 PM

การอ่าน การแปล และรายงานผลการทดสอบความไวของยากลุ่ม cephalosporins (cefazolin, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime) และ aztreonam ต่อเชื้อ *Enterobacteriaceae* กรณีใช้ตามข้อกำหนดของ CLSI ฉบับ M100-S21 ปี 2011 รายงานผลตามที่ได้จริง ควรทดสอบและรายงานการสร้าง ESBL เพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

6-2. *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. และ *Serratia* spp. อาจเปลี่ยนจากไวต่อยา 3rd generation cephalosporins เป็นดื้อภายใน 3 หรือ 4 วัน หลังการรักษาดังนั้นจึงควรทำการทดสอบความไวของเชื้อกลุ่มนี้ต่อยาดังกล่าวซ้ำ

6-3. ควรทดสอบความไวของเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ต่อยา ertapenem, imipenem และ meropenem พร้อมกันเสมอเพื่อเฝ้าระวังเชื้อดื้อยากลุ่ม carbapenem resistance *Enterobacteriaceae* (CRE)

7. ห้ามทดสอบความไวของเชื้อ *Shigella* spp. และ *Salmonella* spp. ต่อยากลุ่ม 1st และ 2nd cephalosporins, cephamycins และ aminoglycosides เนื่องจากผลการทดสอบไม่สอดคล้องกับผลการรักษา

8-1. ทดสอบ nalidixic acid เฉพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างนอกลำไส้ (extraintestinal *Salmonella*) เท่านั้นหากพบว่าดื้อยา nalidixic acid แต่ไวต่อยากลุ่ม fluoroquinolone ต้องรายงานว่า "Extraintestinal isolates of *Salmonella* may not be eradicated by fluoroquinolone treatment"

8-2. ทดสอบความไวและรายงานผล 3rd generation cephalosporins เฉพาะ *Salmonella* spp. ที่พบนอกลำไส้ เท่านั้น

9. เนื่องจาก CLSI มิได้กำหนด interpretation break point สำหรับยา cefoperazone-sulbactam ต่อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter* spp. จึงให้ใช้ break point ของยาดังกล่าวสำหรับเชื้อ *Enterobacteriaceae*

10. การหา MIC of colistin สำหรับ *Acinetobacter* spp. ควรทดสอบด้วยวิธี agar หรือ broth dilution การทดสอบด้วยวิธี E-test อาจให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับการรักษา

11-1. *Haemophilus* spp. ต้องใช้ *Haemophilus* test medium (HTM) ในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

11-2. การทดสอบ β-lactamase เป็นวิธีที่รวดเร็วและถูกต้องสำหรับการตรวจหา TEM-type β-lactamase ของเชื้อ *Haemophilus* spp. เมื่อพบว่า β-lactamase บวกให้รายงานดื้อ ampicillin และ amoxicillin (พบ *H. influenzae* ที่ไม่สร้าง β-lactamase แต่ดื้อ ampicillin จำนวนน้อยมาก)

12. ทดสอบ nalidixic acid ต่อ *N. meningitidis* เพื่อบ่งชี้ว่าเชื้อมีความไวต่อ fluoroquinolone ลดลงหากพบว่า inhibition zone ≤ 25 mm

หมายเหตุ เชื้อแกรมลบรูปแท่งกลุ่ม non-fermentative ตัวอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* และ *B. cepacia* ต้องใช้วิธี MIC เท่านั้น เนื่องจากไม่มีค่าแปลผลการทดสอบโดยวิธี disk diffusion

14-0992(001-354)editnew130158.indd 246 1/14/58 BE 3:51 PM

1.2.3 แผ่นสารต้านจุลชีพ

ภาชนะที่บรรจุหลอดแผ่นยาต้องเป็นภาชนะที่มีฝาปิดสนิทกันความชื้นได้ และมีสารดูดความชื้น ตรวจสอบคุณสมบัติสารดูดความชื้นและควรเปลี่ยนใหม่เมื่อสีเปลี่ยน เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 ^{o}C เก็บแผ่นยาที่เป็น stock ในตู้แช่แข็ง -14 ^{o}C หรือต่ำกว่า สำหรับแผ่นยาในกลุ่ม β-lactam ให้ใส่ในภาชนะที่ปิดผนึกและเก็บไว้ในตู้แช่แข็งโดยแบ่งจำนวนน้อยเก็บในตู้เย็นสำหรับใช้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ยาอื่นที่ไม่คงตัว (เช่น imipenem, cefaclor และยาที่มี clavulanic acid ผสมด้วย) จะต้องเก็บในตู้เย็นแช่แข็งจนกว่าจะนำมาใช้ และแผ่นยาที่ใช้ทดสอบต้องเป็นแผ่นยาที่ยังไม่หมดอายุเท่านั้น

ก่อนทำการทดสอบควรนำภาชนะที่บรรจุแผ่นยาออกจากตู้เย็นหรือตู้แช่แข็ง วางที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 ชม. ก่อนเปิดใช้งาน เพื่อปรับอุณหภูมิภายในภาชนะให้เท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนเปิด เป็นการป้องกันความชื้นที่จะเกิดจากการควบแน่นเมื่ออากาศอุ่นกระทบแผ่นยาเย็นที่อยู่ในภาชนะ

1.2.4 อาหารเพาะเชื้อ

การเตรียม Mueller-Hinton agar (MHA) ดูรายละเอียดที่ภาคผนวก สำหรับเชื้อชนิด aerobic และ facultative anaerobic ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตดีบน MHA ได้แก่ *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, viridans streptococci และ β-hemolytic streptococci ต้องการ supplement หรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น และจะต้องใช้วิธีการทดสอบดังตารางที่ 6-3

1.2.5 การเตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นมาตรฐาน

การเตรียมเชื้อทดสอบมี 2 วิธีคือ วิธีเตรียมเชื้อจากการเพาะ (growth method) และวิธีเตรียมเชื้อจากโคโลนีโดยตรง (direct colony suspension method)

1.2.5.1 วิธีเตรียมเชื้อจากการเพาะ (growth method) วิธีนี้เป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่ง สำหรับเชื้อเจริญง่าย (ยกเว้น staphylococci) โดยเฉพาะในกรณีที่เชื้อที่ต้องการทดสอบมีอายุมากเกินไป (>24 ชม.) นอกจากนั้นเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับเชื้อที่ละลายในอาหารเหลวแล้วได้ความขุ่นไม่สม่ำเสมอ

(1) เขี่ยส่วนบนของโคโลนีเดี่ยว ที่มีลักษณะเหมือนกัน 3-5 โคโลนี ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เช่น TSB 4-5 ml

(2) อบที่ 35 ± 2 ^{o}C 2-6 ชม. ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland (1-2 x 10^{8} CFU/ml) โดยใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว วัดความขุ่นด้วยเครื่องมือวัดแสง หรือดูด้วยตาในที่ที่มีแสงสว่างเพียงพอ โดยมีแผ่นกระดาษซึ่งมีพื้นเป็นสีขาวและมีเส้นสีดำวางไว้ด้านหลัง

1.2.5.2 วิธีเตรียมเชื้อจากโคโลนีโดยตรง (direct colony suspension method) เป็นวิธีที่สะดวก ใช้ได้กับเชื้อเกือบทุกชนิด เป็นวิธีที่แนะนำสำหรับเชื้อเจริญยากได้แก่ *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* และ streptococci รวมทั้ง staphylococci ที่ดื้อ methicillin หรือ oxacillin

14-0992(001-354)editnew130158.indd 247 1/14/58 BE 3:51 PM

(1) เขี่ยส่วนบนของโคโลนีเดี่ยวอายุ 18-24 ชม.ใส่ในน้ำเกลือ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

(2) ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland (1-2 x 10^8 CFU/ml) โดยใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว วัดความขุ่นด้วยเครื่องมือวัดแสง หรือดูด้วยตาในที่ที่มีแสงสว่างเพียงพอ โดยมีแผ่นกระดาษซึ่งมีพื้นเป็นสีขาว และมีเส้นสีดำวางไว้ด้านหลัง

1.2.6 ขั้นตอนการทดสอบความไวของเชื้อชนิดเจริญไวต่อยาโดยวิธี Disk diffusion Test

1.2.6.1 การเพาะเชื้อลงบนจานทดสอบ

(1) ภายใน 15 นาที ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว กดด้านข้างของหลอดเหนือระดับน้ำให้หมาดๆ

(2) ป้ายเชื้อลงบน MHA ที่ผิวหน้าแห้งแล้ว 3 ระนาบ โดยหมุนจานไป 60 องศา ขั้นสุดท้ายให้วนไม้พันสำลีรอบขอบวุ้น

(3) อาจเปิดฝาจานไว้ได้ 3-5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที เพื่อลดความชื้นที่มีมากเกินไป

1.2.6.2 การวางแผ่นยาลงบนจานที่ป้ายเชื้อแล้ว

(1) วางแผ่นยาลงบนอาหารหลังป้ายเชื้อไม่เกิน 15 นาที ควรให้จุดกลางของแผ่นยาแต่ละแผ่นอยู่ห่างกันอย่างน้อย 24 mm กดแผ่นยาให้แนบกับผิวหน้า วางแผ่นยาไม่เกิน 12 แผ่นบนจานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 mm หรือไม่เกิน 5 แผ่นบนจานขนาด 100 mm ห้ามย้ายที่แผ่นยาหลังวางลงบนอาหารแล้วเนื่องจากยากระจายลงในอาหารได้ทันที ไม่ควรวางแผ่นยาใกล้ขอบจานอาหารจนเกินไปเพราะ inhibition zone ของยาจะไม่ครบวง

(2) หลังจากวางแผ่นยา นำไปใส่ในตู้อบเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C ภายใน 15 นาที (ที่อุณหภูมิมากกว่า 35 °C จะไม่สามารถตรวจหา MRSA ได้) กรณีเชื้อเจริญยากอบในบรรยากาศ CO_2

1.2.6.3 การอ่านและการแปลผล

(1) อ่านผลหลังจากอบเชื้อ 16-18 ชม. สำหรับเชื้อเจริญไว ยกเว้น *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp. และ *Stenotrophomonas maltophilia* ต้องอบ 20-24 ชม. สำหรับเชื้อเจริญยากต้องอบให้ครบ 24 ชม. ยกเว้น *Haemophilus* spp. อบเชื้อ 16-18 ชม. ให้วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ zone ที่มีการยับยั้งเชื้ออย่างสมบูรณ์ (โดยดูด้วยตาเปล่า)

(2) การวัด zone ให้วัดเป็น mm โดยใช้ calipers หรือไม้บรรทัดวางบนด้านหลังของจานทดสอบ โดยถือจานในระยะเหนือพื้น 2-3 นิ้ว นอกจากนี้มีข้อยกเว้นดังนี้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 248 1/14/58 BE 3:51 PM

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือด ให้เปิดฝาจานทดสอบไว้และวัด zone จากด้านบนของอาหารโดยมีแสงส่องด้านหน้า (reflected light)
- การตรวจหา methicillin resistance ของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ให้อบเชื้อไว้นาน 24 ชม.
- การตรวจหา vancomycin ของเชื้อ *Enterococcus* spp. ให้อบเชื้อไว้นาน 24 ชม.
- ถ้าใช้แผ่นยา linezolid ทดสอบเชื้อ *Staphylococcus* spp. ให้อ่าน inhibition zone ด้วยไฟส่องหลังจาน (transmitted light)

(3) ขอบของ zone จะกำหนดจากบริเวณที่ไม่มีเชื้อโดยดูด้วยตาเปล่า ถ้าใช้แว่นขยายเห็นมีเชื้อขึ้นเป็นโคโลนีเล็กที่ริม zone ถือว่าไม่มีเชื้อ อย่างไรก็ตาม

- ถ้ามีโคโลนีเกิดขึ้นอย่างชัดเจนใน inhibition zone ควรทำการทดสอบใหม่ ถ้ายังมีโคโลนีขึ้นอย่างชัดเจนใน zone อีก ให้วัดความกว้างของ zone ด้านในตรงบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น
- เชื้อในกลุ่ม *Proteus* spp. อาจจะแผ่ปกคลุมบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งรอบแผ่นยา ให้วัด inhibition zone ที่เห็นขอบชัดโดยไม่สนใจเชื้อที่แผ่บาง ๆ (swarm) ภายใน inhibition zone
- ในการทดสอบเชื้อ streptococci ที่ให้ hemolysis ให้วัด zone ตรงที่เชื้อเริ่มไม่ขึ้น ไม่ใช่ zone ที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง
- ในการทดสอบ trimethoprim และ sulfonamides ให้วัด inhibition zone ที่เห็นขอบค่อนข้างชัดโดยไม่สนใจเชื้อที่ขึ้นเล็กน้อย (≤ 20%) ภายใน inhibition zone

(4) การแปลผลความกว้างของ zone ยับยั้งเชื้อให้ ดูในตารางที่ 2A ถึง ตารางที่ 2I ใน CLSI M100-S24 ให้รายงานเป็น S (susceptible), I (intermedite) หรือ R (resistant) ต่อยาที่ใช้ทดสอบ ยาบางชนิดรายงานได้เพียง susceptible หรือ nonsusceptible เนื่องจากมีข้อมูลค่า breakpoint เฉพาะ susceptible เท่านั้นเพราะยังไม่มีการดื้อยามาก่อนหรือมีเชื้อที่ดื้อยาน้อยมาก ในการบันทึกผลการทดสอบควรบันทึกขนาด inhibition zone ด้วยเพื่อเป็นข้อมูลใช้วิเคราะห์แนวโน้มการดื้อยา

14-0992(001-354)editnew130158.indd 249 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-2 สรุปย่อการทดสอบความไวของเชื้อชนิดเจริญไวต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion test

Organism	Medium	0.5 McFarland Inoculum	Incubation	Incubation Time	Comments/Modifications
Enterobacteriaceae	MHA	**DCS** ใน MHB หรือ saline, **GM:** TSB, 2-6 ชม	35 ± 2 °C; ambient air	16 - 18 ชม.	ESBL production, Carbapenemase production
Pseudomonas aeruginosa	MHA	**DCS** ใน MHB หรือ saline, **GM:** TSB, 2-6 ชม.	35 ± 2 °C; ambient air	16 - 18 ชม.	
Acinetobacter spp.	MHA	**DCS** ใน MHB หรือ saline, **GM:** TSB, 2-6 ชม.	35 ± 2 °C; ambient air	20 - 24 ชม.	
Burkholderia cepacia	MHA	**DCS** ใน MHB หรือ saline, **GM:** TSB, 2-6 ชม.	35 ± 2 °C; ambient air	20 - 24 ชม.	
Stenotrophomonas maltophilia	MHA	**DCS** ใน MHB หรือ saline, **GM:** TSB, 2-6 ชม.	35 ± 2 °C; ambient air	20 - 24 ชม.	
Staphylococcus spp.	MHA	**DCS** ใน MHB หรือใน saline	35 ± 2 °C; ambient air (การทดสอบที่อุณหภูมิ > 35 °C อาจตรวจไม่พบ MRSA)	16 – 18 ชม.; 24 ชม.สำหรับ *S. aureus* ต่อยา oxacillin; 24 ชม. สำหรับ staphylococci ทุก species ต่อยา vancomycin; 24 ชม. สำหรับ coagulase-negative staphylococci ต่อยา cefoxitin	β-lactamase test, D-test (inducible clindamycin resistance) Examine oxacillin, vancomycin, and linezolid zones carefully with transmitted light for small colonies or haze inside the zone of inhibition; any growth = resistance. Vancomycin disk diffusion testing is not recommended for coagulase-negative staphylococci.
Aeromonas spp. & *Plesiomonas shigelloides*	MHA	**DCS** ใน MHB หรือ saline จากเชื้อที่ขึ้นบน nonselective medium eg. BA นาน 18-24 ชม.	35 °C	16-18 ชม.	
Moraxella catarrhalis	MHA	**DCS**	5% CO_2	20-24 ชม.	β-lactamase test
Pasteurella spp.	MHA	**DCS**	16-18 ชม.		

*DCS = direct colony suspension ใน MHB หรือ saline จากเชื้อที่ขึ้นบน nonselective medium eg. BA,

GM = growth method, MRS = methicillin-resistant staphylococci.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 250 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-3 สรุปย่อการทดสอบความไวของเชื้อ fastidious แบคทีเรีย ต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion test

Organism	Medium	0.5 McFarland Inoculum	Incubation	Incubation Time	Comments/Modifications
Enterococcus spp.	MHA	Direct colony suspension ใน MHB หรือใน saline, หรือวิธี growth method	35 ± 2 °C; ambient air	16-18 ชม. ; 24 ชม. สำหรับ vancomycin	Examine vancomycin zones carefully with transmitted light for small colonies or haze inside the zone of inhibition; any growth= resistance.
Haemophilus influenzae, *Haemophilus parainfluenzae*		Direct colony suspension ใน MHB หรือใน saline (โดยใช้เชื้อที่อบนาน 20-24 ชม. บน CA)	35 ± 2 °C; 5% CO_2	16-18 ชม.	β-lactamase test, Test a maximum of 9 disks on a 150 mm plate and 4 disks on a 100 mm plate
Neisseria gonorrhoeae	GC agar base with 1% defined supplement	Direct colony suspension ใน MHB or 0.9% phosphate buffered saline, pH 7.0, (โดยใช้เชื้อที่อบไว้นาน 20-24 ชม. บน CA อบที่ 5% CO_2)	36 ± 1 °C (ห้ามเกิน 37 °C); 5% CO_2	20-24 ชม.	Test a maximum of 9 disks on a 150 mm plate and 4 disks on a 100 mm plate For some agents, eg, fluoroquinolones or cephalosporins, only 2 to 3 disks may be tested per plate.
Streptococcus pneumoniae	MHA with BA	Direct colony suspension ใน MHB หรือใน saline (โดยใช้เชื้อที่อบไว้นาน 18-20 ชม. บน BA)	35 ± 2 °C; 5% CO_2	20 - 24 ชม.	Test a maximum of 9 disks on a 150 mm late and 4 disks on a 100 mm plate. Measure the zone of growth inhibition, not the zone of inhibition of hemolysis.
Streptococcus spp.	MHA with BA	Direct colony suspension ใน MHB หรือใน saline	35 ± 2 °C; 5% CO_2	20 - 24 ชม.	D-test (β-streptococci) Test a maximum of 9 disks on a 150 mm plate and 4 disks on a 100 mm plate Measure the zone of growth inhibition, not the zone of inhibition of hemolysis.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 251 1/14/58 BE 3:51 PM

Organism	Medium	0.5 McFarland Inoculum	Incubation	Incubation Time	Comments/Modifications
Neisseria meningitidis	MHA with BA	Direct colony suspension ใน MHB หรือใน saline (โดยใช้เชื้อที่อบไว้นาน 20-24 ชม. CA plate อบที่ 5% CO_2)	35 ± 2 °C; 5% CO_2	20-24 ชม.	Test a maximum of 5 disks on a 150 mm plate and 2 disks on a 100 mm plate Caution: Perform all testing in a BSC.
Campylobacter jejuni/ coli	BMHA	DCS	36-37 °C or 42 °C 10% CO_2, 5% O_2, 85% N_2	48 ชม. 24 ชม.	

1.3 การควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

จุดมุ่งหมายของการควบคุมคุณภาพคือเพื่อติดตามความแม่นยำถูกต้องของวิธีการ น้ำยาทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อ แผ่นยาและสมรรถนะของผู้ปฏิบัติการทดสอบ อ่าน และแปลผล ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมคุณภาพคือ การเลือกใช้เชื้อมาตรฐานอ้างอิงเพื่อนำมาทดสอบตามวิธีที่ดำเนินการอยู่และตรวจสอบผลว่าตรงตามที่ควรจะเป็นหรือไม่

1.3.1 การควบคุมคุณภาพภายในสำหรับเชื้อก่อโรคที่เจริญเร็ว (rapid-growing aerobic pathogens)

ห้องปฏิบัติการทุกแห่งที่ทำการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อเจริญง่าย (nonfastidious bacteria) อย่างน้อยต้องมีเชื้อมาตรฐาน 6 เชื้อ (จากแหล่งที่เชื่อถือและสามารถสอบกลับได้) สำหรับควบคุณภาพ ดังนี้ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 35218 (สำหรับควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยแผ่นยา β-lactamase inhibitor combinations containing clavulanic acid, sulbactam, or tazobactam) และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (สำหรับควบคุมการทดสอบการใช้แผ่นยา trimethoprim หรือ sulfonamides a high concentration of gentamicin หรือ streptomycin (ดูรายชื่อเชื้ออื่นๆที่ทดสอบและเชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพจากตารางที่ 6-4 และ 6-5 และดูคุณลักษณะของเชื้อมาตรฐานจากตารางที่ 6-6)

เชื้อสำหรับควบคุมคุณภาพจะต้องได้รับการทดสอบโดยวิธีมาตรฐานการทดสอบกับแผ่นยา โดยในอาหารทดสอบและวิธีการเช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย

ค่าควบคุมต่ำสุดและสูงสุด ที่ควรจะเป็นในการควบคุมคุณภาพ มีกำหนดอยู่ในเอกสารอ้างอิงของ CLSI หากผลการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการ ผิดพลาดจากค่าควบคุม 1 ครั้ง ใน 20 ครั้ง ถือว่ายอมรับได้ แต่ถ้าความผิดพลาดมีมากกว่านี้จะต้องหาสาเหตุและทำการแก้ไขทันที

14-0992(001-354)editnew130158.indd 252 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-4 เชื้อที่ทดสอบและเชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ โดยวิธี disk diffusion test (M100-S23)

เชื้อที่ทดสอบความไว \ เชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพ	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* ATCC 35218	*K. pneumoniae* ATCC 700603	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 25923	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*H. influenzae* ATCC 49247	*H. influenzae* ATCC 49766	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226	*S. pneumoniae* ATCC 49619
Enterobacteriaceae	✓	✓*	✓								
Pseudomonas aeruginosa	✓	✓*		✓							
Acinetobacter spp.	✓	✓*		✓							
Stenotrophomonas maltophilia	✓	✓*		✓							
Burkholderia cepacia	✓	✓*		✓							
Other non-*Enterobactericeae*	✓	✓*		✓							
Staphylococcus spp.		✓*			✓ disk diffusion	✓ dilution method					
Enterococcus spp.					✓ disk diffusion		✓ dilution method				
Haemophilus influenzae and *Heamophilus parainfluenzae*		✓**						✓	✓		
Neisseria gonorrhoeae										✓	
Neisseria meningitidis	✓										✓
Streptococcus pneumoniae											✓
Streptococcus spp. β-hemolytic group											✓
Streptococcus spp. viridans group											✓

* For β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations

** When testing amoxicillin-clavulanic acid

14-0992(001-354)edittnew130158.indd 253 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-5 เชื้อที่ทดสอบและเชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ (M45-A2)

เชื้อที่ทดสอบความไว \ เชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพ	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* ATCC 35218	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 25923	*S. aureus* ATCC 29213	*S. pneumoniae* ATCC 49619	*C. jejuni* ATCC 33560	*H. pylori* ATCC 43504
Abiotrophia spp. and *Granulicatella* spp.	✓					✓ dilution method		
Aeromonas spp. and *Plesiomonas shigeloides*	✓	✓**						
Bacillus spp. (not *B. anthracis*)					✓			
Campylobacter jejuni / coli				✓ disk diffusion			✓ microdilution method	
Corynebacterium spp. including *C. diphtheriae*	✓ for gentamicin					✓		
Erysipelothrix rhusiopathiae						✓		
HACEK group****		✓**				✓		
Helicobacter pylori								✓
Lactobacillus spp.	✓ for gentamicin					✓		
Leuconostoc spp.	✓ for gentamicin					✓		
Listeria monocytogenes						✓		

14-0992(001-354)editnew130158.indd 254 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้ออ้างอิงที่ใช้ควบคุมคุณภาพ / เชื้อที่ทดสอบความไว	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* ATCC 35218	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 25923	*S. aureus* ATCC 29213	*S. pneumoniae* ATCC 49619	*C. jejuni* ATCC 33560	*H. pylori* ATCC 43504
Moraxella catarrhalis		✓**		✓ disk diffusion	✓ dilution method			
Pasteurella spp.		✓**		✓ disk diffusion		✓		
Pediococcus spp.	✓ for gentamicin					✓		
Vibrio spp. (including *V. cholerae*)	✓	✓**						
Burkholderia pseudomallei	✓	✓**	✓					
Burkholderia mallei	✓		✓					
Francisella tularensis	✓		✓		✓			
Bacillus anthracis	✓				✓			
Brucella spp.	✓					✓		
Yersinia pestis	✓							

* disk diffusion (amoxicillin-clavulinic acid and doxycycline)

** for β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations

*** when testing amoxicillin-clavulanic acid

**** HACEK group = *Aggregatibacter* spp. formerly *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* and *Kingella* spp.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 255 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-6 คุณลักษณะของเชื้อมาตรฐานสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ

Quality Control Strain	Organism Characteristic	Disk Diffusion Testscs	MIC Tests	Screening Tests	Other
Bacteroides fragilis ATCC 25285	β-lactamase positive		All anaerobes		
Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29148	β-lactamase positive		All anaerobes		
Clostridium difficile ATCC 700057	β-lactamase negative		Gram-positive antimicrobial agents		
Enterococcus faecalis ATCC 29212			Nonfastidious gram-positive bacteria	Vancomycin agar HLAR High-level mupirocin resistance MIC test	Assess suitability of medium for sulfonamide or trimethoprim MIC tests. Assess suitability of cation content in each batch/lot of Mueller-Hinton for daptomycin broth microdilution.
Enterococcus faecalis ATCC [a] 51299	Resistant to vancomycin (VanB) and high-level aminoglycosides			Vancomycin agar HLAR	
Escherichia coli ATCC 25922	β-Lactamase negative	Nonfastidious gram-negative bacteria *Neisseria meningitidis*	Nonfastidious gram-negative bacteria *N. meningitidis*		
Escherichia coli ATCC 35218	Contains plasmid-encoded TEM-1 β-lactamase (non-ESBL)[a, b, e, f]	β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations	β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations		
Eubacterium lentum ATCC 43055			All anaerobes		
Haemophilus influenzae ATCC 49247	BLNAR	*Haemophilus* spp.	*Haemophilus* spp.		
Haemophilus influenzae ATCC 49247	Ampicillin susceptible	*Haemophilus* spp. (more reproducible with selected β-lactams)	*Haemophilus* spp.(more reproducible with selected β-lactams)		

14-0992(001-354)editnew130158.indd 256 1/14/58 BE 3:51 PM

Quality Control Strain	Organism Characteristic	Disk Diffusion Testscs	MIC Tests	Screening Tests	Other
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Contains SHV-18 ESBL	ESBL screen and confirmatory tests	ESBL screen and confirmatory tests		
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226	CMRNG	*N. gonorrhoeae*	*N. gonorrhoeae*		
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Contains inducible AmpC β-lactamase	Nonfastidious gram-negative bacteria	Nonfastidious gram-negative bacteria		Assess suitability of cation content in each batch/lot of Mueller-Hinton for gentamicin MIC and disk diffusion.
Staphylococcus aureus ATCC 25923	β-Lactamase negative *mec*A negative Little value in MIC testing due to extreme susceptibility to most drugs	Nonfastidious gram-negative bacteria		High-level mupirocin resistance disk diffusion test Inducible clindamycin resistance disk diffusion test (Dzone test)	
Staphylococcus aureus ATCC 29213	Weak β-lactamase–producing strain *mec*A negative		Nonfastidious gram-negative bacteria	Oxacillin agar High-level mupirocin resistance MIC test Inducible clindamycin resistance MIC test	Assess suitability of cation content in each batch/lot of Mueller-Hinton for gentamicin MIC and disk diffusion.
Staphylococcus aureus ATCC 43300	Oxacillin-resistant, mecA positive	Cefoxitin disk diffusion testing	Cefoxitin MIC testing	Oxacillin agar	
Staphylococcus aureus ATCC BAA-1708	High-level mupirocin resistance mediated by the mupA gene			High-level mupirocin resistance test	
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619	Penicillin intermediate by altered penicillin binding protein	*S. pneumoniae* *Streptococcus* spp. *N. meningitidis*	*S. pneumoniae* *Streptococcus* spp. *N. meningitidis*	Inducible clindamycin resistance MIC test	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 257 1/14/58 BE 3:51 PM

Quality Control Strain	Organism Characteristic	Disk Diffusion Testscs	MIC Tests	Screening Tests	Other
Supplemental QC Strains					
Enterococcus faecalis ATCC 33186					Alternative to *E. faecalis* ATCC 29212 to assess suitability of medium for sulfonamide or trimethoprim MIC and disk diffusion tests.[d] End points are the same as for *E. faecalis* ATCC 29212.
Haemophilus influenzae ATCC 10211					Assess each batch/lot for growth capabilities of HTM.
Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-1705	KPC-producing strain MHT positive	Phenotypic confirmatory test for carbapenemase production (MHT)			
Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-1706	Resistant to carbapenems by mechanisms other than carbapenemase MHT negative	Phenotypic confirmatory test for carbapenemase production (MHT)			
Supplemental QC Strains[g]					
Staphylococcus aureus ATCC® 29213	Weak -lactamase producing strain *mec*A negative			Penicillin zone-edge test	
Staphylococcus aureus ATCC BAA-976	Contains *msrA*-mediated macrolide-only resistance	Assess disk approximation tests with erythromycin and clindamycin (D-zone test negative)			
Staphylococcus aureus ATCC BAA-977	Contains inducible *ermA* mediated resistance	Assess disk approximation tests with erythromycin and clindamycin (D-zone test positive)			

14-0992(001-354)editnew130158.indd 258 1/14/58 BE 3:51 PM

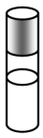
การเก็บและการใช้เชื้อสำหรับควบคุมคุณภาพ

- เชื้อที่จะเก็บไว้เป็นเวลานาน (stock culture) ควรเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C หรือต่ำกว่า โดยใส่ในอาหารเหลว ที่มี stabilizer ที่เหมาะสม เช่น TSB ที่ใส่ 50% fetal calf serum หรือใส่ 10-15 % glycerol อาจใช้ skim milk หรือ defibrinated blood แทน TSB ได้ เก็บในรูปแบบ freeze-dried โดยไม่มีความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงความไวต่อสารต้านจุลชีพ
- เชื้อสำหรับควบคุมคุณภาพที่ใช้งาน (working culture) ควรเก็บบน TSA slant (สำหรับเชื้อเจริญง่าย) หรือบน enriched CA slant / BA slant (สำหรับเชื้อเจริญยาก) ที่อุณหภูมิ 2 – 8 ^{o}C และนำมาเพาะใหม่ทุกสัปดาห์เป็นเวลาไม่เกิน 4 สัปดาห์ติดต่อกัน แล้วเตรียมเชื้อใหม่จาก stock culture
- ก่อนการทดสอบให้เพาะเชื้อบนจานอาหารเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว สำหรับ stock culture ควรนำมาเพาะซ้ำ 2 ครั้งก่อนนำไปทดสอบ
- นำเชื้อที่ใช้ในการควบคุณภาพไปทำการทดสอบตามขั้นตอน เช่นเดียวกับเชื้อตัวอย่างที่ต้องการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ
- ผลการทดสอบเชื้อควบคุมคุณภาพจะต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ หากไม่อยู่ในเกณฑ์ อาจเพราะวิธีการที่ไม่ถูกต้อง หรือเชื้อมาตรฐานที่ใช้ทดสอบไม่ได้มาตรฐาน ควรเปลี่ยนเชื้อมาตรฐานสำหรับควบคุมคุณภาพใหม่
- เชื้อ *E. coli* ATCC 35218 และ *K. pneumoniae* ATCC 700603 ที่ใช้ในการควบคุมมาตรฐานของการทดสอบ มีรายงานพบการสูญเสีย plasmid สำหรับการควบคุม β-lactamase เมื่อมีการ subculture หลายครั้ง ทำให้ผลการควบคุมคุณภาพอยู่นอกขอบเขตที่ยอมรับได้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 259 1/14/58 BE 3:51 PM

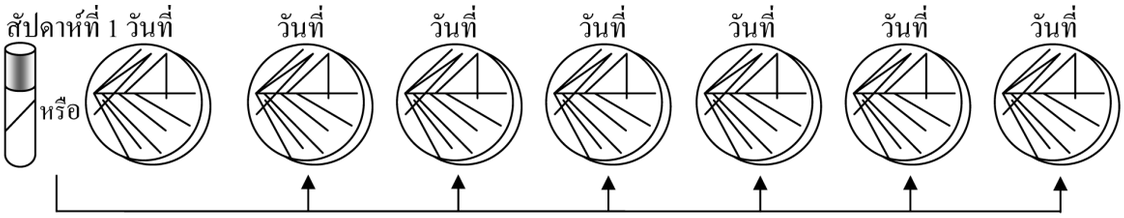
การใช้เชื้อควบคุมคุณภาพ

1. นำเชื้อที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง หรือเชื้อที่ sub culture ใหม่จากที่เก็บรักษา (stock culture) ไว้

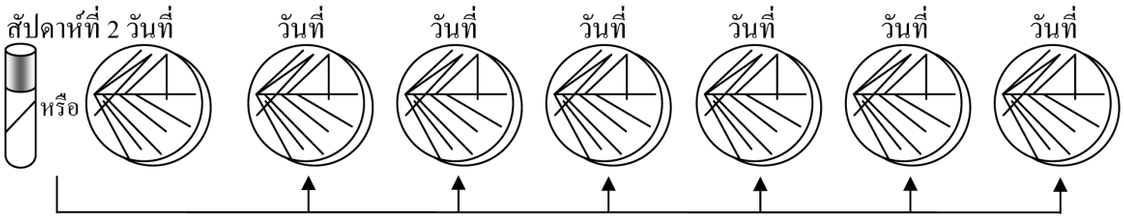


2. Sub culture เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและอบให้เชื้อเจริญ (primary subculture)

3. Sub culture ในหลอดอาหาร (slant) หรือจานอาหารเลี้ยงเชื้อ อบ และเก็บในสภาวะที่เหมาะสมกับชนิดเชื้อ และนำมา sub culture ใช้ในสัปดาห์ที่หนึ่งได้เป็นเวลา 7 วัน จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 สำหรับเป็น working culture



4. ทุกสัปดาห์ sub culture เชื้อจาก slant หรือจานอาหาร working culture วันที่ 1 (ในข้อ 3) เก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสัปดาห์ที่ 2



5. ดำเนินการซ้ำได้จนถึงสัปดาห์ที่ 3 และ 4 หลังจากนั้นทิ้งเชื้อนี้ และนำเชื้อจาก stock ในข้อ 1 ดำเนินการตามข้อ 2-5 ต่อไป

14-0992(001-354)editnew130158.indd 260 1/14/58 BE 3:51 PM

ค่ายอมรับของ zone ยับยั้ง

ผลการทดสอบความไวของเชื้อมาตรฐานที่ใช้ควบคุมคุณภาพต่อยาแต่ละชนิด ต้องได้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง zone ยับยั้งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตาราง CLSI: M100-S24

ความถี่ของการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพ

ควบคุมคุณภาพทั้งระบบโดยใช้เชื้อมาตรฐานที่เหมาะสมทดสอบกับยาแต่ละชนิดทุกวัน 20-30 วันติดต่อกัน ผลการทดสอบผิดพลาดได้ไม่เกิน 1 ใน 20 หรือ 3 ใน 30 ครั้ง กรณีที่ผลไม่อยู่ในเกณฑ์ต้องหาสาเหตุและปฏิบัติการแก้ไขทันที และทำการทดสอบใหม่ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5 วัน เมื่อผลอยู่ในค่าที่ยอมรับได้ จึงเริ่มทำการทดสอบประจำวันได้

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาที่เป็นงานบริการประจำวัน ต้องทำการควบคุมคุณภาพอย่างน้อยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง กรณีห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบไม่เป็นประจำ จะต้องทำการควบคุมคุณภาพทุกครั้ง

การแก้ไขข้อผิดพลาด

ข้อผิดพลาดที่เป็นสาเหตุให้ผลการทดสอบอยู่นอกเกณฑ์ยอมรับได้แก่

- เชื้อที่ใช้สำหรับควบคุมคุณภาพ
- วัสดุและสารที่ใช้
- ขบวนการทดสอบ
- เครื่องมือ

การรายงานผลของผู้ป่วยในกรณีผลการควบคุมคุณภาพอยู่นอกเกณฑ์ที่ยอมรับ

ไม่รายงานผลการทดสอบ ตรวจสอบทบทวนรูปแบบความไวของเชื้อต่อยาของผู้ป่วยแต่ละคนที่เคยทำมาก่อน หรือทบทวน antibiogram ที่เคยรวบรวมไว้ และใช้วิธีการทดสอบอื่น หรือส่งต่อไปทดสอบที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงจนกว่าปัญหาจะได้รับการแก้ไข

ขบวนการควบคุมอื่นๆ

- การควบคุมคุณภาพความเข้มข้นของเชื้อทดสอบ
- ควบคุมการอ่านค่าสำหรับแปลผล

14-0992(001-354)editnew130158.indd 261 1/14/58 BE 3:51 PM

ข้อจำกัดของวิธีทดสอบความไวโดยใช้แผ่นยา (Disk diffusion methods)

การศึกษาในขณะนี้การทดสอบโดยวิธี Disk diffusion ยังไม่เพียงพอที่จะสร้างมาตรฐาน ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำสำหรับการแปลผล เชื้อบางชนิดอาจต้องทดสอบโดยวิธีหาค่า MIC (dilution method) ถ้ามีความจำเป็นการใช้วิธี dilution method อาจเป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งอาจต้องส่งเชื้อไปยังห้องปฏิบัติการอ้างอิง

ผลที่ทำให้เกิดการเข้าใจผิด

ผลการทดสอบความไวของยาบางกลุ่มต่อเชื้อบางชนิด อาจรายงานว่ายาไวต่อเชื้อทั้งๆที่เชื้อนั้นดื้อยา ทำให้เข้าใจผิดซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วย ได้แก่การทดสอบยาต่อเชื้อดังต่อไปนี้

- 1st และ 2nd -generation cephalosporins, cephamycins และ aminoglycosides ต่อเชื้อ *Samonella* และ *Shigella* spp.
- Penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cephems (ยกเว้น cephalosporins with anti-MRSA activity), และ carbapenems ต่อเชื้อ oxacillin-resistant *Staphylococcus* spp. (MRSA)
- Aminoglycosides (ยกเว้น high concentrations), cephalosporins, clindamycin และ trimethoprim-sulfamethoxazole ต่อเชื้อ *Enterococcus* spp.

ปรากฏการณ์ดื้อยาระหว่างการรักษาและการทดสอบซ้ำ

เชื้อจุลชีพบางชนิดอาจกลายจากไวเป็นดื้อหรือดื้อปานกลาง เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาเดิมภายใน 3 -4 วัน เช่น เชื้อ *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. และ *Serratia* spp. กับยากลุ่ม 3rd -generation cepholosporins เชื้อ *P. aeruginosa* กับสารต้านจุลชีพทุกชนิด และเชื้อ staphylococci กับ quinolones สำหรับ *S. aureus* ที่ไว vancomycin อาจกลายเป็นดื้อหลังใช้รักษาผู้ป่วยเป็นระยะเวลานาน จึงต้องทำการทดสอบความไวของเชื้อชนิดเดียวกันซ้ำทุกครั้ง ที่แยกได้ในระหว่างการรักษา

การตรวจคัดกรองการดื้อยา

ผลที่ได้จากการทดสอบคัดกรองบางวิธีนี้อาจมีความไวและความจำเพาะเพียงพอ สามารถออกผลและพิจารณารักษาผู้ป่วยได้โดยไม่ต้องทดสอบด้วยวิธีอื่นอีก บางวิธีจะต้องทดสอบด้วยวิธีอื่นเพิ่มเพื่อยืนยัน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 262 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-7 รายการตรวจคัดกรองการดื้อยาตามชนิดการดื้อยาที่แสดงออก (Phenotype) หรือตามกลไกการดื้อยา

เชื้อ	Resistance Phenotype หรือกลไกการดื้อยา	วิธีตรวจคัดกรอง	การทดสอบยืนยันเพิ่ม
Enterobacteriaceae	ESBL production	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยากลุ่ม cephalosporins และ aztreonam	ทำการทดสอบเพิ่มหากให้ผลบวก
	Carbapenemase production	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยากลุ่ม carbapenems	ทำการทดสอบเพิ่มหากให้ผลบวก
Staphylococcus aureus	β-lactamase production	Penicillin disk diffusion zone-edge test หรือวิธีอื่น	Yes, if screen test negative, repeat penicillin MIC และ β-lactamase test(s) (eg, penicillin disk diffusion zone-edge test or induced β-lactamase test) on subsequent isolates from same patient (if penicillin MIC ≤ 0.12 μg/ml or zone ≥ 29 mm); PCR for *blaZ* may be considered.
	Oxacillin resistance	Agar dilution; MHA ที่มี 4% NaCl และ 6 μg/ml oxacillin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม
	mecA-mediated oxacillin resistance	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยา cefoxitin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม
	Vancomycin MIC ≥ 8 μg/ml	Agar dilution; BHI ที่มี 6 μg/ml vancomycin	ทำการทดสอบเพิ่มหากให้ผลบวก
	Inducible clindamycin resistance	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยา clindamycin และ erythromycin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม
	High-level mupirocin resistance	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยา mupirocin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม

14-0992(001-354)editnew130158.indd 263 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้อ	Resistance Phenotype หรือกลไกการดื้อยา	วิธีตรวจคัดกรอง	การทดสอบยืนยันเพิ่ม
Coagulase-negative staphylococci	β–lactamase production	Chromogenic cephalosporin หรือวิธีอื่น	Yes, if screen test negative, repeat penicillin MIC and induced β-lactamase test on subsequent isolates from same patient (if penicillin MIC ≤ 0.12 μg/ml or zone ≥ 29 mm); PCR for *blaZ* may be considered
	mecA-Mediated oxacillin resistance	Disk diffusion ต่อยา cefoxitin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม
	Inducible clindamycin resistance	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยา clindamycin และ erythromycin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม
Enterococci	Vancomycin resistance	Agar dilution; BHI with 6 μg/ml vancomycin ต่อยา vancomycin	ทำการทดสอบเพิ่มหากให้ผลบวก
	HLAR	Broth microdilution, agar dilution, และ disk diffusion ต่อยา gentamicin และ streptomycin	หากหา MIC ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม หากทำ disk ถ้าสรุปผลไม่ได้ให้ทำเพิ่ม
Streptococcus pneumoniae	Penicillin resistance	Disk diffusion ต่อยา oxacillin	ทำการทดสอบเพิ่มหากเชื้อให้ผล nonsusceptible
	Inducible clindamycin resistance	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยา clindamycin และ erythromycin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม
Streptococcus spp. β-hemolytic group	Inducible clindamycin resistance	Broth microdilution และ disk diffusion ต่อยา clindamycin และ erythromycin	ไม่ต้องทำการทดสอบเพิ่ม

คำย่อ: ESBL, extended-spectrum β-lactamase; FDA, US Food and Drug Administration;HLAR, high-level aminoglycoside resistance; MIC, minimal inhibitory concentration; PCR, polymerase chain reaction.

* If the current cephalosporin, aztreonam, and carbapenem breakpoints are used, ESBL and/or modified Hodge testing is not required, but may be used to determine the presence of a resistance mechanism that may be of epidemiological significance. However, if the ESBL and/or carbapenemase screen is performed and positive, the confirmatory test must be performed to establish the presence of an ESBL or a carbapenemase.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 264 1/14/58 BE 3:51 PM

สาเหตุของความผิดพลาดที่พบบ่อยในการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ ได้แก่

- การบันทึกผลผิดพลาดหรือใช้ยาไม่ถูกต้อง
- การวินิจฉัยเชื้อตัวอย่างผิดพลาด
- วิธีการทดสอบไม่ถูกต้องตามเกณฑ์มาตรฐาน

  การเตรียม inoculum ขุ่นมากหรือน้อยเกินไป

  ความขุ่นมาตรฐานหมดอายุหรือเปลี่ยนสภาพ

  อุณหภูมิในการอบเชื้อไม่ถูกต้อง

  ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ สูงหรือต่ำเกินไป
- ยาที่ใช้ทดสอบเสื่อมคุณภาพหรือหมดอายุ
- เชื้อที่ใช้ทดสอบมีการปนเปื้อน
- การอ่านผลผิดพลาด
- inhibition zone เล็กเกินไปหรือมีเชื้อเจริญอยู่ภายใน zone (โดยเฉพาะยา sulfonamide, trimethoprim และ co-trimoxazole) กรณีนี้อาจเกิดจากสารยับยั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงควรทดสอบด้วย *E. faecalis* ดังกล่าวแล้วข้างต้น

การตรวจสอบผลการทดสอบ

ตรวจสอบว่าแบบแผนความไวของเชื้อต่อยาสอดคล้องกันหรือไม่ หรือตรวจสอบจากผลการทดสอบความไวของเชื้อชนิดเดียวกันที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนหน้านี้ และให้หาสาเหตุของความผิดพลาดที่กล่าวแล้วข้างต้น

นอกจากนี้ เชื้อบางสปีชีส์จะให้แบบแผนการดื้อยาที่แน่นอนอยู่แล้ว เช่น

- *Proteus* spp. โดยทั่วไปจะดื้อต่อยา nitrofurantoin และ tetracyclines
- *Streptococcus pyogenes* จะไวต่อยา penicillin เสมอ
- *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. และ *Klebsiella pneumoniae* จะดื้อยา ampicillin
- staphylococci และ streptococci จะไวต่อ vancomycin (หากพบเชื้อทั้งสองดื้อต่อยา vancomycin ให้ตรวจสอบยืนยันการแยกชนิดเชื้ออีกครั้งเนื่องจากเชื้อ *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Pediococcus* spp. ดื้อ vancomycin)
- *Shigella* spp. จะไวต่อยา norfloxacin

หากพบเชื้อที่ให้ผล antibiogram ต่างไปจากปกติและมีความสำคัญทางระบาดวิทยา เช่นพบ norfloxacin-resistant *Shigella*, vancomycin-resistant *Staphylococcus* ควรส่งเชื้อดังกล่าว ตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการควรมีข้อมูลและติดตามข่าวสารเกี่ยวกับ typical, atypical, unusual หรือ impossible antibiogram อย่างสม่ำเสมอ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 265 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้อที่ควรทำการแยกชนิดและทดสอบความไวต่อยาซ้ำใหม่

ผลการทดสอบความไวของจุลชีพต่อสารต้านจุลชีพที่มีข้อชี้บ่งต่อไปนี้ ต้องทำการทดสอบซ้ำใหม่ทั้งการแยกและพิสูจน์ชนิดของเชื้อและการทดสอบความไวด้วยวิธีเดิมอีกครั้ง เมื่อทำซ้ำแล้วได้ผลดื้อเหมือนเดิม ให้ทำการยืนยันด้วยวิธีอื่นและหรือส่งให้ห้องปฏิบัติการอ้างอิงตรวจยืนยันการดื้อยา

ข้อบ่งชี้เชื้อที่ควรทำการแยกชนิดและทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ซ้ำใหม่:-

1) เชื้อที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน
2) เชื้อที่พบไม่บ่อยในพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ แต่เคยมีรายงานในพื้นที่อื่นหรือพื้นที่ใกล้เคียง
3) เชื้อที่ให้ผลการทดสอบที่สามารถเกิดความผิดพลาดด้านเทคนิคได้ง่าย และการดื้อยานี้มีผลกระทบทางคลินิกที่สำคัญ

การควบคุมคุณภาพภายนอก

ห้องปฏิบัติการควรได้รับการทดสอบจากหน่วยงานภายนอก

2. การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยการหาค่า MIC

2.1 หลักการ เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยการผสมสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นจากสูงไปหาต่ำกับอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใส่เชื้อลงไป นำไปอบเพาะเชื้อข้ามคืนในตู้อบ 35 ^{o}C ทำการตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ เรียกว่า minimum inhibitory concentration หรือ MIC การหาค่า MIC ทำได้สามวิธีคือวิธีที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นผสมกับยาต้านจุลชีพ เรียกว่า agar dilution method วิธีที่ผสมยาต้านจุลชีพด้วยอาหารเหลว เรียกว่า broth dilution method และวิธี E-test สำหรับวิธี broth dilution สามารถกระทำได้ 2 วิธีได้แก่ macrodilution และ microdilution broth method ซึ่งวิธีหลังเป็นวิธีที่นิยมมากกว่าเพราะสิ้นเปลืองสารน้อยกว่า จึงขอนำมากล่าวไว้ในที่นี้โดยจะกล่าวถึงวิธีที่เหมาะสำหรับเชื้อเจริญง่ายใน Mueller-Hinton Broth (MHB) สำหรับเชื้อที่เจริญยากหรือพบน้อย (*Bacillus* spp., *Brucella* spp., *Burkholderia pseudomallei*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis* เป็นต้น) สามารถอ่านเพิ่มเติมใน CLSI M45-A2 และสำหรับเชื้อกลุ่ม anaerobe อ่านเพิ่มเติมใน CLSI M11-A7 ซึ่งใช้ broth แตกต่างกันตามชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

2.2 วิธีปฏิบัติ

2.2.1 วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยการหาค่า MIC ด้วยวิธี Agar dilution

14-0992(001-354)editnew130158.indd 266 1/14/58 BE 3:51 PM

การเตรียมสารต้านจุลชีพ

1. เตรียมสารต้านจุลชีพให้เป็น 10 เท่าของปริมาณยาที่ต้องการให้มีในอาหารจานเพาะเชื้อแต่ละ plate โดยเจือจางยาต้านจุลชีพให้เป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 … เช่นเตรียมยา 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10 และ 5 μg/ml
2. ใส่ยาที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น plate ละ 1 ml แล้ว ผสมกับ MHA ที่มีความร้อนประมาณ 56 ^{o}C ปริมาณ 9 ml จะได้ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพใน agar dilution plate เรียงจากมากไปหาน้อย ดังนี้ 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, และ 0.5 μg/ml
3. รอให้ agar dilution plate เย็นและแข็งที่อุณหภูมิห้อง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านจุลชีพผสมอยู่ สามารถเก็บที่ 4 ^{o}C ได้ไม่เกิน 5 วัน ยกเว้นยากลุ่ม β-lactamases ต้องใช้ภายใน 48 ชั่วโมง เนื่องจากยาสลายตัวง่าย
4. ทำหน้า plate ให้แห้งก่อนนำไปใช้โดยใส่ในตู้อบเพาะเชื้อหรือวางแบบเปิดฝาใน laminar flow หรือ BSC ประมาณ 15 นาที

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อโดยวิธี direct colony หรือ growth method เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในวิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion ให้ได้เชื้อที่ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (1.0 x 10^8 CFU/ml) ใน TSB แล้วเจือจางเชื้อลงอีก 1: 10 เท่าจะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 5x10^7 CFU/ml ปริมาณเชื้อสุดท้ายที่อยู่บน agar dilution plate เท่ากับ 10^4 CFU ต่อหยด เมื่อใช้ replicators ที่มีเข็มขนาด 1 mm ซึ่ง สามารถปล่อยเชื้อได้ 0.1-0.2 μl ไม่ควรเตรียมเชื้อนานเกิน 15 นาที ก่อนใส่เชื้อบน plate

การใส่เชื้อบน Agar dilution plates

1. จัดเรียงเชื้อที่เตรียมไว้ให้เป็นลำดับ โดยสามารถทำเชื้อได้ 30-32 สายพันธุ์
2. ทำเครื่องหมายที่ plate เพื่อให้รู้ตำแหน่งและทิศทางการเรียงหมายเลขเชื้อแต่ละตัวบน agar plate
3. ดูดเชื้อที่เตรียมไว้แต่ละตัว ประมาณ 0.5 ml ใส่ในแต่ละหลุมของ inoculator ตามลำดับ
4. นำ inoculator-replicator ไปวางในหลุมของ inoculator แล้วนำไปวางบน agar plate เพื่อปล่อยให้เชื้อหยดบนผิว plate ควรหยดเชื้อบนผิว agar ที่เป็น control plate ซึ่งไม่มียาต้านจุลชีพก่อน plate ที่มียาโดยเรียงจากยาน้อยไปหามาก
5. รอจนหยดเชื้อแห้งสนิทจึงนำ plate อบที่ 35+ 2 ^{o}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 267 1/14/58 BE 3:51 PM

การอ่านค่า MIC

อ่านค่า MIC ของเชื้อแต่ละตัวโดยเรียงจาก plate ที่มียาน้อยที่สุดไปหายามากเพื่อหาว่าเชื้อมี completely inhibit growth (ไม่มีการเจริญของเชื้อหรือมีเพียงรอยเชื้อที่จางๆ) บน plate ที่มียาต้านจุลชีพปริมาณเท่าใด ค่าของ MIC ของเชื้อแต่ละตัวคือปริมาณยาน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

ข้อควรระวัง กรณีมีเชื้อขึ้น ≥ 2 โคโลนี ก่อนจุดที่เป็น end point ของเชื้อ หรือกรณีเชื้อไม่ขึ้นบน plate ที่มียาน้อยแต่มีเชื้อเจริญบน plate ที่มียามากกว่า ให้ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้ออื่น และต้องทำการทดสอบใหม่

การควบคุมคุณภาพ

Control plate: ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมยาต้านจุลชีพ เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบ

Drug control: ใช้เชื้อมาตรฐานที่ทราบค่า MIC ทดสอบควบคู่กับเชื้อทดสอบใน agar dilution plate เดียวกัน

ตารางที่ 6-8 แสดงการหาค่า MIC ของเชื้อโดยวิธี agar dilution

Strain No.	Antimicrobial concentration in agar dilution plate (µg/ml)					MIC (µg/ml)
	0.5	1	2	4	8	
1	+++	+++	+++	+++	NG	8
2	+++	+++	+++	NG	NG	4
3	+++	+++	NG	NG	NG	2
4	+++	+++	NG	NG	NG	2
5	+++	NG	NG	NG	NG	1
6	+++	NG	NG	NG	NG	1
7	+++	NG	NG	NG	NG	1
8	+++	NG	NG	NG	NG	1
9	+++	NG	NG	NG	NG	1
10	+++	NG	NG	NG	NG	1
Control strain	+++	NG	NG	NG	NG	1
Negative control	NG	NG	NG	NG	NG	NG

+++ คือมีการเจริญของเชื้อ; NG คือไม่มีเชื้อเจริญ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 268 1/14/58 BE 3:51 PM

2.2.2 วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยการหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth dilution

1. เตรียม Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB มีชนิดสำเร็จรูปขาย) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผสมยา (กรณีที่ต้องทดสอบหาความไวของเชื้อกลุ่ม staphylococci ต่อยา oxacillin, methicillin หรือ nafcillin ให้เติม 2 % NaCl ลงก่อนนำไปนึ่ง)
2. ทดสอบค่า pH ซึ่งควรอยู่ในช่วง 7.2-7.4

การเตรียมสารละลายสารต้านจุลชีพ

1. คำนวณหา potency ของยาจากค่าที่กำหนดมาในใบ certificate ที่แนบมากับยา ดังตัวอย่าง

   Assay purity (by HPLC): 99.8%, water content: 12.1% (w/w), Active fraction: 100%

   Potency = (assay purity) x (active fraction) x (1-water content)

   = 998 x 1 x (1-0.121)

   = 877 μg/mg or 87.7%

   ยาบางชนิดแสดงค่า potency เป็น IU/mg เขียนอยู่บนฉลากปิดขวด ให้คำนวณเป็น μg/mg ดังตัวอย่าง amphotericin 100 mg potency = 5,000 IU/mg = 5,000 IU/1,000 μg

ใช้สูตร

$$1\ \text{IU} = \frac{1{,}000\ \mu\text{g}}{5{,}000\ \text{IU}} = 0.2\ \mu\text{g}$$

Amphotericin มี potency = 5000 IU x 0.2 μg = 1,000 μg /mg

2. คำนวณหาน้ำหนักยาที่ต้องชั่งซึ่งควรมากกว่า 100 mg เพื่อเตรียม stock solution

   ตัวอย่าง เช่น ต้องการเตรียม stock solution 100 ml ที่มีความเข้มข้นของยา 1280 g/ml ยามี potency 750 g/mg

ใช้สูตร

$$\text{weight} = \frac{\text{volume (ml) x concentration (}\mu\text{g/ml)}}{\text{potency (}\mu\text{g/mg)}}$$

$$= \frac{100\ \text{ml x } 1280\ \mu\text{g/ml}}{750\ \mu\text{g/mg}} = 170.67\ \text{mg}$$

เพื่อความถูกต้องควรชั่งยามากกว่าค่าที่คำนวณได้ หากเลือกชั่งยา 182.6 mg จะใช้ตัวทำละลายปริมาตรเท่าใด ใช้สูตร

$$\text{volume} = \frac{\text{weight (mg) x potency (}\mu\text{g/mg)}}{\text{stock concentration (}\mu\text{g/ml)}}$$

$$= \frac{182.6\ \text{mg x } 750\ \mu\text{g/mg}}{1280\ \mu\text{g/ml}} = 107.0\ \text{ml}$$

14-0992(001-354)editnew060158.indd 269 1/14/58 BE 10:41 AM

นั่นคือ ชั่งยา 182.6 mg ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 107.0 ml เพื่อเตรียม stock solution ที่มีความเข้มข้นของยา 1280 μg /ml

3. สำหรับยาที่ละลายได้ง่ายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เตรียม stock solution ของยาให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 1,000 μg/ml (ยาที่ไม่ละลายในน้ำให้ละลายยาด้วยตัวทำละลายในปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถทำให้ยาละลายจนหมด) เตรียมยาให้มีระดับความเข้มข้นมากพอที่จะครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ยอมรับได้ของเชื้อควบคุมคุณภาพการทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด stock solution ที่เตรียมด้วยวิธีปลอดเชื้อไม่จำเป็นต้องกรอง และสามารถเก็บที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ -20 ^{o}C ได้นาน 6 เดือน

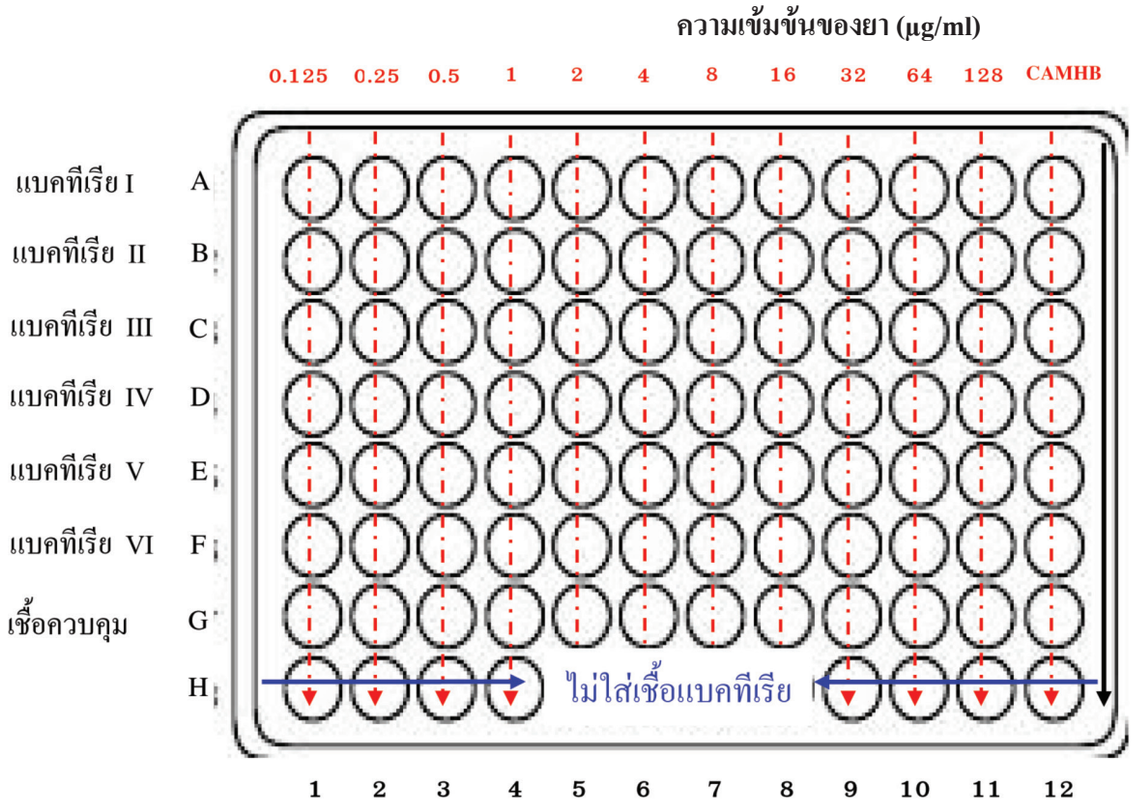
4. ทำการเจือจาง stock solution ด้วย CAMHB ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า เป็น working solution จากนั้นเจือจาง working solution ที่ได้ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของยาลดลง 2 เท่า (ดังตารางที่ 6-9) โดยเปลี่ยน pipette ทุกครั้งหลังการเจือจางแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 6-9 ตัวอย่างแสดงการเตรียม working solution

ความเข้มข้นของยา (μg/ml)	ปริมาตรของยา (ml)	ปริมาตรของ CAMHB (ml)	ความเข้มข้นสุดท้ายของยา (μg/ml)
5120 (stock solution)	1	9	512
512	1	1	256
512	1	3	128
512	1	7	64
64	1	1	32
64	1	3	16
64	1	7	8
8	1	1	4
8	1	3	2
8	1	7	1
1	1	1	0.5
1	1	3	0.25
1	1	7	0.125

ดูด CAMHB ที่ผสมยา ใส่ลงถาด 96 หลุม (ก้นหลุมแบบตัว U หรือ V) หลุมละ 0.1 ml โดยเริ่มจากความเข้มข้นของยาต่ำสุดไปหาสูงสุด แต่ละความเข้มข้นจะมี 8 หลุม (แถวA-H) ดังรูป และดูด CAMHB ที่ไม่ผสมยาลงในหลุมที่ A12-H12 หลุมละ 0.1 ml

14-0992(001-354)editnew130158.indd 270 1/14/58 BE 3:51 PM



ภาพที่ 6-1 ตัวอย่างการทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1. เตรียมเชื้อโดยวิธี direct colony หรือ growth method เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในวิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion ให้ได้เชื้อที่ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (1.0×10^8 CFU/ml) ใน CAMHB แล้วเจือจางเชื้อลงอีก 20 เท่าจะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 5×10^6 CFU/ml

2. ดูดเชื้อแต่ละสายพันธุ์ใส่หลุม 1-12 ของแต่และแถว (A-F) หลุมละ 0.01 ml ภายใน 15 นาที (ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อจะลดลงเป็น 5×10^5 CFU/ml) ดังรูป โดยหลุม G1-G12 ใช้เป็นหลุมที่ใส่เชื้อควบคุม และหลุมที่ H1-H12 ใช้เป็นหลุมควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย

3. อบถาดหลุมข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35±2 ^{o}C ในกล่องพลาสติกโดยไม่ซ้อนถาดมากกว่า 4 ถาด

การอ่านผล

1. ตรวจดูหลุมแรกที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแต่ละตัวที่ทำการทดสอบ อ่านค่าความเข้มข้นของยาในหลุมนั้นเป็นค่า MIC

2. หากพบหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้ออยู่ระหว่างกลาง ให้อ่านค่า MIC ที่สูงสุด แต่หากพบหลุมดังกล่าวมากกว่า 1 หลุมให้ทำการทดสอบใหม่

14-0992(001-354)editnew130158.indd 271 1/14/58 BE 3:51 PM

การควบคุมคุณภาพ

1. ทดสอบกับเชื้อควบคุมตามที่กำหนดใน CLSI M100-S24 ควบคู่กับเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

2. ต้องไม่พบการเจริญของเชื้อในหลุมของแถว H1-H12 และต้องพบการเจริญที่ดีของเชื้อในหลุม A12-G12

ตารางที่ 6-10 แสดงเชื้อแบคทีเรียที่ควรทดสอบความไวด้วยวิธี broth microdilution

Organism	Medium	Inoculum	Incubation	QC	Primary testing
Abiotrophia spp. *Granulicatella* spp.	CAMHB + LHB 2.5-5% + pyridoxal hydrochloride	direct colony suspension in MHB	35 ^{o}C 20-24 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619	penicillin cefotaxime หรือ ceftriaxone vancomycin
Bacillus spp. ยกเว้น *B. anthracis*	CAMHB	direct colony suspension in MHB	35 ^{o}C 16-20 ชม.	*S. aureus* ATCC 29213	vancomycin fluoroquinolones clindamycin
Campylobacter jejuni/coli	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	36-37 ^{o}C 48 ชม. หรือ 42 ^{o}C 24 ชม. microaerobic	*C. jejuni* ATCC 33560	erythromycin ciprofloxacin
Corynebacterium spp. (รวม *C. diphtheriae*)	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 ^{o}C 24-48 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619 *E. coli* ATCC 25922 กับยา gentamicin	penicillin vancomycin gentamicin erythromycin
Erysipelothrix rhusiopathiae	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 ^{o}C 20-24 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619	penicillin หรือ ampicillin
กลุ่ม HACEK	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 ^{o}C 24-48 ชม. 5% CO_2	*S. pneumoniae* ATCC 49619 *E. coli* ATCC 35218 กับยาที่มี β-lactamase inhibitor	ampicillin amoxicillin-clavulanic acid cefotaxime หรือceftriaxone imipenem

14-0992(001-354)editnew130158.indd 272 1/14/58 BE 3:51 PM

Organism	Medium	Inoculum	Incubation	QC	Primary testing
Leuconostoc spp.	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 °C 20-24 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619 *E. coli* ATCC 25922 กับยา gentamicin	penicillin หรือ ampicillin
Listeria monocytogenes	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 °C 20-24 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619	penicillin หรือ ampicillin trimethoprom-sulfamethoxazole
Moraxella catarrhalis	CAMHB	direct colony suspension in MHB	35 °C 20-24 ชม.	*S. aureus* ATCC 29213	amoxicillin -clavulanic acid cefaclor หรือ cefuroxime
Pasteurella spp.	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 °C 18-24 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619 *E. coli* ATCC 35218 กับยาที่มี β-lactamase inhibitor	ยากลุ่ม penicillins, cephalosporins, tetracyclines, fluoroquinolones
Pediococcus spp.	CAMHB + LHB 2.5-5%	direct colony suspension in MHB	35 °C 20-24 ชม.	*S. pneumoniae* ATCC 49619 *E. coli* ATCC 25922 กับยา gentamicin	penicillin cefotaxime หรือ ceftriaxone vancomycin
Acinetobacter spp.	CAMHB	direct colony suspension in MHB	35±2 °C 20-24 ชม.	*E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853	colistin

14-0992(001-354)editnew130158.indd 273 1/14/58 BE 3:51 PM

Organism	Medium	Inoculum	Incubation	QC	Primary testing
Bacillus anthracis	CAMHB	direct colony suspension in CAMHB	35 ^{o}C 16-20 ชม.	*E. coli* ATCC 25922 *S. aureus* ATCC 29213	penicillin doxycycline ciprofloxacin
Brucella spp.	*Brucella* broth pH 7.1 ±0.1	direct colony suspension in CAMHB	35 ^{o}C 48 ชม.	*E. coli* ATCC 25922 *S. pneumoniae* ATCC 49619	gentamicin streptomycin tetracycline
Burkholderia mallei	CAMHB	direct colony suspension in CAMHB	35 ^{o}C 16-20 ชม.	*E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853	ceftazidime imipenem tetracycline
Burkholderia pseudomallei	CAMHB	direct colony suspension in CAMHB	35 ^{o}C 16-20 ชม.	*E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853	ceftazidime imipenem tetracycline amoxicillin-clavulanic acid
Franciscella tularensis	CAMHB + 2% defined growth supplement	direct colony suspension in CAMHB	35 ^{o}C 48 ชม.	*E. coli* ATCC 25922 *S. aureus* ATCC 29213 *P. aeruginosa* ATCC 27853	gentamicin streptomycin tetracycline ciprofloxacin chloramphenicol
Yersinia pestis		direct colony suspension in CAMHB	35±2 ^{o}C 24-48 ชม.	*E. coli* ATCC 25922	gentamicin streptomycin tetracycline ciprofloxacin trimethoprom-sulfamethoxazole

LHB: Lysed Horse Blood

HACEK: *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter paraphrophilus*, *Aggregatibacter segnis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens*, *Kingella* spp.

Microaerobic: 10% $C0_2$, 5% O_2, 85% N_2

14-0992(001-354)editnew130158.indd 274 1/14/58 BE 3:51 PM

3. β-lactamase test

3.1 หลักการ β-lactamase เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียหลายชนิดสร้างขึ้นเพื่อทำลายยากลุ่ม β-lactam ดังนั้น การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ซึ่งสามารถกระทำได้อย่างรวดเร็วในแบคทีเรียกลุ่ม *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, staphylococci, enterococci และ *M. catarrhalis* จะช่วยให้การรักษาด้วยสารต้านจุลชีพมีประสิทธิภาพมากขึ้น วิธีทดสอบมี 3 วิธีได้แก่ acidometric, iodometric และ nitrocefin-based (cefinase) method ซึ่งวิธีสุดท้ายเป็นวิธีที่สามารถใช้ทดสอบกับเชื้อทุกกลุ่มดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดและจะนำมากล่าวไว้ในที่นี้

3.2 วิธีปฏิบัติ

3.2.1 วาง cefinase disk บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 หยดลงบน disk

3.2.2 ใช้ loop หรือ swab เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบนำมาป้ายลงบน cefinase disk

3.2.3 ตรวจดูการเปลี่ยนสีของ disk ผลบวกคือเชื้อสร้าง β-lactamase ไปเปลี่ยน substrate ใน disk เป็นสีแดงภายใน 15 วินาที ถึง 5 นาที แต่ถ้าทดสอบเชื้อ staphylococci ต้องอ่านผลหลังป้ายเชื้อ 1 ชม. และถ้าทดสอบเชื้อ enterococci ต้องอ่านผลหลังป้ายเชื้อ 30 นาที ผลลบคือ เชื้อไม่สร้าง β-lactamase จะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของ disk

หมายเหตุ การทดสอบกับเชื้อ staphylococci ควรทดสอบกับเชื้อที่ถูกเหนี่ยวนำ ให้สร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น (ตามวิธีข้างล่าง) เนื่องจากบางสายพันธุ์สร้าง β-lactamase ในปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้

3.3 วิธีเหนี่ยวนำ การสร้างเอนไซม์ β-lactamase ใน staphylococci

3.3.1 Streak เชื้อบน BA เป็น 3 ระนาบ แล้ววาง oxacillin disk (1 μg) ลงบนระนาบเชื้อ

3.3.2 อบเชื้อที่ 35± 2 ^{o}C นาน 16-18 ชม.

3.3.3 เขี่ยเชื้อที่เจริญตรงขอบของ inhibition zone ไปทดสอบการสร้าง β-lactamase ข้างต้น

3.4 การรายงานผล

ผลบวก หมายถึงเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม penicillinase-labile penicillins (amoxicillin, ampicillin, penicillin กรณี staphylococci จะรวมถึง carbenicillin, ticarcillin, mezlocillin, และ piperacillin) หากได้ผลลบยังไม่สามารถสรุปว่าเชื้อไม่ดื้อยา ต้องทำการทดสอบความไวตามวิธีมาตรฐานก่อน

3.5 การควบคุมคุณภาพ

ทดสอบการสร้าง β-lactamase กับ reference strains ดังนี้

Staphylococcus aureus ATCC 29213 ให้ผลบวก

Haemophilus influenzae ATCC 10211 ให้ผลลบ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 275 1/14/58 BE 3:51 PM

4. ESBLs

4.1 หลักการ ESBLs เป็นเอนไซม์ β-lactamase ที่เชื้อสร้างขึ้นจากการ mutation ของยีน ทำให้สามารถทำลายยากลุ่ม penicillins, 3rd-generation cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, และ ceftriaxone) และ aztreonam พบมากใน *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะ *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* ที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อในโรงพยาบาล วิธีที่ตรวจดูการสร้างเอนไซม์ ESBLs มีทั้งวิธี screening และ confirmation

4.2 วิธีปฏิบัติ

4.2.1 วิธี Screening

4.2.1.1 เตรียม inoculums และเพาะเชื้อบน MHA ตามมาตรฐานการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion

4.2.1.2 ทดสอบความไวของเชื้อ *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* และ *E. coli* ต่อยา cefpodoxime (10 µg) หรือ ceftazidime (30 µg) หรือ aztreonam (30 µg) หรือ cefotaxime (30 µg) หรือ ceftriaxone (30 µg) หากเป็นเชื้อ *P. mirabilis* ให้ทดสอบกับยา cefpodoxime (10 µg) หรือ ceftazidime (30 µg) หรือ cefotaxime (30 µg) อบเชื้อที่ 35± 2 ^{o}C นาน 16-18 ชม.

4.2.1.3 วัดขนาด inhibition zone ของเชื้อ ถ้าได้ตามตารางที่ 6-11 แสดงว่าเชื้ออาจสร้างเอนไซม์ ESBL ควรทำวิธี confirmation เพื่อยืนยันต่อไป

ตารางที่ 6-11 ตาราง inhibition zone ของเชื้อในการทดสอบ ESBL

สารต้านจุลชีพ	ขนาด inhibition zone (mm)			
	E. coli	***K. pneumoniae***	***K. oxytoca***	***P. mirabilis***
Cepodoxime (10 µg)	≤17	≤17	≤ 17	≤ 22
Ceftazidime (30 µg)	≤ 22	≤ 22	≤ 22	≤ 22
Aztreonam (30 µg)	≤ 27	≤ 27	≤ 27	-
Cefotaxime (30 µg)	≤ 27	≤ 27	≤ 27	≤ 27
Ceftriaxone (30 µg)	≤ 25	≤ 25	≤ 25	-

14-0992(001-354)editnew130158.indd 276 1/14/58 BE 3:51 PM

4.2.2 วิธี Confirmation

4.2.2.1 เตรียม inoculums และเพาะเชื้อบน MHA ตามมาตรฐานการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion จำนวน 2 plate ต่อเชื้อ 1 ตัวตามมาตรฐานการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion

4.2.2.2 ทดสอบความไวของเชื้อต่อยา ceftazidime (30 μg) และยา ceftazidime-clavulanic acid (30/10 μg) ใน plate ที่ 1 และวาง disk ยา cefotaxime (30 μg) และยา cefotaxime-clavulanic acid (30/10 μg) ใน plate ที่ 2 อบเชื้อที่ 35± 2 ^{o}C นาน 16-18 ชม.

4.2.2.3 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของยาแต่ละคู่ ถ้า inhibition zone ของ disk ยาที่มีส่วนผสมของ clavulanic acid มีขนาดใหญ่กว่า inhibition zone ของ disk ยาชนิดเดียวกันที่ไม่มีส่วนผสมของ clavulanic acid ≥ 5 mm แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL

4.3 การรายงานผล

รายงานว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL

4.4 การควบคุมคุณภาพ

4.4.1 วิธี screening : ทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (ไม่สร้างESBLs) ต่อยาดังกล่าวข้างต้น สัปดาห์ละครั้ง

4.4.2 วิธี confirmation : ทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (ไม่สร้างESBLs) และ เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 (สร้างESBLs) ต่อยา ceftazidime (30 μg) คู่กับยา ceftazidime-clavulanic และยา cefotaxime (30 μg) คู่กับยา cefotaxime-clavulanic acid (30/10 μg) สัปดาห์ละครั้ง โดย inhibition zone ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ต่อยาทั้ง 2 คู่จะต่างกัน ≤ 2 มม. และ inhibition zone ของเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 ต่อยา ceftazidime (30 μg) และยา ceftazidime-clavulanic จะต่างกัน ≥ 5 mm แต่สำหรับยา cefotaxime (30 μg) คู่กับยา cefotaxime-clavulanic acid (30/10 μg) จะต่างกัน ≥ 3 mm

5. Carbapenemases detection

5.1 หลักการ carbapenemases activity ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากสิ่งตรวจของผู้ป่วย เกิดจากการสร้างเอนไซม์ β-lactamase หลายชนิดมีทั้งใน classes A, B และ D เช่นเอนไซม์ KPC ที่อยู่ใน class A เอนไซม์ NDM ที่อยู่ใน class B และเอนไซม์ OXA ที่อยู่ใน class D ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่มีความสำคัญทางคลินิกดังแสดงในตารางที่ 6-12

14-0992(001-354)editnew130158.indd 277 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 6-12 β-lactamases และ carbapenemase activity

β-lactamase class	เชื้อที่พบ	ตัวอย่างเอนไซม์
A	*K. pneumoniae* และ *Enterobacteriaceae* อื่นๆ	KPC, SME
B	*Enterobacteriaceae* *P. aeruginosa* *Acinetobacter baumannii*	Metallo-β-lactamases ที่ถูกยับยั้งโดย EDTA เช่น IMP, VIM, NDM
C	*Acinetobacter baumannii* *Enterobacteriaceae*	OXA

Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases เป็นกลไกการดื้อยา carbapenems ที่สำคัญ carbapenemases มีรายงานพบทั่วโลกในเชื้อ *Enterobacteriaceae* เอนไซม์ carbapenemases ชนิด KPC type มีรายงานครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาและมีระบาดมากในอิสราเอล และกรีก metallo-enzymes (VIM, IMP…) พบมากในทางใต้ของยุโรปและเอเชีย OXA-48 เป็น carbapenemases ที่รายงานล่าสุดจากกลุ่มประเทศเมดิเตอร์เรเนียน และมีโครงสร้างที่แตกต่างจาก carbapenemases อื่น carbapenemase genes ส่วนใหญ่อยู่ที่ plasmid ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลแต่มีรายงานการติดเชื้อในชุมชนด้วย

การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ KPC สามารถทำโดย modified Hodge test แต่ยังไม่มี phenotypic test ที่เชื่อถือได้สำหรับการตรวจยืนยันหาเอนไซม์ NDM และ metallo-β-lactamases อย่างไรก็ตาม breakpoints ของการทดสอบความไวโดย disk diffusion method หรือการทำ MIC สำหรับยาในกลุ่ม carbapenem ที่กำหนดโดย CLSI ใน M100-S20-U (June 2010 Update) สามารถใช้แปลผลการทดสอบความไวของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ชนิด NDM และ other metallo-β-lactamase เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกสารต้านจุลชีพสำหรับการติดเชื้อดังกล่าว

การตรวจคัดกรองและการยืนยันการสร้าง carbapenemase ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* โดยใช้เกณฑ์การแปลผล CLSI June 2010 (M100-S20-U) การตรวจคัดกรองเบื้องต้นสำหรับการสร้าง carbapenemase ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ให้ทำตามวิธีที่แสดงใน Table 3C ของ M100-S24; CLSI 2014 การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพในงานบริการประจำวัน การตรวจยืนยันการสร้าง carbapenemase ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* โดยวิธี Modified- Hodge test ทำเฉพาะกรณีต้องการศึกษาระบาดวิทยาเพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายไม่จำเป็นต้องทำในงานบริการประจำวัน การแปลผลของการทดสอบความไวของยากลุ่ม carbapenem สำหรับเชื้อ *Enterobacteriaceae* โดยวิธี disk diffusion และการหาค่า MIC ให้อิงตาม break point ที่กำหนด โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลของ Modified- Hodge test

14-0992(001-354)editnew130158.indd 278 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง carbapenemase มักจะให้ผล intermediate หรือ resistant ต่อยาในกลุ่ม carbapenem อย่างน้อยหนึ่งชนิด ertapenem non-susceptibility เป็นตัวชี้วัดที่ไวดีสำหรับการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase และเชื้อกลุ่มนี้มักดื้อต่อยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่ม cephalosporin subclass III ด้วย เช่น cefoperazone, cefotaxime, ceftriazone, ceftazidime ดังนั้นการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemases สำหรับ *Enterobacteriaceae* ต้องทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาทั้ง ertapenem, imipenem, และ meropenem รวมทั้งยาในกลุ่ม cephalosporin subclass III เสมอ

5.2 การตรวจคัดกรอง Carbapenemase production ของเชื้อ *Enterobacteriaceae*

5.2.1 วิธีปฏิบัติ

5.2.1.1 ทำการทดสอบตามวิธี disk diffusion ด้วยแผ่นยาทดสอบ ertapenem 10 µg หรือ meropenem 10 µg หรือวิธี broth dilution โดยใช้ยา ertapenem 1 µg หรือ meropenem 1 µg หรือ imepenem 1 µg

5.2.1.2 อบจานเพาะเชื้อที่ 35 ± 2 ^{o}C เป็นเวลา 16-18 ชม. สำหรับวิธี disk diffusion หรือ 16-20 ชม. สำหรับ broth dilution

5.2.1.3 การตรวจคัดกรองถ้า inhibition zone ของ ertapenem = 19-21 mm หรือ meropenem = 16-21 mm แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบอาจมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase

5.2.1.4 MICs ของ ertapenem = 2 µg/ml หรือ imepenem = 2-4 µg/ml หรือ meropenem = 2-4 µg/ml แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบอาจมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase

5.2.1.5 กรณีได้ผลตรวจคัดกรองบวกต้องตรวจยืนยันโดยวิธี modified-Hodge test

หมายเหตุ ไม่ใช้ imepenem disk ในการตรวจคัดกรองหา carbapenemases เพราะให้ผลไม่ดี

5.3 การตรวจยืนยันการสร้าง Carbapenemase ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* โดย modified-Hodge test (MHT)

5.3.1 วิธีปฏิบัติ

5.3.1.1 เตรียม *E.coli* ATCC 25922 ให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland standard โดยวิธี direct colony suspension หรือ growth method ใน broth หรือน้ำเกลือแล้วเจือจางให้เป็น 1:10 ใน broth หรือน้ำเกลือ

5.3.1.2 ใช้ cotton swab ป้ายเชื้อในข้อ 1 ลงบน MHA แบบเดียวกับการทำ disk diffusion test

14-0992(001-354)editnew130158.indd 279 1/14/58 BE 3:51 PM

5.3.1.3 หลังปล่อย plate ไว้ 3-10 นาทีให้แห้ง วางแผ่นยาทดสอบ ertapenem ขนาด 10 μg หรือ meropenem 10 μg ที่กลาง plate

5.3.1.4 ใช้ loop ขนาด 10 μl เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบ 3-5 โคโลนีที่เพาะบน BA นาน 18-24 ชม. ป้ายเป็นเส้นตรงลากจากแผ่นยาทดสอบมาจนสุดขอบ plate ยาวอย่างน้อย 20-25 mm

5.3.1.5 ทำการทดสอบในข้อที่ 4 กับเชื้อมาตรฐานที่ใช้ควบคุมคุณภาพทั้งสายพันธุ์ MHT positive และ MHT negative

5.3.1.6 อบเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 16-20 ชม.

5.3.2 การอ่านผล

อ่านผลโดยดูการเหนี่ยวนำการเติบโต (enhanced growth) ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่ตำแหน่งที่ตัดกับเชื้อที่ทดสอบ ถ้าพบ enhanced growth แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบมีการสร้าง carbapenemase หรือ carbapenemase production บวก ถ้าไม่พบ enhanced growth คือ carbapenemase production ลบ

5.3.3 การรายงานผล

5.3.3.1 เชื้อที่ให้ผล MHT positive และการตรวจคัดกรองโดย ertapenem หรือ meropenem disk diffusion บวก (inhibition zone; ertapenem 19-21 mm meropenem 16-21 mm) ต้องหาค่า MIC ก่อนรายงานผลการสร้าง carbapenemase

5.3.3.2 เชื้อที่ให้ MHT positive และ ertapenem MIC 2 μg/ml, imipenem MIC 2-4 μg/ml, หรือ meropenem MIC 2-4 μg/ml รายงาน carbapenem ทุกตัวว่าดื้อ

5.3.3.3 เชื้อที่ให้ MHT negative แปลผล carbapenem MICs ตาม CLSI interpretive criteria ตาราง 2A ใน M100-S24 (January 2014)

5.3.3.4 เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง carbapenemase ไม่ได้ให้ผล MHT บวกทุกตัว และ ผล MHT ที่บวกอาจพบในเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อ carbapenem ด้วยกลไกอื่นที่ไม่ใช่การสร้าง carbapenemase

5.3.3.5 MIC ของ imipenem สำหรับ *Proteus* spp., *Providencia* spp. และ *Morganella morganii* มักจะสูงกว่า MIC ของ meropenem หรือ doripenem เชื้อเหล่านี้มี MIC ต่อยา carbapenem สูงอาจเนื่องจากกลไกอื่นๆที่ไม่ใช่การสร้าง carbapenemases

5.3.4 การควบคุมคุณภาพ

เชื้อควบคุมคุณภาพต้องทำการทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงเดียวกับเชื้อที่ทดสอบ และต้องทำการควบคุมคุณภาพทุกวันที่ทำการทดสอบ ใช้เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 เป็น MHT positive control และ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 เป็น MHT negative control

14-0992(001-354)editnew130158.indd 280 1/14/58 BE 3:51 PM

MAC ที่ supplemented ด้วย imipenem 1 μg/ml สามารถใช้ตรวจคัดกรองหาเชื้อ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) ที่ colonize ในทางเดินอาหารได้ด้วยความไวมากกว่า 80% และความจำเพาะมากกว่า 90% และสามารถใช้ตรวจหาเชื้อ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ที่มีค่า carbapenem MIC ต่ำๆได้ด้วย

6. การตรวจคัดกรองการดื้อยา aminoglycoside ระดับสูงของเชื้อ *Enterococcus* spp.

6.1 หลักการ การดื้อยา gentamicin และ/หรือ streptomycin ระดับสูง ชี้บ่งว่าเชื้อ enterococcal isolate นั้นจะไม่ถูกทำลายโดยการเสริมฤทธิ์ของ penicillin หรือ glycopeptides รวมกับ aminoglycoside agar หรือ broth ที่มี gentamicin (500 μg/ml) หรือ streptomycin (1,000 μg/ml ในวุ้น หรือ 2,000 μg/ml ในอาหารเหลว) ความเข้มข้นสูง สามารถใช้ในการตรวจคัดกรองการดื้อยาดังกล่าวได้ (ตาราง Screening test for Detection of High-Level Aminoglycoside Resistance (HLAR) in *Enterococcus* species ใน M100) aminoglycosides อื่นๆ นอกเหนือจาก gentamicin และ streptomycin ไม่ต้องนำมาตรวจคัดกรองเพราะไม่ได้ผลที่ดีกว่า

Enterococci อาจดื้อยา penicillin และ ampicillin เนื่องจาก มีการผลิต low affinity PBPs และอาจเกิดจากกลไกที่พบได้น้อยคือการผลิต β-lactamase ทั้ง agar และ broth dilition test สามารถตรวจหาเชื้อที่มี altered PBPs ได้แม่นยำ แต่ไม่สามารถตรวจการผลิต β-lactamase ได้ เชื้อ β-lactamase-producing strains of enterococci สามารถตรวจหาได้โดย nitrocefin based β-lactamase test ผลบวกของ β-lactamase test ใช้ในการชี้บ่งว่าดื้อต่อยา penicillin เชื้อ enterococci ที่มี ampicillin และ penicillin MICs > 16 μg/ml จัดว่าดื้อยา

เชื้อ enterococci ที่ดื้อ penicillin (MICs ≤ 64 μg/ml) หรือ ampicillin (MICs ≤ 32 μg/ml) ในระดับต่ำ อาจถูกทำลายโดยการเสริมฤทธิ์ของ penicillin ร่วมกับ gentamicin หรือ streptomycin ในกรณีที่เชื้อไม่ได้ดื้อยา gentamicin หรือ streptomycin ในระดับสูง และผู้ป่วยได้รับ high dose of penicillin เชื้อที่ดื้อในระดับสูงต่อยา penicillin (MICs ≥ 128 μg/ml) หรือ ampicillin (MICs ≥ 64 μg/ml) อาจไม่ได้ผลดีในการเสริมฤทธิ์ที่กล่าวมา

6.2 Disk diffusion test

6.2.1 วิธีปฏิบัติ

6.2.1.1 ป้ายเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ลงบน MHA ตามวิธีการ Standard disk diffusion test

6.2.1.2 วางแผ่นยาทดสอบ gentamicin 120 μg หรือ streptomycin 300 μg ลงบนจานเลี้ยงเชื้อในข้อ 6.2.1.1

6.2.1.3 อบเชื้อที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 16-18 ชม. สำหรับ gentamicin และ 24-28 ชม. สำหรับ streptomycin

14-0992(001-354)editnew130158.indd 281 1/14/58 BE 3:51 PM

6.2.2 การอ่านและการแปลผล

6.2.2.1 Inhibition zone ขนาด 6 mm รายงานว่าดื้อยาที่ทดสอบ ซึ่งหมายความว่า ไม่มีการเสริมฤทธิ์ (synergist) ของ aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบกับยาที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ เช่น penicillin, ampicillin และ vancomycin

6.2.2.2 Inhibition zone ขนาด 7-9 mm ยังรายงานผลไม่ได้ ต้องทำการตรวจยืนยันด้วย agar dilution test หรือ broth micro-dilution test

6.2.2.3 Inhibition zone ขนาด ≥ 10 mm รายงานว่าไวต่อยาที่ใช้ทดสอบ ซึ่งหมายความว่า มีการเสริมฤทธิ์ (synergist) ของ aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบกับยาที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ เช่น penicillin, ampicillin และ vancomycin

6.2.3 การรายงานผล

รายงานผลดื้อหรือไวต่อยา aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบ และควรระบุขนาดของยาที่ใช้ทดสอบ เช่น รายงาน

6.2.3.1 Susceptible to gentamicin (120 μg) หรือ streptomycin (1,000 μg)

6.2.3.2 Resistant to gentamicin (120 μg) หรือ streptomycin (1,000 μg)

6.2.3.3 ไม่มีการรายงานผล intermediate

6.2.4 การควบคุมคุณภาพ

6.2.4.1 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212 สำหรับการควบคุมความไวต่อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

6.2.4.2 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 51299 สำหรับการควบคุมการดื้อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

6.3 Broth microdilution test

6.3.1 วิธีปฏิบัติ

6.3.1.1 เตรียมเชื้อตามวิธีการ Standard broth dilution method สำหรับการทำ susceptibility test

6.3.1.2 ใช้ BHI broth ที่มียา gentamicin 500 μg/ml หรือ streptomycin 1,000 μg/ml

6.3.1.3 อบเชื้อที่ 35 ± 2 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม. สำหรับ gentamicin และ 24-28 ชม. สำหรับ streptomycin ถ้าไวต่อยาต้องอบจนครบ 48 ชม.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 282 1/14/58 BE 3:51 PM

6.3.2 การอ่านและการแปลผล

6.3.2.1 ถ้าพบมีเชื้อขึ้นแสดงว่ามีการดื้อยา aminoglycoside ตัวที่ใช้ทดสอบในระดับสูง ซึ่งหมายความว่า ไม่มีการเสริมฤทธิ์ (synergist) ของ aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบกับสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ เช่น penicillin, ampicillin และ vancomycin

6.3.2.2 ถ้าพบไม่มีเชื้อขึ้นแสดงว่าไวต่อยา aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งหมายความว่ามีการเสริมฤทธิ์ (synergist) ของ aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบกับสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ เช่น penicillin, ampicillin และ vancomycin

6.3.3 การรายงานผล

รายงานผลดื้อหรือไวต่อยา aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบ และควรระบุขนาดของสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบเช่น รายงาน

6.3.3.1 Susceptible to gentamicin (500 µg/ml) หรือ streptomycin (1,000 µg/ml)

6.3.3.2 Resistant to gentamicin (500 µg/ml) หรือ streptomycin (1,000 µg/ml)

6.3.4 การควบคุมคุณภาพ

6.3.4.1 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212 สำหรับการควบคุมความไวต่อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

6.3.4.2 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 51299 สำหรับการควบคุมการดื้อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

6.4 Agar dilution test

6.4.1 วิธีปฏิบัติ

6.4.1.1 เตรียมเชื้อ ตามวิธีการ Standard agar dilution method สำหรับการทำ susceptibility test

6.4.1.2 ใช้ BHI agar ที่มียา gentamicin 500 µg/ml หรือ streptomycin 2,000 µg/ml

6.4.1.3 หยดเชื้อที่เทียบความขุ่นได้เท่ากับ 0.5 McFarland ปริมาณ10 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อที่ 6.4.1.2

6.4.1.4 อบเชื้อที่ 35± 2 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม. สำหรับ gentamicin และ 24-28 ชม. สำหรับ streptomycin ถ้าไวต่อยาต้องอบจนครบ 48 ชม.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 283 1/14/58 BE 3:51 PM

6.4.2 การอ่านและการแปลผล

6.4.2.1 ถ้าพบมีเชื้อขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1 โคโลนี อ่านผลว่าเชื้อดื้อยา แสดงว่ามีการดื้อยา aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบในระดับสูง ซึ่งหมายความว่า ไม่มีการเสริมฤทธิ์ (synergist) ของ aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบกับยาที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ เช่น penicillin, ampicillin และ vancomycin

6.4.2.2 ถ้าพบไม่มีเชื้อขึ้นแสดงว่าไวต่อยา aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งหมายความว่ามีการเสริมฤทธิ์ (synergist) ของ aminoglycoside ที่ใช้ทดสอบกับยาที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ เช่น penicillin, ampicillin และ vancomycin

6.4.3 การรายงานผล

รายงานผลดื้อหรือไวต่อยา aminoglycosise ที่ใช้ทดสอบ และควรระบุขนาดของยาที่ใช้ทดสอบ เช่น รายงาน

6.4.3.1 Susceptible to gentamicin (500 µg/ml) หรือ streptomycin (2,000 µg/ml)

6.4.3.2 Resistant to gentamicin (500 µg/ml) หรือ streptomycin (2,000 µg/ml)

6.4.4 การควบคุมคุณภาพ

6.4.4.1 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212 สำหรับการควบคุมความไวต่อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

6.4.4.2 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 51299 สำหรับการควบคุมการดื้อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

7. การตรวจคัดกรองการดื้อยา vancomycin ในเชื้อ *Enterococcus* spp.

7.1 หลักการ การตรวจหาเชื้อ vancomycin resistant enterococci (VRE) ให้ได้ผลแม่นยำสามารถทำโดยวิธี agar หรือ broth dilution และยังสามารถทดสอบโดยการใช้ vancomycin screen agar ที่มียา vancomycin 6 µg/ml

7.2 วิธีปฏิบัติ

7.2.1 เตรียมเชื้อโดยวิธี growth method หรือ direct colony suspension ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland

7.2.2 เตรียม BHI agar ที่มียา vancomycin 6 µg/ml

7.2.3 หยดเชื้อในข้อ 7.2.1 ปริมาณ 1-10 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 7.3.2 หรือใช้ swab จุ่มเชื้อและบิดให้แห้งหมาดๆป้ายเป็นวงให้ได้เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 10-15 mm หรือป้ายเป็นแถบสั้นๆบน plate

14-0992(001-354)editnew130158.indd 284 1/14/58 BE 3:51 PM

7.2.4 อบเชื้อที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชม.

7.3 การอ่านและการแปลผล

ถ้าพบมีเชื้อขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1 โคโลนี (presumptive vancomycin resistance) ต้องทำการตรวจยืนยันการดื้อยาโดยหา MIC ของยา vancomycin เพื่อแยกเชื้อที่ดื้อยา vancomycin ชนิด acquired resistance (*vanA* หรือ *vanB*) ออกจากเชื้อที่ดื้อยาชนิด intrinsic intermediate level resistance to vancomycin (*vanC*) เช่น เชื้อ *E. gallinarum* และ *E. casseliflavus* ซึ่งมี MIC ต่อยา vancomycin 8-16 µg/ml

7.4 การรายงานผล

รายงานผลการตรวจคัดกรองว่าดื้อหรือไวต่อยา vancomycin

Negative report: "Negative - No Vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated"

Positive report: "Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated"

เมื่อพบเชื้อ enterococci ดื้อ vancomycin ทำการวินิจฉัยชนิดของ enterococci และรายงานให้ผู้ใช้บริการทราบ

ควรรายงานเชื้อ vancomycin-resistant enterococci ที่แยกได้จากผู้ป่วยทุกรายให้กลุ่มงานที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลทราบทันทีที่แยกเชื้อได้

7.5 การควบคุมคุณภาพ

7.5.1 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212 สำหรับการควบคุมความไวต่อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

7.5.2 ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 51299 สำหรับการควบคุมความไวต่อยา aminoglycoside ของเชื้อ *Enterococcus* spp.

8. การตรวจหาการดื้อ vancomycin ของเชื้อ *Staphylococcus* coagulase positive โดยวิธี agar screen

8.1 หลักการ ประเทศสหรัฐอเมริกาได้รายงานเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ให้ค่า MIC ของ vancomycin ตั้งแต่ 32 µg/ml-1024 µg/ml ในช่วงปี 2545-2550 และกลไกของการดื้อ vancomycin ในเชื้อกลุ่มนี้ยังไม่ทราบสาเหตุชัดเจน แต่พบยีนส์ *van*A ในทุกสายพันธุ์และคาดว่าน่าจะมาจากการพัฒนาของเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น MRSA การตรวจหา *S. aureus* ที่ให้ค่า MIC ของ vancomycin ≥ 32 µg/ml สามารถใช้วิธี disk diffusion หรือ vancomycin screen agar และการหาMIC แต่หากค่า MIC < 32 µg/mlจะไม่สามารถใช้วิธี disk diffusion ได้ สำหรับ vancomycin screen agar สามารถใช้ได้ดีในกรณีที่ค่า MIC ≥ 8 µg/ml แต่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ที่ให้ MIC 4 µg/ml (vancomycin intermediate) ได้ และวิธีนี้ยังไม่ถูกรับรองให้ใช้ตรวจใน coagulase-negative staphylococci

14-0992(001-354)editnew130158.indd 285 1/14/58 BE 3:51 PM

8.2 วิธีปฏิบัติ

8.2.1 เตรียม inoculums ของเชื้อตามมาตรฐานการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion

8.2.2 ใช้ swab จุ่ม inoculum แล้วแตะข้างหลอดเพื่อบีบให้ส่วนเกินไหลออก นำมาแตะและวนเป็นวงเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-15 mm บน BHI agar ที่ผสม 6 μg/ml vancomycin อบเชื้อที่ 35 ± 2 ^{o}C นาน 24 ชม.

8.2.3 ตรวจดูโคโลนีเล็กๆของเชื้อ (> 1โคโลนี) หรือฝ้าของเชื้อบนผิว agar หากพบการเจริญดังกล่าวแสดงว่าเชื้อไวต่อยา vancomycin น้อยลง

8.3 การรายงานผล

ก่อนรายงานผลต้องทำการวินิจฉัยเชื้อซ้ำ และหาค่า MIC ของ vancomycin เพื่อยืนยันว่าเชื้อไวต่อยา vancomycin น้อยลง

8.4 การควบคุมคุณภาพ

ทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212 หรือ *S. aureus* ATCC 29213 (vancomycin susceptible) ซึ่งเป็น negative control และ เชื้อ *E. faecalis* ATCC 51299 (vancomycin resistant) ซึ่งเป็น positive control

9. D-test

9.1 หลักการ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหา inducible clindamycin resistance ในเชื้อกลุ่ม staphylococci และ β-hemolytic streptococci ที่ดื้อต่อยากลุ่ม macrolides วิธีการตรวจสามารถกระทำได้ 2 วิธีได้แก่ disk diffusion และ single well broth microdilution test แต่วิธีแรกเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย จึงขอนำมากล่าวไว้ในที่นี้

9.2 วิธีปฏิบัติ

9.2.1 เตรียม inoculum ของเชื้อตามมาตรฐานการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี disk diffusion

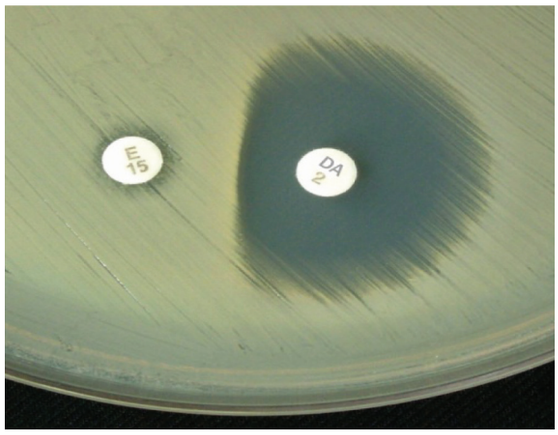
9.2.2 กรณีเชื้อ staphylococci ให้ spread บน MHA แต่เชื้อ β-hemolytic streptococci ให้ spread บน MHAที่ ผสม 5% sheep blood

9.2.3 วาง disk ยา erythromycin (15 μg) และ disk ยา clindamycin (2 μg) ให้ห่างกัน 15-26 mm สำหรับเชื้อ staphylococci และห่างกัน 12 mm สำหรับเชื้อ β-hemolytic streptococci

9.2.4 อบที่ 35 ± 2 ^{o}C นาน 16-18 ชม. สำหรับเชื้อ staphylococci และ อบที่ 35 ± 2 ^{o}C, 5% CO_2 นาน 20-24 ชม.สำหรับเชื้อ β-hemolytic streptococci

14-0992(001-354)editnew130158.indd 286 1/14/58 BE 3:51 PM

9.2.5 ตรวจดู inhibition zone ของเชื้อต่อยา clindamycin ด้านที่อยู่ใกล้กับ erythromycin ว่าแบนเป็นรูปอักษร D หรือพบการเจริญของเชื้อภายใน inhibition zone ของยา clindamycin แม้จะไม่เห็น D zone แสดงว่าเชื้อเป็น inducible clindamycin resistance



ภาพที่ 6-2 ลักษณะของ D-test

9.3 การรายงานผล

หากพบลักษณะดังกล่าวข้างต้นให้รายงานว่า เชื้อดื้อยา clindamycin และเพิ่มเติมข้อความว่า inducible clindamycin resistance

9.4 การควบคุมคุณภาพ

ทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ATCC BAA-976 ซึ่งเป็น D-zone test negative control และ เชื้อ *S. aureus* ATCC BAA-977 ซึ่งเป็น D-zone test positive control

10. E-test

10.1 หลักการ Epsilometer test (E-test) เป็นวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ตรวจหาความไวของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราต่อสารต้านจุลชีพแบบปริมาณวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการของ agar diffusion method ใช้แถบที่เป็น rectangular strip ซึ่งมีสารต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบเคลือบอยู่ในปริมาณที่ลดหลั่นเป็นสัดส่วนกับตำแหน่งบนแถบยา เมื่อวางแถบยาทดสอบบน agar plate ที่ป้ายเชื้อที่ทดสอบไว้ ยาในแถบทดสอบจะแผ่กระจาย (diffuse out) ไปในเนื้อวุ้นเกิดเป็น exponential gradient ที่แถบยาทดสอบมีตัวเลข บอกปริมาณสารต้านจุลชีพในแต่ละตำแหน่ง หลังจากเพาะไว้ 24 ชม. จะเกิด inhibition zone ลักษณะเป็นวงรี (elliptical zone of inhibition) จุดตัดของ inhibition zone กับขอบของแถบยาทดสอบ จะเป็นค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ที่อ่านได้ดังแสดงในรูป

14-0992(001-354)editnew130158.indd 287 1/14/58 BE 3:51 PM

E-test เหมาะสำหรับการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อที่ต้องการทดสอบกับสารต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวหรือไม่กี่ชนิดเนื่องจากทำได้สะดวกและมีความเม่นยำสูงแต่แถบยาทดสอบที่ใช้มีราคาสูง งานบริการที่ใช้ E-test เช่น การหาค่า MIC vancomycin ในเชื้อ *Staphylococcus* spp., MIC penicillin, cephalosporins, vancomycin ในเชื้อ *Streptococcus pneumoniae*

ภาพที่ 6-3 Epsilometer test (E-test)

10.2 วิธีปฏิบัติ

10.2.1 ป้ายเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ลงบน MHA ตามวิธีการ Standard disk diffusion test

10.2.2 วางแถบยาทดสอบ E-test ลงบนผิววุ้นที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 1 โดยให้ด้านที่มีตัวเลขบอกปริมาณอยู่ด้านบนและให้ผิวของแถบยาทั้งแถบแนบกับผิว agar อาจใช้ forceps กดแถบยาเบาๆไม่ให้มีฟองอากาศใต้แถบยา

10.2.3 จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 100 mm วางแถบยา E-test ได้หนึ่งแถบ จานขนาด 150 mm วางได้ 6 แถบ

10.2.4 อบเชื้อตามอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับสารต้านจุลชีพและเชื้อแต่ละชนิดตามการทดสอบ disk diffusion test

10.3 การอ่านและการแปลผล

10.3.1 จุดตัดของ inhibition zone ที่เป็นวงรีกับขอบของแถบยาทดสอบ E-test จะเป็นค่า MIC (minimum inhibitory concentration) โดยสามารถอ่านค่าตามตัวเลขที่ระบุบนแถบยาทดสอบที่ตำแหน่งจุดตัดนี้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 288 1/14/58 BE 3:51 PM

10.3.2 กรณีไม่มี inhibition zone คือเชื้อขึ้นชิดขอบของแถบยาตลอดแนว รายงานค่า MIC มากกว่าค่าสูงสุดของความเข้มข้นยาที่ระบุบนแถบยา E-test

10.3.3 กรณีที่จุดตัดของ inhibition zone อยู่ต่ำกว่าปริมาณยาที่ต่ำสุดของ E-test รายงานค่า MIC ต่ำกว่าค่าต่ำสุดของยาที่ระบุบนแถบยา E-test

10.3.4 กรณี MIC ที่อ่านได้อยู่ระหว่างค่าที่ระบุบนแถบยา ให้รายงาน MIC ตามค่าที่สูงกว่าจุดตัดของ inhibition zone กับขอบของแถบยา

10.4 การควบคุมคุณภาพ

10.4.1 ใช้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 สำหรับการควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

10.4.2 ใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 สำหรับการควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

10.4.3 ใช้เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 สำหรับการควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ Non-fermentative

10.4.4 ทำการควบคุมคุณภาพตามความเหมาะสม สำหรับเชื้อและยาแต่ละชนิดตามที่ใช้ในการทดสอบแบบ disk diffusion test

เอกสารอ้างอิง

1. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and Clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. J Clin Microbiol. 2011; 49: 2239-2242.
2. Hindler JF and Munro S. Beta-lactamase Test. In Garcia, L.S. editor in chief. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd edn. ASM Press. Washington DC; 2010. p.5.1.3-5.1.6.
3. Landman D, salamera J, Singh M, Quale J. Accuracy of carbapenem nonsusceptibility for identification of KPC-possessing *Enterobacteriaceae* by use of the revised CLSI breakpoints. J Clin Microbiol. 2011; 49:3931-3933.
4. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI M07-A49 January 2012.
5. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Tenth Edition. CLSI M02-A10 January 2009

14-0992(001-354)editnew130158.indd 289 1/14/58 BE 3:51 PM

6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012 M2-A11, Wayne, PA.
7. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012 M07-A9, Wayne, PA.
8. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Informational Supplement (June 2010, Update). Clinical and Laboratory Standard Institute, 2010 M100-S20-U (June 2010, Update). Wayne, PA.
9. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012 M100-S22, Wayne, PA.
10. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI M100-S24 January 2014.
11. Willey B. M., B. N. Kreiswirth, A. E. Simor, G. Willaims, S. R. Scriver, A. Phillips, D. E. Low Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus* species. J Clin Microbiol. 1992; 30: 1621-1624.
12. Willey B. M., R. N. Jones, A. McGeer, W. Witte, G. French, R. B. Roberts, S. G. Jenkins, H. Nadler, D. E. Low Practical Approach to the Identification of Clinically Relevant *Enterococcus* Species. Diag Microbiol Infect Dis. 1999; 34: 165-171.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 290 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 7
การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย

ปทุมพิศ วิมลวัตรเวที

การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการที่จะนำผลการตรวจวิเคราะห์ไปใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วย ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้อย่างถูกต้องและเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผู้ปฏิบัติงานจะต้องมีความรู้ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงสาเหตุของการก่อให้เกิดโรค การควบคุมคุณภาพให้ได้ผลดีควรมีการปรับปรุงคุณภาพและแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกขั้นตอนตั้งแต่กระบวนการก่อนการตรวจวิเคราะห์ เช่น การเก็บสิ่งตรวจ การนำสิ่งตรวจส่งห้องปฏิบัติการ กระบวนการในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งรวมถึงการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การแยกวินิจฉัยเชื้อ การตรวจสอบทางน้ำเหลืองวิทยา การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ และกระบวนการหลังการตรวจวิเคราะห์

แนวทางการควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย มีดังนี้

1. กระบวนการก่อนการวิเคราะห์

1.1 คู่มือคุณภาพการปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการต้องมีการจัดเตรียมเอกสารคู่มือคุณภาพต่างๆ ได้แก่

1.1.1 คู่มือในการเก็บสิ่งตรวจต่างๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเก็บสิ่งตรวจ แจกจ่ายให้กับผู้ใช้บริการ และตามหอผู้ป่วยต่างๆ โดยระบุถึงวิธีการเก็บที่ถูกต้อง ปริมาณของสิ่งตรวจ ชนิดและประเภทภาชนะที่ใช้ในการเก็บสิ่งตรวจ พร้อมทั้งระบุสภาวะและกำหนดระยะเวลาในการนำส่งยังห้องปฏิบัติการ เพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งตรวจแปรสภาพหรือแปรสภาพน้อยที่สุดก่อนทำการวิเคราะห์

1.1.2 คู่มือคุณภาพในการปฏิบัติงานที่เป็นปัจจุบัน เช่น คู่มือการตรวจวินิจฉัยสิ่งตรวจชนิดต่างๆ ข้อควรระมัดระวังและข้อพึงปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ การใช้และการบำรุงรักษาอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ รวมถึงการติดต่อสื่อสารกับผู้ใช้บริการ

1.2 การเก็บสิ่งตรวจและการนำส่งห้องปฏิบัติการ

สิ่งตรวจที่นำส่งห้องปฏิบัติการนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเก็บให้ถูกวิธีและเลือกเก็บจากบริเวณที่เกิดสภาวะของโรค ถ้าสิ่งตรวจมีการเก็บไม่ถูกต้องจะมีผลถึงการแยกวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรค นอกจากนั้นกระบวนการในการนำส่งยังห้องปฏิบัติการจะต้องเป็นไปตามข้อกำหนดของห้องปฏิบัติการในขณะนำส่งห้องปฏิบัติการ

1.3 ใบนำส่งสิ่งตรวจ

ต้องมีการระบุชื่อ นามสกุล อายุ เพศ HN ของผู้ป่วย การวินิจฉัยเบื้องต้นของแพทย์ที่ชัดเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญในการใช้เป็นแนวทางในการตรวจวิเคราะห์

1.4 ภาชนะบรรจุสิ่งตรวจ

ภาชนะที่บรรจุสิ่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการต้องสะอาด มีฝาปิดให้เหมาะสม ต้องไม่มีสิ่งตรวจรั่วซึม มีขนาดเหมาะสมกับสิ่งตรวจที่จะเก็บ ป้ายชื่อและรายละเอียดของผู้ป่วยที่ติดไว้ข้างภาชนะจะต้องเขียนให้ชัดเจนและติดแน่นไม่ลอกหรือหลุดง่าย

1.5 การตรวจสอบสิ่งตรวจ

ชนิดของสิ่งตรวจที่จัดเก็บส่งห้องปฏิบัติการ ต้องถูกต้องตรงกับที่ระบุไว้ในใบนำส่ง และมีปริมาณที่พอเพียงตามที่ห้องปฏิบัติการกำหนดไว้และต้องนำส่งห้องปฏิบัติการตามระยะเวลาที่กำหนด ในการรับสิ่งตรวจ ห้องปฏิบัติการจะต้องตรวจสอบดูความเรียบร้อยของภาชนะที่บรรจุสิ่งตรวจโดยจะต้องไม่มีการแตก รั่วซึม หรือมีการหกเลอะเทอะ ต้องตรวจสอบ ชื่อ นามสกุล อายุ เพศ HN ให้ตรงกับระบุไว้ในใบนำส่งสิ่งตรวจ

ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการกำหนดเกณฑ์ในการรับหรือปฏิเสธสิ่งตรวจ การส่งสิ่งตรวจเพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์นั้นจำเป็นต้องมีใบนำส่งสิ่งตรวจมาพร้อมกับสิ่งตรวจเสมอ และสิ่งตรวจจะต้องมีคุณสมบัติถูกต้องตามเกณฑ์ที่ห้องปฏิบัติการกำหนด

2. กระบวนการในการตรวจวิเคราะห์

2.1 บุคลากร

บุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย จะต้องเป็นผู้ที่มีความรู้ความสามารถ และมีประสบการณ์การปฏิบัติงานในการตรวจวิเคราะห์ ควรมีการจัดทำบันทึกการฝึกอบรมและต้องได้รับการพัฒนาเพื่อเพิ่มพูนทักษะอยู่เสมอ การปฏิบัติงานจะต้องปฏิบัติตาม universal precaution

2.2 สถานที่และสิ่งแวดล้อม

พื้นที่ในการปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียนั้น จะต้องมีพื้นที่ที่เหมาะสมแยกเป็นสัดส่วนเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนและแพร่กระจายของเชื้อโรค มีการถ่ายเทอากาศที่ดีและมีอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแนวทางปฏิบัติที่ไม่ให้บุคลากรที่ไม่เกี่ยวข้องสามารถเข้าห้องปฏิบัติการได้

14-0992(001-354)editnew130158.indd 292 1/14/58 BE 3:51 PM

2.3 สิ่งตรวจ

ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียก่อนปฏิบัติงานจะต้องตรวจสอบว่า สิ่งตรวจนั้นเหมาะสม เช่น สิ่งตรวจที่เป็นเสมหะ จะต้องไม่ใช่น้ำลายหรือมีน้ำลายปนเปื้อนมาก ภาชนะที่บรรจุสิ่งตรวจต้องไม่มีการรั่วซึม หรือมีสิ่งตรวจหกเลอะเทอะ ตรวจสอบ ชื่อ นามสกุล HN และชนิดสิ่งตรวจให้ตรงกับใบนำส่งอีกครั้งก่อนดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ระยะเวลาในการนำส่งและสภาวะของสิ่งตรวจต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

2.4 การดำเนินการตรวจวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการจัดทำนโยบายและระบบในการบริหารจัดการระเบียบในการปฏิบัติงาน มีการเลือกวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม จัดทำเป็นคู่มือคุณภาพและสื่อสารให้บุคลากรทุกคนรับทราบ

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการบันทึกวันที่ที่ได้รับจากบริษัทผู้แทนจำหน่าย บันทึกวันที่ที่มีการเปิดใช้ใหม่ทุกครั้ง หลังการใช้งานต้องปิดฝาให้สนิทแน่นเก็บไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุไว้ข้างภาชนะที่บรรจุ และจัดทำ stock ให้เพียงพอต่อการใช้งาน ซึ่งขึ้นกับปริมาณงานของแต่ละห้องปฏิบัติการ

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ปฏิบัติตามที่ระบุไว้ที่ขวดของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดโดยเคร่งครัด ต้องอ่านฉลากข้างขวดให้ละเอียด มีการตรวจสอบและคำนวณน้ำหนักให้ถูกต้องเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อของแต่ละบริษัทจะใช้ปริมาณไม่เท่ากัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่หมดอายุหรือจับกันเป็นก้อนแข็งหรือมีสีเปลี่ยนไป ไม่ควรนำมาใช้ เมื่อใช้เสร็จแล้วต้องปิดฝาขวดอาหารเลี้ยงเชื้อให้สนิทหลังจากชั่งเสร็จเรียบร้อยแล้วควรใช้น้ำล้างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดบนกระดาษชั่งสารลงไปในภาชนะที่ใช้เตรียมด้วยเพื่อจะได้ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกต้อง

เมื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเสร็จแล้ว ให้สังเกตสีว่าผิดปกติหรือไม่ ตรวจสอบ pH ค่า pH ที่วัดได้ไม่ควรเกิน ± 0.2 ของค่า pH ที่กำหนด โดยตรวจสอบหลังจากทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ต้องตรวจสอบด้วยว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดบ้างที่ไม่ต้องนำเข้า autoclave หรือบางชนิดต้องทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเติมสาร enrichment ต้องทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50-55 ^{o}C ก่อน เนื่องจากสาร enrichment ส่วนใหญ่จะไม่ทนต่อความร้อน การตรวจสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะต้องใช้เชื้อมาตรฐานตามที่กำหนดไว้ดังตารางที่ 7-1

14-0992(001-354)editnew130158.indd 293 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 7-1 เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Acetamide agar	1-4 days	*Pseudomonas aeruginosa* *Stenotrophomonas maltophilia*	27853 13637	Pink to red No color change
Acetate agar	1-2 days	*Escherichia coli* *Shigella flexneri*	25922 12022	Growth (blue) No growth or color change
(α-Hemolytic *Streptococcus* agar	1 day	*Streptococcus pneumoniae* *Streptococcus pyogenes* *Staphylococcus aureus* *E. coli*	6305 19615 25923 25922	Growth; α-hemolysis Growth; β-hemolysis Inhibition Inhibition
Blood agar base[e]	1 day	*S. pneumoniae* *S. pyogenes* *S. aureus* *E. coli*	6305 19615 25923 25922	Growth; α-hemolysis Growth; β-hemolysis Growth Growth
Blood culture[e] aerobic (vented) bottle	1–7 days	*P. aeruginosa* *S. pneumoniae* *Haemophilus influenzae*	27853 6305 10211	Growth Growth Growth
Anaerobic(unvented) bottle biphasic bottle	1–7 days	*S. pneumoniae* *B. fragilis* *Candida albicans* *S. pyogenes*	6305 25285 10231 19615	Growth Growth Growth Growth
Bordet-Gengou agar	1–4 days	*Bordetella bronchiseptica* *Bordetella pertussis* *S. aureus*	10580 12742 25923	Growth Growth Inhibition

14-0992(001-354)editnew130158.indd 294 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Campylobacter agars	2–3 days	*Campylobacter jejuni*	33291	Growth
		Staphylococcus epidermidis	12228	Inhibition
		E. coli	25922	Inhibition
		P. mirabilis	12453	Inhibition
		P. aeruginosa	27853	Inhibition on some selective media but growth on Campy, BAP, Skirrow, THIO
		C. albicans	10231	Inhibition on some selective media but growth on Campy, Skirrow, Preston
Cetrimide agar	1 day	*P. aeruginosa*	27853	Growth; fluorescein pigment
		E. coli	25922	Inhibition
		S. maltophilia	13637	Inhibition
Chocolate agar	1–3 days	*Neisseria gonorrhoeae*	43069 or 43070	Growth
		H. influenzae	10211	Growth
Modified Thayer-Martin, Martin-Lewis, modified Martin-Lewis		*N. gonorrhoeae*	43069	Growth
		Neisseria meningitidis	13090	Growth
		S. epidermidis	12228	Inhibition
		E. coli	25922	Inhibition
		P. mirabilis	43071	Inhibition
		C. albicans	60193	Inhibition
		Neisseria sicca	9913	Inhibition
Clostridium difficile agar	2 days	*Clostridium difficile*	9689	Growth
		C. perfringens	13124	Inhibition
		B. fragilis	25285	Inhibition
		E. coli	25922	Inhibition

14-0992(001-354)editnew130158.indd 295 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Columbia agar base[e]	1 day	*S. pyogenes*	19615	Growth; β-hemolysis
5% sheep blood		*S. pneumoniae*	6305	Growth; α-hemolysis
colistin-nalidixic acid[e]		*S. aureus*	25923	Growth
		P. mirabilis	12453	Inhibition
Cooked meat	2 day	*C. perfringens*	13124	Growth; proteolysis
		B. fragilis	25285	Growth
Cystine lactose electrolyte	1 day	*S. aureus*	25923	Growth; yellow
decient agar		*E. coli*	25922	Growth; yellow
(CLED agar)		*Proteus vulgaris*	8427	Growth; blue-green
Control		*N. gonorrhoeae*	43069	No color change or deep red
(nocarbohydrate added)				
Glucose		*N. gonorrhoeae*	43069	Yellow
		Moraxella catarrhalis	25240	No color or deep red
Lactose		*Neisseria lactamica*	23971	Yellow
		N. gonorrhoeae	43069	No color or deep red
Maltose		*N. meningitidis*	13090	Yellow
		N. gonorrhoeae	43069	No color or deep red
Mannitol		*Enterococcus faecalis*	29212	Yellow
		S. pyogenes	19615	No color or deep red
Sorbitol		*E. faecalis*	29212	Yellow
		Streptococcus bovis	9808	No color or deep red
Sucrose		*Neisseria sicca*	9913	Yellow
		N. gonorrhoeae	43069	No color or deep red
Decarboxylase broth	4 days			
Control		*K. pneumoniae*	13883	Yellow or no change
(no amino acid added)		*Enterobacter cloacae*	13047	Purple to yellow-purple
Arginine		*K. pneumoniae*	13883	Yellow or no change
Lysine		*K. pneumoniae*	13883	Purple to yellow-purple
		E. cloacae	13047	Yellow or no change

14-0992(001-354)editnew130158.indd 296 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Ornithine		*E. cloacae*	13047	Purple to yellow-purple
		K. pneumoniae	13883	Yellow or no change
Deoxycholate agar	1–2 days	*Salmonella enterica* serotype Typhimurium	14028	Growth; colorless
		S. flexneri	12022	Growth; colorless
		E. coli	25922	Growth; pink to red
		E. faecalis	29212	Inhibition
Egg yolk agar	1–2 days	*C. perfringens*	13124	Lecithinase +, lipase -
		Clostridium sporogenes	3584	Lipase +, lecithinase -
Eosin methylene blue[e]	1 day	*S. enterica* serotype Typhimurium	14028	Growth; colorless
		E. faecalis	29212	Inhibition (partial)
		E. coli	25922	Growth; blue-black with metallic sheen
Esculin				
Bile esculin agar[e]	1–3 days	*E. coli*	25922	Inhibition
Bile esculin azide agar	1–2 days	*E. faecalis*	29212	Growth; blackens agar
		S. pyogenes	19615	Inhibit
Esculin agar	1–3 days	*K. pneumoniae*	13883	Growth; blackens agar
		E. coli	25922	Growth
Gardnerella agar	1–2 days	*Gardnerella vaginalis*	14018	Growth; β-hemolysis
		P. mirabilis	12453	Inhibition
Gelatin	2–14 days	*S. marcescens*	43861	Medium liquefied
		E. coli	25922	Medium remains solid

14-0992(001-354)editnew130158.indd 297 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Gram-negative broth[e]	2–8 days	*S. enterica* serotype Typhimurium *Shigella sonnei* *E. coli*	14028 9290 25922	Growth on subculture Growth on subculture Inhibited
Heart infusion fermentation base	3–5 days			
Control (no carbohydrate added)		*K. pneumoniae*	13883	No color change
Adonitol		*E. aerogenes* *E. coli*	13048 25922	Yellow No color change
Arabinose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13038 43861	Yellow No color change
Glucose		*E. coli* *M. osloensis*	25922 10973	Yellow; gas No color change; no gas
Inositol		*E. aerogenes* *E. coli*	13048 25922	Yellow No color change
Inulin		*S. pneumoniae* *S. bovis*	6305 9809	Yellow No color change
Lactose		*E. coli* *P. mirabilis*	25922 12453	Yellow No color change
Maltose		*E. coli* *P. mirabilis*	25922 12453	Yellow No color change
Mannitol		*E. coli* *P. mirabilis*	25922 12453	Yellow No color change
Melibiose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13048 43861	Yellow No color change
Raffinose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13048 43861	Yellow No color change
Rhamnose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13048 43861	Yellow No color change
Salicin		*E. aerogenes* *Salmonella* sp.	13048 35664	Yellow No color change

14-0992(001-354)editnew130158.indd 298 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Sorbitol		*E. coli* *P. mirabilis*	25922 12453	Yellow No color change
Sucrose		*E. aerogenes* *Salmonella* sp.	13048 35664	Yellow No color change
Trehalose		*E. coli* *Edwardsiella tarda*	25922 15947	Yellow No color change
Hektoen enteric agar[e]	1–2 days	*S. enterica* serotype Typhimurium *S. flexneri* *E. coli*	14028 12022 25922	Growth;blue-green colonies (black centers) Growth; green with blue-green centers) Partial inhibition; yellow colonies
Hippurate broth	2 days	*Streptococcus agalactiae* *S. pyogenes*	12386 19615	Precipitate that does not dissolve with shaking Precipitate that dissolves with shaking
Loeffler	1 day	*Corynebacterium diphtheriae* *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*	13812 10700	Growth Growth
Lysine iron agar	1 day	*P. mirabilis* *S. enterica* serotype Typhimurium *S. flexneri*	12453 14028 12022	Red slant; H_2S; acid butt Alkaline slant; H_2S; alkaline butt Alkaline slant; acid butt

บทที่ 7

14-0992(001-354)editnew130158.indd 299 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
MacConkey MAC[e]	1–2 days	*P. mirabilis*	12453	Colorless colony; inhibition of swarming
		E. coli	25922	Red colony
		S. enterica serotype Typhimurium	14028	Colorless colony
		E. faecalis	29212	Inhibition
Malonate broth	1–2 days	*E. coli*	25922	Green or yellow
		K. pneumoniae	13883	Blue to Prussian blue
Mannitol salt agar[e]	1–2 days	*S. aureus*	25923	Colonies have yellow zones
		S. epidermidis	12228	Colonies have red zones
		P. mirabilis	12453	Inhibition
Methylred-Voges Proskauer (MR-VP)	1–5 days	*E. coli*	25922	MR +; VP -
		K. pneumoniae	13883	MR -; VP +
Motility-indole-lysine	1 day	*E. coli*	25922	Mot +; Ind +; Lys -
		K. pneumoniae	13883	Mot -; Ind -; Lys +
Motility-indole-ornithine	1 day	*E. coli*	25922	Mot +; Ind +; Orn +
		K. pneumoniae	13883	Mot -; Ind -; Orn -
Motility test	1 day	*E. coli*	25922	Positive
		K. pneumoniae	13883	Negative
Nitrate reduction (agar or broth)	1–5 days	*P. mirabilis*	12452	Positive + gas
		P. aeruginosa	27253	Positive + gas
		Acinetobacter baumannii	15308	Negative

14-0992(001-354)editnew130158.indd 300 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Nutrient base[e] (agar or broth)	1 day	*S. aureus* *E. coli*	25923 25922	Growth Growth
Phenol red (agar or broth)	1 day			
Adonitol		*E. aerogenes* *E. coli*	13048 25922	Yellow Red or no change
Arabinose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13048 43861	Yellow Red or no change
Arabitol		*K. pneumoniae* *M. morganii*	13883 25830	Yellow Red or no change
Dulcitol		*C. freundii* *S. marcescens*	8090 43861	Yellow Red or no change
Glucose		*E. coli* *M. osloensis*	25922 10973	Yellow Red or no change
Inositol		*E. aerogenes* *E. coli*	13048 25922	Yellow Red or no change
Lactose		*E. coli* *P. mirabilis*	25922 12453	Yellow Red or no change
Raffinose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13048 43861	Yellow Red or no change
Rhamnose		*E. aerogenes* *S. marcescens*	13048 43861	Yellow Red or no change
Sorbitol		*E. coli* *P. mirabilis*	25922 12453	Yellow Red or no change

14-0992(001-354)editnew130158.indd 301 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Trehalose		*K. pneumoniae* *M. morganii*	13883 25830	Yellow Red or no change
Phenylalanine agar	1 day	*P. mirabilis* *E. coli*	12453 25922	Positive Negative
Pyruvate broth	3–5 days	*E. faecalis* *S. bovis*	29212 9809	Yellow No change or yellow-green
Salmonella-shigella agar[e]	1 day	*S. enterica* serotype Typhimurium *S. flexneri* *E. coli* *E. faecalis*	14028 12022 25922 29212	Colorless colonies ± black centers Colorless colonies Inhibition or pink colonies Inhibition
Salt tolerance(6.5% NaCl)	1 day	*E. faecalis* *S. bovis*	29212 9809	Growth No growth
Simmons citrate agar	1–2 days	*K. pneumoniae* *E. coli*	13883 25922	Growth ± blue No growth or color change
Streptococcus group B selective broth	1 day	*S. agalactiae* *E. coli*	12386 25922	Growth Inhibition
Streptococcus selective (trypticsoy), sheep blood + neomycin, and sheep blood + trimethoprim-sulfamethoxazole	1 day	*S. pneumoniae* *S. pyogenes* *S. aureus* *P. mirabilis*	6305 19615 25923 12453	Growth; β-hemolysis Growth; α-hemolysis Inhibition Inhibition

14-0992(001-354)editnew130158.indd 302 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Thiosulfate citrate bile salts agar (TCBS)	1 day	*Vibrio alginolyticus*	17749	Yellow colony
		V. parahaemolyticus	17802	Green colony
		E. coli	25922	Inhibition
Thioglycolate[e] broth (± Indicator)	3–7 days	*S. aureus*	25923	Growth
		Clostridium novyi A	7659	Growth
		C. perfringens	13124	Growth
		P. levii	29147	Growth
		Bacteroides vulgatus	8482	Growth
Todd-Hewitt broth	4–18 h	*S. pyogenes*	19615	Growth
		E. faecalis	29212	Growth
Transport media				
Amies or Stuarts ± charcoal	6–8 h	*S. pyogenes*	19615	Growth on subculture
		N. gonorrhoeae	43069	Growth on subculture
Cary-Blair or enteric pathogen	1 day	*C. jejuni*	33291	Growth on subculture
		S. flexneri	12022	Growth on subculture
		Yersinia enterocolitica	9610	Growth on subculture
Triple-sugar iron agar	1 day	*S. enterica* serotype Typhimurium	14028	Alkaline slant ;acid butt;H_2S + ; ± gas
		E coli	25922	Acid slant; acid butt; no H_2S; gas
		P. aeruginosa	27853	Alkaline slant and butt; no H_2S; no gas
Tryptic soy (aerobic)				
Plain agar or broth[e]	1 day	*S. pyogenes*	19615	Growth
		E. coli	25922	Growth
Sheep blood agar[e]	1 day	*S. pneumoniae*	6305	Growth; β-hemolysis
		S. pyogenes	19615	Growth; α-hemolysis
		S. aureus	25923	Growth
		E. coli	25922	Growth

บทที่ 7

14-0992(001-354)editnew130158.indd 303 1/14/58 BE 3:51 PM

Medium	Length of incubation	Control organism[b]	ATCC[c] no.	Expected results[d]
Tryptone	1 day	*E. coli* *K. pneumoniae*	25922 13883	Positive for indole Negative for indole
Urea broth or agar	1 day	*P. mirabilis* *E. coli*	12453 25922	Pink to red No change or pale yellow
Xylose lysine deoxycholate agar[e] (XLD)	1–2 days	*S. enterica* serotype Typhimurium *S. flexneri* *E. coli* *E. faecalis*	14928 12022 25922 29212	Red colony with black center Red colony Partial inhibition; yellow colony Inhibition

[a]Abbreviations are as follows.

A, for testing nutritive properties. Dilute standardized cell suspension (0.5McFarland standard) 1:100 (0.1 ml of suspension plus 9.9 ml of saline). Inoculate each medium with 10 µl of dilution. If isolated colonies are not obtained, use 10-fold-lighter inoculum.

B, for testing elective properties. Dilute standardized cell suspension (0.5 McFarland standard) 1:10 (0.1 ml of suspension plus 0.9 ml of saline). Inoculate each medium with 10 µl of dilution.

C, for testing tubed media. Inoculate medium with 10 µl of the standardized suspension (0.5 McFarland standard). Adjust the inoculums if heavier or lighter growth is required.

D, for testing biochemical media. Inoculate each medium according to the procedure for the routine use of the medium.

E, for testing transport media. Place a sterile swab in the standardized suspension (0.5 McFarland standard), squeeze out excess fluid on the wall of the tube, and submerge the swab in the transport medium. Hold at room temperature, and plate on the appropriate medium.

[b]Organisms recommended for QC testing of media (2,7–12, 14, 16, 17). Although American Type Culture Collection strains are listed, any organism that will yield an identical result is acceptable.

[c]ATCC, American Type Culture Collection.

[d]MR, methyl red; VP, Voges Proskauer; Mot, motility; Ind, indole; Lys, lysine; Orn, ornithine; +, positive; -, negative; oxidation, color change in open tube; fermentation, color change in over laid tube.

[e]Exempt from QC by user (14).Applie sonly to commercially prepared media.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 304 1/14/58 BE 3:51 PM

การเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมแล้วนั้น ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ค่อยได้ใช้และต้องการเก็บไว้ใช้นานๆ ควรจะใช้หลอดแก้วจุกเกลียว เก็บไว้ที่ 2-8 ^{o}C ยกเว้น Thioglycollate broth ให้เก็บที่อุณหภูมิห้องไม่ให้ถูกความร้อนและแสงแดดสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เท plate ควรเก็บไว้ในตู้เย็น และถ้าจำเป็นต้องเก็บไว้นานให้บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิท อายุการใช้งานของอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของภาชนะที่บรรจุและอุณหภูมิ ดังตารางที่ 7-2

ตารางที่ 7-2 อายุการใช้งานของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว

ประเภทอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไม่ได้บรรจุในถุงปิดสนิท	บรรจุในถุงปิดสนิท	อุณหภูมิ
Plate	2 สัปดาห์*	4 เดือน*	2-8 ^{o}C
Tube จุกสำลีหรือจุกหลวมๆ	2 สัปดาห์	2 เดือน	2-8 ^{o}C
Tube screw capped	2 เดือน	4 เดือน	2-8 ^{o}C
CTA	2 สัปดาห์	-	อุณหภูมิห้อง
Indole, nitrate broth	-	2 สัปดาห์	อุณหภูมิห้อง
Thioglycollate	4 เดือน	-	อุณหภูมิห้อง

* กรณีที่เป็น selective medium ที่เตรียมเองมีอายุการใช้งานน้อยกว่า เช่น TCBS มีอายุการใช้งานเพียง 1 สัปดาห์ (ตามกำหนดของ Mindy J Perilla , et al. 2003. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. WHO.CDS/CSR/RMD/2003.6) Mueller Hinton agar มีอายุการใช้งานเพียง 1 สัปดาห์ (ตามกำหนดของ CLSI) รายละเอียดดูในภาคผนวก

การตรวจสอบ sterility

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในแต่ละครั้ง ควรมีการสุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 5-10% ถ้าพบเชื้อเจริญมากกว่า 2 colonies/plate ให้ทิ้งทั้งหมด

2.4.2 สีและน้ำยาต่างๆ

สีและน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียควรมีการตรวจสอบคุณภาพหรือคุณสมบัติก่อนใช้งาน หรือตามความเหมาะสม ซึ่งความถี่ในการทดสอบขึ้นอยู่กับความคงตัว (stability) ของสารนั้นๆ ถ้าสังเกตเห็นว่าสีที่ใช้ในการย้อมมีสีเปลี่ยนไปหรือน้ำยาที่ใช้มีความขุ่นหรือมีตะกอนไม่ควรนำมาใช้งาน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 305 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 7-3 เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพของสีและน้ำยาต่างๆ

Stain	Control organism[a]	ATCC[b] No.	Expected results	Frequency of testing
Acid-fast				
Fluorochrome	*Mycobacterium tuberculosis*	25177	Yellow-green florescing bacilli	Each lot and each day of use
Modified (Nocardia)	*Escherichia coli*	25922	No fluorescent bacilli	Each lot and each day of use
	Nocardia asteroides	19247	Pink-red bacilli	
	Streptomyces spp.		Blue bacilli	
Ziehl-Neelsen	*M. tuberculosis*	25177	Pink-red bacilli	Each lot and each day of use
	E. coli	25922	Blue bacilli	
Bacitracin disk	*Streptococcus pyogenes*	19615	Zone of inhibition	Each batch, lot number, and shipment
	Streptococcus agalactiae	12386	No zone of inhibition	
β-lactamase disks	*Staphylococcus aureus*	25923	Positive; red	Each lot and each day of use (other than cefinase)
	H. influenzae	10211	Negative; no color change	Each batch, lot number, and shipment (cefiase)
Catalase (3%H_2O_2)	*S. aureus*	25923	Positive (bubbles)	Each batch, lot number, and shipment
	S. pyogenes	19615	Negative (no bubbles)	
Coagulase	*S. aureus*	25923	Positive (any clotting)	Each batch, lot number, and shipment
	Staphylococcus epidermidis	12228	Negative (no clotting)	
Deoxycholate (10%) (bile solubility test)	*Streptococcus pneumoniae*	6305	Positive (lysis)	Each batch, lot number, and shipment
	Enterococcus faecalis	29212	Negative (no lysis)	
Ferric chloride (10%)	*Proteus vulgaris*	33420	Positive (green)	Each batch, lot number, and shipment
	Escherichia coli	25922	Negative (no color change)	
Flagellum	*Proteus mirabilis*	12453	Peritrichous flagella	Each lot and each use
	Klebsiella pneumoniae	13883	No flagella	
Gram	*E. coli*	25922	Gram-negative bacilli	Each lot and each day of use
	S. aureus	25923	Gram-positive cocci	

14-0992(001-354)editnew130158.indd 306 1/14/58 BE 3:51 PM

Stain	Control organism[a]	ATCC[b] No.	Expected results	Frequency of testing
Indole (spot, Kovacs, or Ehrlich)	*E.coli* *Pseudomonas aeruginosa*	25922 27853	Positive (color depends on reagent) Negative(no color change)	Each batch, lot number, and shipment
Methyl red	*E. coli* *K. pneumoniae*	25922 13883	Positive (red) Negative (no color change)	Each batch, lot number, and shipment
Nitrate reagents	*E. coli* *Acinetobacter baumannii*	25922 19606	Positive (red) Negative (no color change)	Each batch, lot number, and shipment
ONPG[c]	*E. coli* *Proteus mirabilis*	25922 29245	Positive (yellow) Negative (no color change)	Each batch, lot number, and shipment
Optochin disk (10 µg)	*S. pneumoniae* *E. faecalis*	6305 29212	Zone of inhibition ≥ 16mm No zone of inhibition	Each batch, lot number, and shipment
Oxidase	*P. aeruginosa* *E. coli*	27853 25922	Positive (red to blue-black) Negative (no color change)	Each batch, lot number, and shipment
Spore	*Bacillus* spp.		Spores stain one color and bacillus stains with counter stain	Each lot and each week of use
Voges-Proskauer	*Enterobacter cloacae* *E. coli*	13047 25922	Positive (red) Negative (no color change)	Each batch, lot number, and shipment
X,V, and XV disks or strips	*H. influenzae*	10211	Growth around XV and only between X and V when closely spaced	Each batch, lot number, and shipment

[a] Organisms recommended for QC testing of strains.

[b] ATCC, America Type Culture Collection

[c] orthonitrophenyl-β-galactosidase

14-0992(001-354)editnew130158.indd 307 1/14/58 BE 3:51 PM

2.4.3 Antiserum

ควรมีการบันทึกวันที่เมื่อได้รับ antiserum จากบริษัทผู้ขาย และเก็บในอุณหภูมิที่ระบุไว้ข้างขวด (4-8 ^{o}C) ถ้าเป็น lyophilized form ให้บันทึกวันที่เมื่อทำการละลายไว้บนฉลากด้วย ควรมีการตรวจสอบกับเชื้อ control ทุกครั้ง เมื่อได้รับจากบริษัทผู้ขายและควรตรวจสอบทุกเดือน หรือเมื่อมีกรณีที่สงสัย โดยทำการตรวจสอบทั้ง positive และ negative control organisms ห้ามนำมาใช้งานเมื่อ antiserum นั้นหมดอายุ

2.4.4 อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ควรมีการบำรุงรักษาให้มีการใช้งานได้ดีและมีประสิทธิภาพอย่างสม่ำเสมอ ควรมีการจัดทำแผนในการบำรุงรักษาและตรวจสอบประสิทธิภาพของอุปกรณ์เครื่องมือทุกชนิด ในห้องปฏิบัติการตามความเหมาะสมของการใช้งานของเครื่องมือนั้นๆ

Autoclave

- เปลี่ยนถ่ายน้ำ และทำความสะอาดใน chamber อย่างน้อยทุกสัปดาห์ หรือเมื่อมีอาหารเลี้ยงเชื้อหกลงใน chamber
- ก่อนใช้งานทุกครั้งให้ตรวจสอบระดับน้ำใน chamber ให้อยู่ในระดับที่กำหนด น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำกรอง ไม่ควรใช้น้ำประปา เพราะจะทำให้มีตะกรันจับที่ก้น chamber มาก
- การบันทึกเวลา อุณหภูมิ และความดันทุกครั้งที่ใช้งาน
- ตรวจสอบระบบการทำงานและประสิทธิภาพของเครื่อง autoclave สัปดาห์ละครั้ง หรืออย่างน้อยเดือนละครั้ง ขึ้นกับความถี่ของการใช้งาน โดยใช้ spore ของ *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ซึ่งอาจเป็น suspension ที่บรรจุใน ampule เช่น Kilit ampule (BBL), Sterikon-Bioindikator (Merck), Attest (3M) หรือ อาจเป็น spore strip ถ้าเครื่อง autoclave มีประสิทธิภาพดีจะทำลาย spore ของ *G. sterothermophilus* ได้
- เก็บรักษา spore ของ *G. sterothermophilus* ที่อุณหภูมิ 4-8 ^{o}C
- Autoclave indicator tape เป็น heat sensitive tape ที่ใช้เป็น indicator เพื่อแสดงว่าสิ่งของนั้นๆ ได้ผ่านขบวนการ autoclave แล้วเท่านั้นไม่ใช่เป็น tape ที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่อง autoclave โดย tape จะเปลี่ยนสีเมื่อถึงเวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสม
- จัดทำแผนในการสอบเทียบประสิทธิภาพโดยช่างเทคนิค

Centrifuge

- เช็ดทำความสะอาดภายในของเครื่องด้วย 70% alcohol ทุกสัปดาห์หรือทุกครั้งเมื่อมีสารหกหรือหลอดทดลองแตกขณะที่ปั่น

14-0992(001-354)editnew130158.indd 308 1/14/58 BE 3:51 PM

- ถ้าเป็นเครื่องปั่นที่ใช้แท่ง carbon brush ควรตรวจสอบเปลี่ยนแท่ง carbon ทุกปี หรือหากตรวจพบแท่ง carbon หดสั้นเกิน 1 cm ควรเปลี่ยนใหม่
- ตรวจสอบคุณภาพของขอบยาง ต้องติดเรียบกับเครื่องและมีคุณภาพไม่เสื่อมสภาพ
- ตรวจสอบฝาปิดของตัวเครื่อง ต้องปิดสนิท
- จัดทำแผนในการตรวจสอบ และสอบเทียบความเร็วรอบของการหมุนเหวี่ยง โดยช่างเทคนิค

Hot air oven (สำหรับ sterile เครื่องแก้ว)

- เช็ดทำความสะอาดภายในตู้ ทุกเดือน
- บันทึกอุณหภูมิทุกครั้งที่ใช้งาน ซึ่งปกติจะใช้งานในช่วง 155-165 ^{o}C
- ตรวจสอบ ประสิทธิภาพ sterility ทุก 3 เดือน โดยใช้ spore strip ของเชื้อ *Bacillus subtilis* var *niger* (*globigii*) ATCC 9372
- จัดทำแผนในการตรวจสอบระบบการทำงานโดยช่างเทคนิค

Incubator

- เช็คทำความสะอาดภายในตู้อย่างน้อยทุกเดือน
- จดบันทึก ระดับอุณหภูมิทุกวัน ก่อนเริ่มปฏิบัติงานประจำวัน และควรตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 35 ± 2 ^{o}C
- ตรวจสอบ และสอบเทียบอุณหภูมิของ incubator ก่อนนำมาใช้งานและจัดทำแผนในการตรวจสอบระบบการทำงานเป็นประจำ

Microscope

- เมื่อไม่ใช้งานควรหาผ้าหรือพลาสติกคลุมให้เรียบร้อย เพื่อป้องกันฝุ่นละออง
- หลังจากใช้งานในแต่ละวันทำความสะอาดตัวกล้องและเช็ดเลนส์ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ก่อนเก็บกล้อง ห้ามเช็ดด้วย alcohol หรือ acetone อย่างเดียวควรใช้ lens cleaning solution (diluted acid, isopropyl alcohol และ acetone)
- ไม่วางกล้องจุลทรรศน์ไว้ใกล้หน้าต่าง ที่แสงแดดส่องเข้าโดยตรง
- ไม่เก็บกล้องจุลทรรศน์ในที่ชื้น เพราะจะทำให้เกิดเชื้อราได้ง่าย และไม่เก็บรวมในที่ที่มีการจัดเก็บสารเคมี
- ถ้าสารเคมีหยดใส่ตัวกล้องหรือ stage ใช้ผ้านุ่มที่สะอาด ชุบน้ำพอหมาดๆ เช็ดทันที
- ไม่ให้ objective lens ชนิดหัว oil แช่อยู่ใน oil immersion บน slide เป็นเวลานานๆ หลังจากไม่ใช้แล้วให้หมุน objective lens ชนิดหัว oil เบี่ยงออกไป
- ไม่ให้ objective lens ชนิดที่ไม่ใช่ชนิดหัว oil จุ่มลงใน oil immersion

14-0992(001-354)editnew130158.indd 309 1/14/58 BE 3:51 PM

- ไม่ควรใช้นิ้วมือสัมผัส lens
- ก่อนนำ slide ออกจาก stage ควรหมุนให้ objective lens กำลังขยายต่ำสุดอยู่เหนือตรง slide เพื่อป้องกันไม่ให้ slide ขูด lens เป็นรอย
- จัดทำแผนการตรวจสอบสภาพโดยช่างผู้ชำนาญทุกปี

Refrigerator

- ทำความสะอาดภายในตู้ทุก 2 เดือน หรือหลังจากมีการซ่อมบำรุง
- สิ่งของต่างๆ จัดวางเป็นหมวดหมู่เป็นระเบียบเรียบร้อย เพื่อความความสะดวกในการนำไปใช้งาน และถ้าน้ำยาใดหมดอายุหรือเสื่อมสภาพให้กำจัดทิ้งไป
- บันทึกอุณหภูมิของตู้เย็นทุกวัน อุณหภูมิควรอยู่ระหว่าง 2-8 ^{o}C
- จัดทำแผนในการตรวจสอบระบบการทำงานเป็นประจำ

Water bath

- ทำความสะอาดภาย chamber ทุกสัปดาห์หรือย่างน้อยทุกเดือน
- น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำกลั่น และตรวจสอบระดับน้ำภายใน chamber ก่อนใช้งานทุกครั้ง
- บันทึกอุณหภูมิและการใช้งานทุกครั้ง
- จัดทำแผนในการตรวจสอบระบบการทำงานเป็นประจำ

ตารางที่ 7-4 การบำรุงรักษาอุปกรณ์เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

Equipment	Routine care	Monitoring	Technical Maintenance and inspection
Anaerobic Jar	Clean inside of jar each week Reactivate catalyst after each run (160 ^{o}C, 2hrs) Replace catalyst every 3 months	Use methylene blue indicator strip with each run Note and record decolorization time of indicator each week	Inspect gasket sealing in the lid weekly
Autoclave	Clean and change water monthly	Check and adjust water level before each run Record time and temperature or pressure for each run Record performance with spore once a week	Every 6 months
Centrifuge	Wipe inner walls with antiseptic solution weekly or after breakage of glass tubes or spillage		Replace brushes annually

14-0992(001-354)editnew130158.indd 310 1/14/58 BE 3:51 PM

Equipment	Routine care	Monitoring	Technical Maintenance and inspection
Hot-air oven for sterilization of glassware	Clean inside monthly	Record time and temperature for each run	Every 6 months
Incubator	Clean inside walls and shelves monthly	Record temperature at the start of each working day (allowance 35 ± 2 °C)	Every 6 months
Microscope	Wipe lenses with lens paper after each day's work Clean and lubricate mechanical stage Weekly Protect with dust cover when not in use	Check alignment of condenser monthly	Annually
Refrigerator	Clean and defrost every 2 months and after power failure	Record temperature on first day of each week (allowance 2-8 °C)	Every 6 months
Water-bath	Wipe inside walls and change water monthly	Check water level daily Record temperature on first day of each week (allowance 54-57 °C)	Every 6 months

หมายเหตุ - ใช้ spore ของเชื้อ *Geobacillus sterothermophilus* ATCC 7953 ในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง autoclave

- ใช้ spore ของเชื้อ *Bacillus subtilis* var *niger* (*globigii*) ATCC 937 ในการทดสอบประสิทธิภาพของตู้ Hot air oven

3. กระบวนการหลังการตรวจวิเคราะห์

3.1 การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการควรมีการจัดทำคู่มือแนวทางในการบันทึกข้อมูลการรายงานผลของห้องปฏิบัติการ มีการกำหนดคุณสมบัติของผู้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์และผู้ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ มีนโยบายในการเก็บรักษาความลับของผลการวิเคราะห์ ของผู้ป่วย และข้อมูลต่างๆ ต้องสามารถสอบกลับได้ การรายงานผลการวิเคราะห์ต้องรายงานภายในระยะเวลาที่กำหนด รวมถึงกำหนดนโยบายในการแก้ไขข้อบกพร่องที่ตรวจพบและแนวทางในการป้องกันไม่ให้เกิดข้อบกพร่องซ้ำ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 311 1/14/58 BE 3:51 PM

3.2 การเก็บรักษาสิ่งตรวจ

ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดเกณฑ์ที่เหมาะสมในการจัดเก็บรักษาสิ่งตรวจแต่ละประเภท หลังจากการตรวจวิเคราะห์แล้วเพื่อนำสิ่งตรวจมาวิเคราะห์ซ้ำในกรณีที่อาจเกิดปัญหา

3.3 การทำลายสิ่งตรวจ

ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดวิธีที่เหมาะสมในการทำลายสิ่งตรวจและวัตถุทดสอบที่ไม่ใช้แล้วก่อนนำไปทิ้ง

เอกสารอ้างอิง

1. Forbes BA, SAhm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic microbiology. 11th ed. St. Louis: Mosby Inc.; 2002.
2. Garcia L.S. Clinical Microbiology Procedure Handbook 3rd ed. American Society for Microbiology Prss, Washington, DC; 2010.
3. International Organization for Standardization (ISO) 15189 Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence 1st ed; 2003.
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington D.C.: ASM Press; 1995.
5. Sonnenwirth AC, Jarett L. Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 8th ed. Missouri: The C.V. Publishing Mosby Company: 1980.
6. Treagan L, Pulliam L. Medical Microbiology Laboratory Procedures. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1982.
7. Vandepitte J, Engbaek K, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedure in clinical bacteriology. World Health Organization: Geneva; 1991.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 312 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 8
การทวนสอบผล

มาลัย วรจิตร

หลักการ การทวนสอบผลเป็นขั้นตอนการตรวจสอบผลที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการมาตรวจสอบความถูกต้องก่อนรายงานผลให้ผู้ใช้บริการ โดยนำความรู้ที่มีมาประมวลใช้ การทวนสอบผลต้องครอบคลุมตั้งแต่ความถูกต้องในการเขียนรายงาน ผลที่ได้มีความขัดแย้งกันหรือไม่ ถ้ามีจะต้องตรวจสอบในรายละเอียดที่บันทึกไว้

ขอบเขต ครอบคลุมการทวนสอบผลการทดสอบก่อนรายงานผล ซึ่งรวมการตรวจสอบทุกขั้นตอนตั้งแต่การดูความถูกต้องของการเขียนรายงาน ความสอดคล้องของผลการตรวจเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ การวินิจฉัยเชื้อ ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

วิธีปฏิบัติงาน

1. ตรวจสอบความถูกต้องของรายงานว่า ไม่สะกดผิด ในกรณีที่รายงานผลด้วยคอมพิวเตอร์เมื่อบันทึกข้อมูลเรียบร้อยแล้วต้องอ่านทวนก่อนที่จะส่งรายงานผลออกไป เพราะอาจเกิดความผิดพลาดในการบันทึกข้อมูล เช่น การกด enter ชื่อเชื้อผิดบรรทัด เป็นต้น
2. ต้องกำหนดว่า “เชื้อ/ผลความไวที่พบไม่บ่อยต้องแจ้งหัวหน้า/ผู้ที่ระบุ และต้องเก็บสไลด์การย้อมแกรม จานเพาะเชื้อ และการทดสอบทั้งหมดไว้จนกว่าจะรายงานผลเสร็จสิ้นและสามารถเรียกดูได้” เมื่อพบการรายงานเชื้อ/ผลความไวที่พบได้น้อยผู้ทวนสอบต้องดูสไลด์การย้อมแกรม จานเพาะเชื้อและการทดสอบทั้งหมด เพื่อสรุปว่าผลที่รายงานถูกต้องหรือไม่
3. ความสอดคล้องของผลการย้อมแกรมและผลการเพาะเชื้อที่ได้ เช่น การย้อมหนองจากตับของผู้ป่วยพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งขนาดเล็ก ติดสีหัวท้ายคล้ายเข็มกลัดซ่อนปลาย ผลการเพาะเชื้อได้ *Staphylococcus* coagulase positive ผลที่ได้นี้ไม่น่าจะถูกต้อง การอ่านผลการย้อมแกรมผู้อ่านผลควรนึกต่อไปว่าควรเป็นเชื้อใด ถ้าผลการเพาะเชื้อไม่ได้ตามที่คาดหมายควรพิจารณาต่อไปว่าเป็นไปได้หรือไม่ ถ้าเป็นไปไม่ได้ควรกลับไปดูสไลด์การย้อมแกรมใหม่และวิเคราะห์หาสาเหตุ หากไม่สามารถรับความขัดแย้งที่ได้ควรข้อให้ผู้ใช้บริการส่งสิ่งตรวจซ้ำ การสลับสิ่งตรวจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผลการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์มีความขัดแย้งกับผลการเพาะเชื้อ

4. ผลการยืนยันเชื้อสอดคล้องกับลักษณะจำเพาะ (key characteristic) ของเชื้อนั้นหรือไม่ การวินิจฉัยแบคทีเรียต้องคำนึงถึงลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละ genus/species เช่น
   - *Bacillus anthracis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง catalase บวก ไม่เคลื่อนไหว และไม่ hemolyse เลือด
   - *Brucella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งขนาดเล็ก (fine sand appearance) ขึ้นได้ไม่ดีบน BA ไม่เกิด satellite phenomenon, oxidase ให้ผลลบ catalase ให้ผล weakly positive, β-lactamase บวก และ urease test บวก
   - *Francisella tularensis* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งขนาดเล็ก ขึ้นได้ไม่ดีหรือไม่ขึ้นบน BA ไม่เกิด satellite phenomenon, oxidase, catalase และ urease test ลบ
   - *Neisseria* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ cocci อยู่เป็นคู่ oxidase บวก DNase ลบ
   - *Morganella morganii* และ *Proteus* spp. ให้ผล lysine deaminase/phenylalanine deaminase บวก urease ให้ผลบวกภายใน 4 ชม. ยกเว้น *Proteus inconstans* ดื้อต่อ colistin/polymyxin B
   - *Providencia* spp. ให้ผล lysine deaminase/phenylalanine deaminase บวก urease ลบ/ไม่แน่นอน
   - *Erysipelothrix rhusiopathiae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งไม่มีสปอร์ บน BA โคโลนีเป็น non-hemolysis ไม่สร้างเอนไซม์ catalase ให้ H_2S ใน TSI
   - *Rhodococcus equi* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก coccobacilli (คล้ายหยดน้ำ) โคโลนีมี pigment สีชมพู (salmon pink) ติดสี modified acid fast bacilli stain
   - *Roseomonas* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งส่วนใหญ่เป็น cocci อยู่เป็นคู่หรือสายสั้นๆ ไม่มีช่องว่างในเซลล์ ส่วนใหญ่ขึ้นบน MAC โคโลนีเป็นมูกมี pigment สีชมพู ไม่ย่อยสลายน้ำตาล (non-fermenters), oxidase weakly positive (หลัง 30 วินาที)/catalase ลบและ urease บวก
   - *Methylobacterium* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งมีช่องว่างในเซลล์ โคโลนีแห้งมี pigment สีชมพู ส่วนใหญ่ไม่ขึ้นบน MAC ไม่ย่อยสลายน้ำตาล (non-fermenters) สามารถใช้ methanol เป็นแหล่งของ carbon, oxidase บวก และ urease ลบ เป็นต้น
5. ความถูกต้องของผลความไวที่ได้ แผนความไวของแบคทีเรียหมายถึงความไวของแบคทีเรียต่อชุดของสารต้านจุลชีพซึ่งแบคทีเรียบางชนิดมีความไวที่จำเพาะ จึงสามารถนำมาใช้ในการทวนสอบผลความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ และ/หรือทวนสอบผลการตรวจยืนยันเชื้อ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 314 1/14/58 BE 3:51 PM

การจัดทำโครงการสำหรับตรวจสอบแผนความไว ก่อนที่จะทำการตรวจสอบแผนความไวของแบคทีเรีย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจำต้องรู้

1. การดื้อสารต้านจุลชีพที่เป็น intrinsic resistance เช่น

ตารางที่ 8-1 Intrinsic resistance ของ *Enterobacteriaceae*

Antimicrobial Agents / **Organism**	**Ampicillin**	**Amoxicillin clavulinic**	**Ampicillin sulbactam**	**Piperacillin**	**Ticarcillin**	**Cephalosporin I***	**Cephamycins****	**Cephalosporin II*****	**Tetracycline**	**Nitrofurantoin**	**Polymyxin B, Colistin**
Citrobacter freundii	R	R	R								
Citrobacter koseri	R	R	R								
Enterobacter aerogenes	R	R	R								
Enterobacter cloacae	R	R	R								
Escherichia coli	There is no intrinsic resistance to β-lactam in this organism										
Escherichia hermannii	R				R						
Hafnia alvei	R	R	R			R	R				
Klebsiella pneumoniae	R				R						
Morganella morganii	R	R				R		R	R	R	R
Proteus mirabilis	There is no intrinsic resistance to β-lactam in this organism								R	R	R
Proteus penneri	R					R		R	R	R	R
Proteus vulgaris	R					R		R	R	R	R
Providencia rettgeri	R	R				R			R	R	R
Providencia stuartii	R	R				R			R	R	R
Salmonella and *Shigella* spp.	There is no intrinsic resistance to β-lactam in these organism										
Serratia marcescens	R	R	R			R	R	R		R	R
Yersinia enterocolitica	R	R			R	R					

* cefazolin, cephalothin ** cefoxitin, cefotetan *** cefuroxime

บทที่ 8

14-0992(001-354)editnew130158.indd 315 1/14/58 BE 3:51 PM

2. แผนความไวที่จำเพาะ เช่น แผนความไวจำเพาะของเชื้อ *Staphylococcus* คือ ดื้อ penicillin, ไว clindamycin, erythromycin, oxacillin, และ vancomycin เป็นต้น

3. ความสัมพันธ์ของสารต้านจุลชีพที่ทดสอบ เช่น การออกฤทธิ์ การจัดระดับ

3.1 Penicillins

3.1.1 เชื้อ *Enterobacteriaceae*

piperacillin = mezlocillin > ticarcillin > carbenicillin

3.1.2 เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

piperacillin > mezlocillin = ticarcillin > carbenicillin

3.1.3 เชื้อ *Staphylococcus* spp. ที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase ดื้อต่อ penicillinase-susceptible penicillins เช่น ampicillin, amoxicillin, penicillin, carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, ticarcillin เป็นต้น

3.2 Cephalosporins

3.2.1 *Enterobacteriaceae*

4^{th}(cefipime) $\geq 3^{rd} > 2^{nd} > 1^{st}$

3.2.2 *Staphylococcus* spp. (oxacillin-susceptible)

$1^{st} > 2^{nd} > 3^{rd} = 4^{th}$

3.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* (มีเพียง 3rd เท่านั้นที่ใช้ได้)

cefipime ≥ ceftazidime > cefoperazone > ceftizoxime = cefotaxime = ceftriaxone aztreonem (monobactem) มีฤทธิ์น้อยกว่า ceftazidime

3.3 Aminoglycosides

3.3.1 *Enterobacteriaceae*

amikacin > tobramycin > gentamicin = netilmycin

3.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

amikacin > tobramycin > gentamicin = netilmycin

3.4 Quinolones

3.4.1 *Enterobacteriaceae*

ciprofloxacin > levofloxacin > ofloxacin > norfloxacin > cinofloxacin = nalidixic acid

3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

ciprofloxacin > levofloxacin > ofloxacin > norfloxacin

14-0992(001-354)editnew130158.indd 316 1/14/58 BE 3:51 PM

3.5 อื่นๆ

3.5.1 เชื้อที่ดื้อ imipenem อาจไม่ดื้อ β-lactam อื่นเพราะเอนไซม์ imipenemases ทำลายเฉพาะ imipenem

3.5.2 การดื้อ imipenem ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* พบได้น้อย

4. ข้อยกเว้น

4.1 แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งอาจสร้าง เอนไซม์ extended-spectrum β-lactamases ซึ่งทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins

4.2 *Serratia marcescens* อาจไว gentamicin มากกว่า tobramycin หรือ amikacin เนื่องจากเอนไซม์ที่ไปทำลาย aminoglycoside ที่สร้าง

4.3 บางครั้งแบคทีเรียแกมลบรูปแท่งอาจสร้างเอนไซม์ที่ไปทำลาย aminoglycoside หลายชนิดรวมกัน เช่น เชื้อ *Enterobacteriaceae* อาจสร้างเอนไซม์ไปทำลาย gentamicin, tobramycin และ amikacin แต่ไม่ทำลาย netilmicin เป็นต้น

5. เมื่อมีการดื้อสารต้านจุลชีพที่ผิดปกติเกิดขึ้น เช่น พบการระบาดของเชื้อ *Providencia rettgeri* ที่ดื้อ gentamicin ที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อในโรงพยาบาลในแผนกศัลยกรรม เป็นต้น

6. ระบุผลความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพที่ต้องให้ความระวังเป็นพิเศษ เพราะการรายงานผลผิดจะมีผลต่อการรักษาผู้ป่วย เช่น

6.1 เชื้อ *E. coli* หรือ *Klebsiella* spp. ที่ดื้อ 3rd generation cephalosporins

6.2 เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อ gentamicin (tobramycin และ amikacin)

6.3 เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อ imipenem ในผู้ป่วย ICU

6.4 เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อ ciprofloxacin

6.5 เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อ gentamicin, tobramycin และ amikacin

6.6 เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากปัสสาวะดื้อ ciprofloxacin

6.7 เชื้อ *Staphylococcus aureus* ดื้อ oxacillin (MRSA)

6.8 เชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ที่แยกได้จากน้ำไขสันหลังไม่ไวต่อ penicillin

6.9 เชื้อ *Streptococcus* viridans จากผู้ป่วย endocarditis ดื้อหรือไวปานกลางต่อ penicillin

6.10 เชื้อ *Enterococcus* ที่ดื้อ ampicillin, vancomycin และ/หรือ high level gentamicin

6.11 เชื้อที่แยกได้จากน้ำไขสันหลังที่ดื้อ 3rd generation cephalosporins

6.12 เชื้อแกรมบวกดื้อ vancomycin

6.13 เชื้อที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษา

14-0992(001-354)editnew130158.indd 317 1/14/58 BE 3:51 PM

การทวนสอบแผนความไวที่ไม่ปกติ

1. ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลที่รายงาน
2. อ่านผลการทดสอบ disk diffusion test/MIC ใหม่ ตรวจสอบให้แน่ใจว่าเชื้อที่ใช้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ เป็นต้น เพราะ
   2.1 ปัญหาบางอย่างอาจถูกมองข้ามไปในการอ่านผลครั้งแรก
   2.2 การตรวจสอบจานเพาะเชื้อ/panel (สำหรับเครื่องอัตโนมัติ) อาจจะเห็นว่าในบางหลุมไม่ได้ใส่เชื้อลงไปก็ได้
   2.3 ถ้ามีเชื้อน้อยเกินไปอาจทำให้ได้ผล false susceptible
   2.4 ในกรณีที่ใช้ MHA + 5% sheep blood เวลาอ่านผลต้องวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ไม่ใช่เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition of hemolysis
3. ตรวจสอบผลครั้งที่แล้วของผู้ป่วยรายนี้ ว่าพบแผนความไวที่ผิดปกติหรือไม่
4. ถ้าจำเป็นทำการทดสอบความไว และตรวจยืนยันเชื้อใหม่
5. ส่งตรวจห้องปฏิบัติการอ้างอิงเกี่ยวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเพื่อยืนยันผลความไวที่ไม่ปกติ เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ดื้อ vancomycin, เชื้อ *Haemophilus influenzae* ดื้อ cefotaxime เป็นต้น และถ้าผลที่ได้ยืนยันว่าพบการดื้อสารต้านจุลชีพดังกล่าวจริงควรแจ้งให้กระทรวงสาธารณสุขทราบ
6. ในกรณีที่ต้องมีการตรวจยืนยันผลความไวที่ไม่ปกติ ถ้าต้องใช้เวลานานควรแจ้งให้แพทย์/ผู้ใช้บริการทราบ
7. ควรระลึกเสมอว่าการทดสอบความไวบางครั้งอาจได้ผลคลาดเคลื่อนบ้าง การได้ผล false resistant ดีกว่าการได้ผล false susceptible ระวังอย่าใช้เชื้อน้อยกว่ามาตรฐานในการทดสอบ (under inoclum)

ตารางที่ 8-2 การดื้อสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ (intrinsic resistance)

Antimicrobial	Microorganisms
Cefoxitin	*C. freundii*, *C. difficile*, *Enterobacter* spp.
Imipenem	*Stenotrophomonas maltophilia*
Vancomycin	*E. rhusiopathiae*, *Lactobacillus* spp., *Nocardia* spp., *Pediococcus* spp., gram-negative bacteria

14-0992(001-354)editnew130158.indd 318 1/14/58 BE 3:51 PM

ตารางที่ 8-3 การดื้อสารต้านจุลชีพที่เป็นไปไม่ได้

Microorganisms	Resistant phenotypes
Group A, C, G Streptococci	Penicillin^{R}
Enterococci	Teicoplanin^{R}, vancomycin^{S}
P. vulgaris, *Serratia* spp.	Cefuroxime^{S}
Enterobacteriaceae	Broad-spectrum cephalosporin^{R}, CP^{S}, AP^{S}
Proteus spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp.	Colistin^{S}
Gram-positive cocci	Gentamicin^{R}, other aminoglycoside^{S}
Gram-positive cocci	Minocycline^{R}, tetracycline^{S}
Staphylococcus aureus	Oxacillin^{R}, penicillin^{S}
Staphylococcus aureus	Oxacillin^{R}, cephalosporins^{S}

ตารางที่ 8-4 ตัวอย่างการดื้อสารต้านจุลชีพที่พบได้น้อย

Microorganisms	Phenotype
Staphylococcus aureus	Vancomycin^{R}
Enterococci	Penicillin resistance by β-lactamase production
Neisseria meningitidis	Penicillin resistance by β-lactamase production
Bacteroides fragilis	Metronidazole^{R}
Enterobacteriaceae	Imipenem^{R}

ตัวอย่างการดื้อสารต้านจุลชีพที่ไม่ปกติ

ตัวอย่างที่ 1

Enterobacter cloacae	
Ampicillin	S
Cephalothin	S
Gentamicin	S
Imipenem	S

14-0992(001-354)editnew130158.indd 319 1/14/58 BE 3:51 PM

เชื้อ *Enterobacter cloacae* ดื้อ ampicillin และ cephalothin (intrinsic resistance) การที่ได้ผล susceptible อาจเกิดจากการใช้เชื้อน้อยเกินไปหรือวินิจฉัยเชื้อผิด

ตัวอย่างที่ 2

Enterobacter cloacae	
Amikacin	S
Ampicillin	R
Cephalothin	R
Gentamicin	R
Tobramycin	S
Imipenem	R

เชื้อ *Enterobacter cloacae* ที่ดื้อ imipenem พบได้น้อยมาก imipenem เป็นสารต้านจุลชีพที่สลายตัวง่ายในห้องปฏิบัติการ ควรทำการทดสอบซ้ำโดยใช้ disk ยา lot ใหม่เพื่อยืนยันว่าดื้อจริงหรือไม่ก่อนรายงานผล

ตัวอย่างที่ 3

Klebsiella pneumoniae	
Ampicillin	R
Cephalothin	R
Ceftazidime	R
Cefotaxime	S
Gentamicin	R
Imipenem	S

เชื้อ *E. coli* และ *Klebsiella* spp. ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs พบเพิ่มขึ้น การพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อ ceftazidime ควรตรวจหาเอนไซม์ ESBLs (confirmatory test) ถ้าได้ผลบวก ต้องรายงานว่าดื้อต่อสารต้านจุลชีพในกลุ่ม β-lactam ยกเว้น cephamycins (cefoxitin และ cefotetan) และ carbapenems (imipenem, meropenem และ ertapenem)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 320 1/14/58 BE 3:51 PM

ตัวอย่างที่ 4

Pseudomonas aeruginosa	
Ampicillin	S
Ceftazidime	S
Gentamicin	S
Amikacin	S
Imipenem	S

ไม่รายงานผล ampicillin สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* เพราะเชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อ ampicillin (ใช้รักษาไม่ได้ผล) ผลที่ได้อาจเกิดจากเชื้อเจริญไม่เต็มที่ทำให้ไวสารต้านจุลชีพอื่นๆด้วยจึงควรตรวจสอบทั้งหมดไม่ใช่ไม่รายงานผล ampicillin เท่านั้น

ตัวอย่างที่ 5

Stenotrophomonas maltophilia	
Amikacin, gentamicin, tobramycin	R
Ceftazidime	R
Ciprofloxacin	R
Imipenem	R
Trimethoprim/sulfamethoxazole	R

Trimethoprim/sulfamethoxazole เป็นสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *S. maltophilia* ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อสารต้านจุลชีพอื่นเกือบทั้งหมด การดื้อ Trimethoprim/sulfamethoxazole พบได้ไม่บ่อย สารต้านจุลชีพที่อาจใช้ในการรักษาอื่นๆได้แก่ ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidime, minocycline และ fluoroquinolones

14-0992(001-354)editnew130158.indd 321 1/14/58 BE 3:51 PM

ตัวอย่างที่ 6

Acinetobacter baumannii	
Amikacin	R
Ampicillin	R
Ampicillin/sulbactam	S
Gentamicin	R
Tobramycin	R
Netilmicin	S

Acinetobacter อาจดื้อต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้กับแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด sulbactam ที่ผสมอยู่กับ ampicillin มีฤทธิ์ต่อ *Acinetobacter* หลายสายพันธุ์และมีประโยชน์ในการใช้รักษาผู้ป่วย *Acinetobacter* มีผลความไวต่อ aminoglycosides ที่ไม่ปกติคือ มักดื้อต่อ aminoglycoside เกือบทุกชนิด ยกเว้น netilmicin สายพันธุ์ที่ดื้อสารต้านจุลชีพหมดอาจใช้ polymyxin ในการรักษาผู้ป่วย *A. baumannii* ดื้อสารต้านจุลชีพมากกว่า *A. lwoffii*

ตัวอย่างที่ 7

Staphylococcus aureus	
Ampicillin/sulbactam	S
Cephalothin	S
Clindamycin	R
Erythromycin	R
Oxacillin	R
Penicillin	R
Vancomycin	S

เชื้อ *Staphylococcus* ที่ดื้อ oxacillin ต้องดื้อ สารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam ทั้งหมดรวมถึง β-lactam ที่มี β-lactamase inhibitor

14-0992(001-354)editnew130158.indd 322 1/14/58 BE 3:51 PM

ตัวอย่างที่ 8

Staphylococcus aureus	
Cephalothin	S
Clindamycin	S
Erythromycin	S
Oxacillin	S
Penicillin	R
Vancomycin	R

เชื้อ *Staphylococcus* ที่ดื้อ vancomycin ในปัจจุบันนี้ยังพบได้น้อยมาก หากได้เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อ vancomycin จึงควรทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดสอบ เพราะนอกจากจะใช้เป็นข้อมูลในการรักษาผู้ป่วยยังใช้เป็นข้อมูลการเฝ้าระวังเชื้อดื้อสารต้านจุลชีพที่สำคัญ

ตัวอย่างที่ 9

Staphylococcus aureus	
Cephalothin	S
Clindamycin	R
Erythromycin	R
Oxacillin	S
Penicillin	R
Vancomycin	S

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อ clindamycin และ erythromycin มักเป็นเชื้อที่ดื้อ oxacillin ควรตรวจสอบใหม่

ตัวอย่างที่ 10

Streptococcus pneumoniae	
Erythromycin	S
Oxacillin	S (23 mm)
Penicillin	S
Tetracycline	S

14-0992(001-354)editnew130158.indd 323 1/14/58 BE 3:51 PM

ใช้ oxacillin 1 μg/disk ในการทดสอบความไวของเชื้อ *S. pneumoniae* ต่อ penicillin ถ้าได้ เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ≥ 20 mm ให้รายงานว่าไว penicillin ถ้าได้เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ≤ 19 mm หา MIC ของเชื้อต่อ penicillin เพื่อดูว่าเชื้อดื้อปานกลางหรือไวต่อ penicillin บางสายพันธุ์อาจได้เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ≤ 19 mm แต่ได้ MIC 0.06 μg/ml ซึ่งไวต่อ penicillin เชื้อ *S. pneumoniae* ที่ได้ เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ≥ 20 mm สามารถรายงานว่าไวต่อสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam ทำการหา MIC ของ cefotaxime ในเชื้อ *S. pneumoniae* ที่ ดื้อ penicillin

ตัวอย่างที่ 11

Staphylococcus aureus	
Cephalothin	S
Clindamycin	S
Erythromycin	S
Oxacillin	S
Penicillin	R
Piperacillin	S
Vancomycin	S

Staphylococcus spp. ที่ดื้อ penicillin จะดื้อต่อ penicillin ที่ถูกทำลายด้วย β-lactamases คือ ampicillin, amoxicillin และ extended-spectrum penicillins เช่น carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, และ ticarcillin ในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการให้ใช้ penicillin เป็นตัวแทนของสารต้านจุลชีพกลุ่มนี้ และไม่ทดสอบกับ extended-spectrum penicillins เพราะอาจได้ผล false susceptible

ตัวอย่างที่ 12

Streptococcus pneumoniae	
Erythromycin	S
Cefotaxime	R
Penicillin	S
Tetracycline	S

เชื้อ *S. pneumoniae* ที่ไว penicillin จะไวต่อ β-lactam อื่นด้วย ไม่ทดสอบ cefotaxime หรือ ceftriaxone กับเชื้อ *S. pneumoniae* โดยวิธี disk diffusion method

14-0992(001-354)editnew130158.indd 324 1/14/58 BE 3:51 PM

ตัวอย่างที่ 13

Streptococcus viridans		
Cephalothin	<0.5	S
Penicillin	0.5	I
Vancomycin	0.5	S

ค่า MIC ของเชื้อ *Streptococcus* viridans ในผู้ป่วย endocarditis ใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วย เชื้อที่ไวจะมี MIC ≤ 0.12 μg/ml อาจใช้ penicillin เพียงอย่างเดียว แต่ถ้า MIC > 0.12 μg/ml ในการรักษาต้องเพิ่ม aminoglycoside เชื้อที่มี MIC >2.0 μg/ml อาจใช้ vancomycin ในการรักษา วิธี disk diffusion ไม่ใช่วิธีที่เหมาะจะใช้ทดสอบความไวของเชื้อ *Streptococcus* viridans

ตัวอย่างที่ 14

Enterococcus faecalis	
Ampicillin	S
Cefotaxime	S
Trimethoprim/sulfamethoxazole	S
Vancomycin	S

เชื้อ *Enterococcus* อาจได้ผลไว cephalothin และ trimethoprim/sulfamethoxazole แต่การรักษาผู้ป่วยไม่ได้ผล จึงไม่ควรทำการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. Janet Hindler. Antimicrobial Susceptibility Testing. WHO Workshop on Antimicrobial Susceptibility Testing, Viet Nam, October 1998.
2. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H Jorgensen, Michael A. Pfaller and Robert H. Yolken. Manual of Clinical Microbiology 8th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2003. p. 331-808.
3. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 325 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 9
บทบาทของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ในด้านการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

กำธร มาลาธรรม

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล มีความสำคัญต่อผลการรักษาผู้ป่วย คือทำให้ผู้ป่วยต้องใช้เวลาอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น เสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น หรืออาจเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ บุคลากรยังมีโอกาสที่จะรับเชื้อก่อโรคจากผู้ป่วยได้ ดังนั้น โรงพยาบาลจึงต้องกำหนดกระบวนการควบคุมและป้องกันมิให้ผู้ป่วยที่มารับบริการของโรงพยาบาลเกิดการติดเชื้อขึ้น รวมทั้งต้องมีมาตรการป้องกันมิให้บุคลากรติดเชื้อจากผู้ป่วย โดยกระบวนการต่าง ๆ คือ

1. การเฝ้าระวังการติดเชื้อของผู้ป่วย
2. การสอบสวนการระบาดของโรค
3. การควบคุมการระบาดของเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug-resistant bacteria) ซึ่งเป็นปัญหาที่รุนแรงมากขึ้น
4. การกำหนดและติดตามให้บุคลากรปฏิบัติ เพื่อลดอัตราการติดเชื้อในระบบอวัยวะต่าง ๆ ของผู้ป่วย

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ และการลดอัตราการติดเชื้อ ได้แก่ การส่งเสริมให้บุคลากรทำความสะอาดมืออย่างถูกต้อง การทำหัตถการด้วยความระมัดระวังมิให้เกิดการปนเปื้อน การแยกผู้ป่วย การกำจัดเชื้อในเครื่องมือทางการแพทย์ และการทำความสะอาดสิ่งแวดล้อม จะเห็นได้ว่า การควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลให้ได้ผลดี จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพ บทบาทของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในด้านนี้ ได้แก่

1. การวินิจฉัยชนิดของเชื้อก่อโรค หากห้องปฏิบัติการสามารถในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้ถูกต้องรวดเร็ว ย่อมทำให้แพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยสั่งการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้โอกาสที่เชื้อจะแพร่ระบาดลดน้อยลง และหากเป็นเชื้อดื้อยา ผู้ปฏิบัติงานด้านการควบคุมโรคติดเชื้อ จะสามารถกำหนดมาตรการแยกผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคที่ถูกต้อง ทำให้การควบคุมการระบาดเป็นไปอย่างเหมาะสม เช่น ถ้าเพาะเชื้อได้ *Pseudomonas* spp.โดยไม่มีการระบุ species ของเชื้อให้ชัดเจน อาจทำให้เข้าใจว่ามีการระบาด แต่หากทราบว่าเป็น species ต่างกัน ก็ย่อมไม่ถือว่าเป็นการระบาด เป็นต้น

2. การช่วยยืนยันการวินิจฉัยการติดเชื้อ เช่น การติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง บางครั้งแพทย์อาจต้องการทราบจำนวนเชื้อ ซึ่งต้องอาศัย quantitative culture การวินิจฉัยการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการใช้สายสวนหลอดเลือดดำ ซึ่งมีทั้งโดยการเพาะเชื้อจากปลายสายสวน และการเพาะเชื้อจากเลือดที่ได้จากหลอดเลือดดำเส้นอื่น ที่ได้มาพร้อมกับเลือดที่ดูดผ่านสายสวนหลอดเลือด และเปรียบเทียบจำนวนเชื้อ (ซึ่งต้องใช้เวลามาก) หรือเทียบระยะเวลาที่ตรวจพบเชื้อ หากทำการเพาะเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automatic continuous monitoring blood culture systems) การทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้อง ทำให้ข้อมูลการติดเชื้อในโรงพยาบาลมีความน่าเชื่อถือได้มากขึ้น
3. การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ และรวบรวมทำเป็นสถิติ เพื่อติดตามความเปลี่ยนแปลงของอัตราการดื้อยาของเชื้อก่อโรคที่สำคัญ (antibiogram) ทำให้แพทย์เลือกใช้ยาได้เหมาะสมยิ่งขึ้นโดยอาศัยสถิติที่รวบรวมไว้มาคาดการณ์ความไวของเชื้อ และเลือกยาให้กับผู้ป่วยก่อนที่การทดสอบเชื้อจากผู้ป่วยรายนั้น ๆ จะเสร็จสิ้นและทำการปรับเปลี่ยนชนิดของยาต้านจุลชีพให้เหมาะสมอีกครั้งหนึ่ง
4. การติดตามแนวโน้มการดื้อยาของเชื้อก่อโรคมีความสำคัญอย่างยิ่งทั้งในด้านการรักษาและการป้องกัน ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาควรประสานงานกับคณะกรรมการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลอย่างใกล้ชิดในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหาในโรงพยาบาล ด้วยการมีระบบการแจ้งข้อมูลให้คณะกรรมการฯ อย่างต่อเนื่อง และหากพบเชื้อที่แบบแผนความไวต่อสารต้านจุลชีพแปลกไปจากที่ควรจะเป็น หรือไม่เคยพบมาก่อนในโรงพยาบาลนั้นๆ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ควรตรวจสอบให้แน่ชัดว่าผลการทดสอบนั้นถูกต้อง จากนั้นให้แจ้งผู้เกี่ยวข้อง ทั้งในโรงพยาบาลแห่งนั้นและห้องปฏิบัติการส่วนกลาง เช่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทราบ เพื่อดำเนินการทดสอบยืนยัน และหามาตรการควบคุมการระบาดของเชื้อที่พบตามความเหมาะสมของระดับความรุนแรงและลักษณะการบริการของสถานพยาบาลแต่ละแห่ง เชื้อลักษณะดังกล่าว เช่น vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci และ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* เป็นต้น
5. การควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยา นอกจากการติดตามแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงแบบแผนความไวของเชื้อก่อโรคต่อสารต้านจุลชีพแล้ว บางครั้งยังอาจจะต้องทำการเพาะเชื้อเพิ่มเติมเป็นกรณีพิเศษ คือ การทำ surveillance culture
   5.1 การเพาะเชื้อจากผู้ป่วยที่รักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล โดยทั่วไป เราจะทราบว่าผู้ป่วยรายใดมีเชื้อดื้อยา colonize อยู่ หรือมีการติดเชื้อหรือไม่ จากการที่แพทย์สงสัยว่าผู้ป่วยรายนั้นจะมีการติดเชื้อ แล้วทำการส่งสารคัดหลั่งหรือสิ่งส่งตรวจอื่นๆ จากผู้ป่วยมาเพาะเชื้อ การตรวจหาเชื้อดื้อยาจากสิ่งส่งตรวจเหล่านี้ โดยทั่วไปจะพบผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อยาเพียงจำนวนหนึ่ง เพราะผู้ป่วยอาจจะมีเพียงเชื้อ colonize อยู่โดยไม่มีอาการได้ หากจะค้นหาผู้ป่วยทั้งหมด

14-0992(001-354)editnew130158.indd 328 1/14/58 BE 3:51 PM

จะต้องเพาะเชื้อจากผู้ป่วยทุกราย และเพาะเชื้อติดตามไปหลาย ๆ ครั้ง เช่น ทุก 3 หรือ 7 วัน ซึ่งจะพบผู้ป่วยมากกว่าวิธีแรก อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถกำหนดได้ชัดเจนว่าการเพาะเชื้อจากส่วนใดของร่างกายจะพบเชื้อได้มากที่สุด ส่วนใหญ่มักจะทำ rectal swab culture และมักเพาะเชื้อจากหลายตำแหน่ง เช่น ทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น ทำให้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และยังเพิ่มปริมาณงานของห้องปฏิบัติการเป็นอย่างมาก อาจจะไม่เหมาะที่จะทำเป็นประจำ แต่อาจจะพิจารณาทำเป็นครั้งคราวเมื่อมีการระบาด

5.2 การเพาะเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและบุคลากร จะทำเมื่อมีข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชี้ว่าอาจมีแหล่งปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม หรือมีบุคลากรเป็นต้นตอการระบาด หากไม่มีข้อมูลอื่นสนับสนุน จะเป็นการยากที่จะหาความเชื่อมโยงระหว่างเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมกับเชื้อที่พบในผู้ป่วย

6. การสอบสวนการระบาด ในบางครั้งอาจมีการระบาดของเชื้อบางชนิด ซึ่งการที่จะทราบสาเหตุของการระบาด ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาควรเก็บเชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่กำลังระบาดไว้เพื่อการทำการตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อ (phenotype หรือ genotype) ในภายหลัง การเพาะเชื้ออาจจะเพาะเชื้อจากผู้ป่วยที่มีอาการของการติดเชื้อ หรืออาจจะต้องเพาะเชื้อจากผู้ป่วยรายอื่น รวมทั้งจากสิ่งแวดล้อมรอบตัวผู้ป่วยด้วยหากมีข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชี้ว่า อาจจะมีแหล่งของเชื้อในสิ่งแวดล้อม เมื่อพบแหล่งของเชื้อการควบคุมการระบาดจะทำได้ด้วยประสิทธิภาพสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Anonymous. NHSN Outline for Healthcare-Associated Infections Surveillance, April 2006. http://www.cdc.gov/nhsn/PDFS/OutlineForHAISurveillance.pdf
2. Fred C. Tenover. Rapid Detection and Identification of Bacterial Pathogens Using Novel Molecular Technologies: Infection Control and Beyond. Clinical Infectious Diseases 2007; 44:418–423
3. Kolmos HJ. Role of the clinical microbiology laboratory in infection control--a Danish perspective. J Hosp Infect. 2001; 48 Suppl A:S50-4.
4. Pfaller MA and Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. Clin Infect Dis. 1997; 25(4):858-870.
5. Pfaller MA, Wakefield DS, Hollis R, Fredrickson M, Evans E, and Massanari RM. The clinical microbiology laboratory as an aid in infection control: The application of molecular techniques in epidemiologic studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1991; 14(3):209-217.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 329 1/14/58 BE 3:51 PM

บทที่ 10
การติดเชื้อแบคทีเรียในชุมชน: บทบาทของหน่วยงานการปฏิบัติการด้านแบคทีเรีย

สยมพร ศิรินาวิน

"โรค" และ "เชื้อโรค"

ในกรณีที่มีการเจ็บป่วยจากโรคติดเชื้อ นอกเหนือจากการวินิจฉัยว่า ผู้ป่วยไม่สบายจาก "โรค" ใด (เช่น sepsis, pneumonia) ยังมีความจำเป็นที่จะต้องวินิจฉัยว่า "เชื้อโรค" ที่เป็นสาเหตุนั้น คือเชื้ออะไร ซึ่งการที่จะแจงให้ละเอียดเพียงใด (เช่น serotype, species, antimicrobial susceptibility) ย่อมขึ้นกับประโยชน์ที่จะนำไปใช้

การวินิจฉัย

โดยทั่วไป การวินิจฉัย "โรค" อาศัยข้อมูลจากการซักประวัติการดำเนินโรคและการตรวจพบความผิดปกติของร่างกายเป็นหลัก อาจมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมบ้าง ในการวินิจฉัย "เชื้อโรค" ที่เป็นสาเหตุ จำเป็นต้องมีข้อมูลจากการตรวจทางจุลชีววิทยาหรือการตรวจที่เกี่ยวข้อง ข้อมูลดังกล่าวอาจจะเป็นข้อมูลที่ได้มีการรวบรวมอย่างเป็นระบบจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วจำนวนมาก โดยเชื่อมโยงข้อมูลจากตัวผู้ป่วย (ที่สำคัญคือ อายุ ภาวะสุขภาพก่อนป่วย ลักษณะอาการและอาการแสดง) กับเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุ ข้อมูลนี้มีความสำคัญมากในการวินิจฉัย จนอาจจะไม่ต้องใช้การตรวจหาเชื้อโรคเฉพาะตัวผู้ป่วยคนนั้นที่เรียกว่าข้อมูลทางระบาดวิทยาคลินิก บางครั้งเท่านั้นที่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลของเชื้อโรคที่ได้มาจากตัวผู้ป่วยรายนั้นๆ ซึ่งมักจะเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาคลินิกไม่สามารถชี้แนะได้ หรือผู้ป่วยอาการหนักมากและแพทย์ยังไม่มั่นใจในการวินิจฉัย

บทบาทของการตรวจแบคทีเรีย

ในการเฝ้าระวังและติดตามข้อมูลโรคติดเชื้อแบคทีเรีย การตรวจแบคทีเรียที่ได้มาตรฐานเป็นพื้นฐานที่สำคัญ ข้อมูลเกี่ยวกับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุนั้น เจ้าหน้าที่ผู้ทำการตรวจวินิจฉัยตัวเชื้อ เป็นผู้กำหนดความแม่นยำของการวินิจฉัยเชื้อ เป็นคนแรกที่รู้ว่าเป็นเชื้ออะไร แบบแผนความไวต่อยาต้านแบคทีเรียเป็นอย่างไร รวมทั้งห้องปฏิบัติการแบคทีเรียเป็นแหล่งรวบรวมผลเพาะเชื้อแบคทีเรีย

การนำข้อมูลมาใช้ให้เกิดประโยชน์

หน่วยงานการปฏิบัติการด้านแบคทีเรีย ยังมีความสำคัญในการที่จะเป็นศูนย์ของการเฝ้าระวังด้านระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งการผลิตข้อมูลที่จะชี้แนะการวินิจฉัยและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่จะต้องมีการประสานงานกับข้อมูลที่สำคัญของผู้ป่วยอย่างเหมาะสม จนเกิดเป็นข้อมูลระบาดวิทยาคลินิกที่มีคุณภาพและเชื่อถือได้ จึงจะนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง การรวบรวมข้อมูลแบคทีเรีย โดยไม่ใช้หลักการทางระบาดวิทยา หรือไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะของผู้ติดเชื้อหรือแหล่งของแบคทีเรียอย่างถูกต้อง จะก่อให้เกิดความสิ้นเปลืองในการรวบรวมโดยเปล่าประโยชน์

ข้อมูลการติดเชื้อแบคทีเรียในชุมชน

การรวมรวมข้อมูลการติดเชื้อแบคทีเรียในชุมชุน (community-acquired bacterial infection) โดยมีหน่วยงานการปฏิบัติการด้านแบคทีเรียเป็นฐาน (laboratory-based) และประสานกับข้อมูลของผู้ป่วย อย่างเป็นระบบและเชื่อถือได้ มีประโยชน์อย่างมาก ดังนี้

1. การป้องกัน การวินิจฉัยก่อนการระบาด การสืบค้น ติดตาม และควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรียในชุมชน ได้แก่

1.1 การตรวจหาผู้ป่วยเพื่อการสืบค้นและติดตาม ป้องกัน และควบคุมการระบาด เช่น

- การติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครุนแรง เช่น *Corynebacterium diphtheriae*
- การติดเชื้อแบคทีเรียที่เปลี่ยนไปหรือปรากฏขึ้นใหม่ เช่น (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) เชื้อ *Salmonella* spp. สายพันธุ์ใหม่
- การระบาดที่เกิดขึ้นใหม่ เช่น การระบาดของการติดเชื้อ *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*
- การระบาดที่ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น การติดเชื้อ non-typhoidal *Salmonella* spp.

1.2 การคาดการสถานการณ์ของปัญหา และการติดตามแนวโน้มของอุบัติการณ์และการกระจายของโรค

1.3 ความสัมพันธ์ของการกระจายของโรคติดเชื้อชนิดนั้นๆ กับสิ่งที่อาจเป็นสาเหตุ และมาตรการในการควบคุม เช่น

- การติดเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* สายพันธุ์ต่างๆ และความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ หรือการติดเชื้อไวรัส หรือผลจากวัคซีน
- การติดเชื้อ *Streptococcus suis* และความสัมพันธ์กับการกินเนื้อหมูที่ไม่สุก ซึ่งมักจะกินแกล้มเหล้า

1.4 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียก่อโรค เช่น ความไวต่อสารต้านแบคทีเรียและลักษณะของการก่อโรค เช่น community-acquired MRSA

2. การกำหนดแนวทางในการการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อ ข้อมูลดังกล่าวที่รวบรวมอย่างเหมาะสม มีประโยชน์และความสำคัญมากต่อการกำหนดแนวทาง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 332 1/14/58 BE 3:51 PM

2.1 การวินิจฉัยเบื้องต้นถึงแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วย ด้วยอาการของโรคติดเชื้อที่ตำแหน่งต่างๆ อายุ โรคประจำตัว ของผู้ป่วย รวมถึงแหล่งรับรังโรค

2.2 การเลือกใช้ยาต้านแบคทีเรียในการรักษาผู้ป่วยในเบื้องต้น ขณะที่ไม่มีผลการตรวจเชื้อของผู้ป่วยคนนั้น

3. ประโยชน์ต่อการทำวิจัยทางระบาดวิทยา และการวิจัยทางห้องปฏิบัติการ ข้อมูลดังกล่าวสามารถต่อเนื่องไปถึงการตั้งคำถามการวิจัยใหม่ๆ และการวิจัยเพิ่มเติมในห้องปฏิบัติการ

การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดรุกล้ำในชุมชน

การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดรุกล้ำในชุมชน หมายถึง การที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถเข้าไปสู่กระแสเลือดของคนที่อยู่เป็นปรกติในชุมชนนอกโรงพยาบาล อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะสำคัญต่างๆ เช่น เยื่อหุ้มสมอง ปอด กระดูกและข้อ การติดเชื้อดังกล่าวมักจะเป็นอันตรายได้มากและมีกลุ่มเสี่ยงที่เป็นประชากรทั่วไป จำเป็นต้องหาวิธีการป้องกัน ซึ่งที่สำคัญคือวัคซีน การควบคุมการกระจายของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม หรือ การเปลี่ยนพฤติกรรมเสี่ยง แบคทีเรียที่ก่อโรคดังกล่าวโดยทั่วไปได้แก่ *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* แบคทีเรียที่เป็นปัญหาค่อนข้างเฉพาะของประเทศไทยและบางประเทศใกล้เคียง ได้แก่ non-typhoidal *Salmonella*, *S. suis*, *B. pseudomallei* ที่พบว่าเป็นปัญหาที่เพิ่มขึ้นมาก ได้แก่ การติดเชื้อ *S. agalactiae* ในผู้ใหญ่ ส่วนแบคทีเรียที่ต้องเฝ้าระวังว่าจะเกิดเป็นโรคระบาดใหม่ในประเทศไทย เช่น *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*

ระบบติดตามข้อมูลการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดรุกล้ำในชุมชน เป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาระบบการดูแลสุขภาพของประชาชนโดยทั่วไป และจำเป็นต้องมีบุคลากรและหน่วยงานการปฏิบัติการด้านแบคทีเรียของระบบการแพทย์และสาธารณสุขเป็นแกนการดำเนินงานร่วมกับพยาบาลและแพทย์ ซึ่งจะเป็นผู้เสริมข้อมูลทางคลินิก ระบบนี้ควรจะได้รับการพัฒนาให้เป็นระบบที่ยั่งยืนของประเทศ เช่นเดียวกับระบบการติดตามข้อมูลระบาดวิทยาของการเจ็บป่วยด้วยภาวะต่างๆ จะแตกต่างเพียงความจำเป็นที่ต้องมีข้อมูลแบคทีเรียที่ดีเป็นแกนสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

1. Osterholm MT, Hedberg CW. Epidemiologic principles. Section C: Epidemiology of Infectious Diseases. In: Mandel GL, Bennett, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Pensylvania: Elsevier Churchill Livingstone. 2005; p. 161-172.
2. สยมพร ศิรินาวิน, สุรางค์ เดชศิริเลิศ, อนุศักดิ์ เกิดสิน, และ ThaiIBIS Net work. Thailand Invasive Bacterial Infection Surveillance 2010-2011: Pathogen-based surveillance. การสัมมนาระบาดวิทยาแห่งชาติ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธาณสุข ครั้งที่ 21 วันที่ 6 - 8 กรกฎาคม 2554 กรุงเทพฯ.

14-0992(001-354)editnew130158.indd 333 1/14/58 BE 3:51 PM

ภาคผนวก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

อัญชลี เจนวรรธนะ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้องจัดเตรียมตามวิธีที่กำหนดไว้ข้างภาชนะบรรจุอาหาร (dehydrated medium) ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพอาหารที่เตรียม ได้แก่

1. คุณภาพของ dehydrated medium ต้องไม่ใช้อาหารหมดอายุ ชื้น จับเป็นก้อนหรือมีการเปลี่ยนสี
2. ภาชนะที่ใช้ในการเตรียมอาหารต้องสะอาดไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่น
3. การชั่งอาหารและปริมาตรของน้ำที่นำมาละลายอาหารต้องถูกต้องและมีคุณภาพตามกำหนด
4. ต้องละลายให้สมบูรณ์แต่ต้องไม่ใช้ความร้อนสูงเกินไปและต้องไม่ต้มจนอาหารไหม้ การเข้า autoclave ไม่สามารถละลายวุ้นได้สมบูรณ์
5. ต้องวัด pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมทุกครั้ง ถ้าไม่ได้ pH ตามกำหนดต้องปรับให้ได้ pH ตามกำหนดโดยใช้ 1 N HCl ในกรณีที่อาหารที่เตรียมมี pH สูงกว่าที่กำหนด ปรับด้วย 1 N NaOH ถ้าอาหารที่เตรียมมี pH ต่ำกว่าที่กำหนด

วิธีการเตรียมอาหารแบ่งตามลักษณะของอาหารเป็น อาหารที่บรรจุใน plate อาหารที่บรรจุในหลอด ซึ่งแบ่งเป็นอาหารเหลวและอาหารแข็งที่ทำเป็น slant ก่อนเทอาหารใส่ plate ควรคอยให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 ^{o}C ก่อนเท plate เมื่อเทเสร็จต้องรอจนอาหารแข็งตัวดีและเย็นจึงนำใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุง ติดฉลากชื่ออาหาร วันที่เตรียมและวันหมดอายุ เก็บที่ 4-8 ^{o}C ตามเวลาที่ระบุ สำหรับอาหารที่ใส่ใน tube ใส่ตามปริมาตรของอาหารแต่ละชนิด คลายจุกเกลียวขณะเข้า autoclave วางเป็น slant หรือ ตั้งตรงตามชนิดของอาหาร เมื่ออาหารเย็นปิดจุกให้แน่น ติดฉลากชื่ออาหาร วันที่เตรียมและวันหมดอายุ เก็บที่ 4-8 ^{o}C ตามเวลาที่ระบุ โดยทั่วไปอาหารที่อยู่ใน plate จะมีอายุการใช้งานประมาณ 1 เดือนแต่ถ้าเป็น selective media อาจมีอายุการใช้งานสั้นกว่าซึ่งจะได้ระบุในอาหารนั้นๆ

เมื่อเตรียมอาหารเสร็จเรียบร้อยแล้วต้องทำการตรวจสอบคุณภาพทั้งการดูด้วยตาเปล่า เช่น สีของอาหารไม่เหลวหรือแข็งผิดปกติ ผิววุ้นเรียบไม่ขรุขระ ถ้ามีการเติมเลือด เลือดต้องไม่ hemolyse เมื่อผ่านการประเมินคุณภาพด้วยตาเปล่าแล้วจึงนำอาหารประมาณ 10% ไปอบในตู้อบเพาะเชื้อ 35-37 ^{o}C เพื่อดูว่ามีการปนเปื้อนเชื้อหรือไม่ และนำส่วนหนึ่งไปทดสอบคุณภาพว่ามีคุณภาพตามต้องการหรือไม่ อาหาร lot ใดไม่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพต้องทำการหาสาเหตุและแก้ไขปรับปรุงและจัดเตรียมใหม่ ห้ามนำอาหารที่ไม่ผ่านการตรวจสอบไปใช้

วิธีตรวจสอบคุณภาพของอาหารเพาะเชื้อ

ตรวจสอบคุณภาพของ media ที่เตรียมในแต่ละวัน โดยเขี่ยเชื้อที่ใช้ทดสอบลงใน BHI broth อบที่ 35-37 ^{o}C นาน 2-4 ชม. เลี้ยงเชื้อบน media ที่ต้องการทดสอบอบที่ 35-37 ^{o}C นาน 18-24 ชม. ตรวจการเจริญของเชื้อหรือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ถ้าอาหารที่เตรียมไม่ได้คุณภาพ ต้องหาสาเหตุความผิดพลาด แก้ไข แล้วเตรียมใหม่ ห้ามนำอาหารที่ไม่ได้คุณภาพมาใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพแล้วนำไปเก็บในห้องเย็น 2-8 ^{o}C เพื่อใช้งานต่อไป

การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ทดสอบคุณภาพ

1. การเก็บรักษาระยะยาว เก็บเชื้อใน fetal calf serum + glycerol หรือ skimmed milk + glycerol ใส่ใน vial เล็ก ๆ แล้วเก็บใส่กล่องเก็บในตู้ freeze ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 ^{o}C
2. การเก็บระยะสั้น เพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบ media และเชื้อมาตรฐานชนิดต่าง ๆ โดย subculture เดือนละ 2 ครั้ง เก็บไว้ใน cold room/ตู้เย็น
3. เชื้อที่ใช้งานประจำวัน
   ก. เพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ media โดย subculture สัปดาห์ละครั้ง
   ข. เพาะเลี้ยงเชื้อที่ตายง่าย เช่น *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae* โดย subculture วันเว้นวัน

อาหารเพาะเชื้อ (plating media)

Blood agar (BA)

BA เป็นอาหารเพาะเชื้อที่ใช้สำหรับสิ่งตรวจทุกชนิด และใช้ในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเกือบทุกชนิด BA เป็นอาหารทั่วไป (non selective medium) แต่ใช้ในการแยกชนิดของแบคทีเรียที่ให้ hemolysis เป็นลักษณะสำคัญในการวินิจฉัยเชื้อ เช่น *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Archanobacterium* เป็นต้น มีส่วนผสมของเลือด 5% ซึ่งอาจใช้ defibrinated sheep, horse, rabbit blood หรือใช้เลือดหมดอายุจากคลังเลือด โดยผสมกับ trypticase หรือ tryptic soy agar ใน soy agar มี peptones ที่เป็นแหล่งของ amino acid, carbon, nitrogen และ sulfur ในเลือดมี ส่วนประกอบของ serum เม็ดเลือดแดง ช่วยให้สามารถดู hemolytic pattern (ต้องใช้ sheep blood) และการเจริญเติบโตของเชื้อ BA เป็นอาหารที่มีค่า pH ค่อนข้างจะเป็นกรด ซึ่งมีส่วนช่วยเสริมในการเพาะเชื้อ streptococci และ pneumococci อาหารที่เตรียมเองสามารถเก็บที่ 4-8 ^{o}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 1 เดือน

14-0992(001-354)editnew130158.indd 336 1/14/58 BE 3:51 PM

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. β-*Streptococcus* group A = เจริญและให้ β-hemolysis
2. *Streptococcus pneumoniae* = เจริญและให้ α-hemolysis
3. Non hemolytic *Streptococcus* = เจริญและไม่เกิด hemolysis

BACTEROIDES BILE ESCULIN AGAR (BBE)

BBE เป็น selective medium ใช้ในการแยกและวินิจฉัยเชื้อ *Bacteroides fragilis* group เบื้องต้น การตรวจพบอย่างรวดเร็วสำหรับแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญเพราะพบก่อโรคในคนได้บ่อยและดื้อต่อ penicillin ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ anaerobic bacteria อาหารนี้ประกอบด้วย ox gall, esculin และ gentamicin เชื้อ *Bacteroides fragilis* group เจริญได้ดีบนอาหารที่มีน้ำดี สามารถ hydrolyse esculin ได้ทำให้โคโลนีมีสีดำ gentamicin ยับยั้งการเจริญของ anaerobic bacteria ส่วนใหญ่ แต่ไม่มีผลในการยับยั้ง *Bacteroides vugatus* ซึ่งสามารถขึ้นได้บนอาหารนี้แต่ไม่ hydrolyse esculin

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Bacteroides fragilis* = เจริญและให้โคโลนีสีดำ
2. *Bacteroides vugatus* = เจริญไม่ให้โคโลนีสีดำ
3. *Clostridium perfringens* = ไม่เจริญ

ANAEROBIC BLOOD AGAR (ANA BA)

ANA BA เป็น enriched medium ที่ใช้ในการแยกและเพาะ anaerobic bacteria สารอาหารคือ tryptic soy agar/ brain heart infusion agar/Columbia agar/ Schaedler agar/ CDC agar ที่เสริมด้วย yeast extract, vitamin K, hemin และ 5% sheep blood ในกรณีเติมเลือดเพื่อใช้ดู hemolytic reaction อาหารนี้ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียแกรมบวกได้ด้วย hemin และ vitamin K ช่วยในการเจริญของ *Prevotella* spp. และ *Porphyromonas* spp. อาหารที่เตรียมเองสามารถเก็บที่ 4-8 ^{o}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 1 เดือน

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Bacteroides fragilis* = ขึ้นได้
2. *Clostridium perfringens* = ขึ้นได้และให้ double zone hemolysis

CHOCOLATE AGAR (CA)

CA เป็น highly enriched medium ที่ใช้ในการเพาะเชื้อที่ต้องการสารอาหารพิเศษในการเจริญหลายชนิด (fastidious organisms) เช่น *Neisseria* และ *Haemophilus* อาหารนี้มีหลายสูตรส่วนประกอบพื้นฐานประกอบด้วย GC medium base, hemoglobin ซึ่งเป็น hemin หรือ X factor ทำให้อาหารมีสี chocolate และyeast

14-0992(001-354)editnew130158.indd 337 1/14/58 BE 3:51 PM

extract/IsoVitalex ซึ่งเป็นแหล่งของ NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) หรือ V factor อาหารที่เตรียมสามารถเก็บที่ 4-8 ^{O}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 1 เดือน

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Neisseria gonorrhoeae* = เจริญ
2. *Haemophilus influenzae* = เจริญ

EOSIN-METHYLENE BLUE AGAR (EMB)

EMB เป็น moderately inhibitory medium ใช้ในการแยกและตรวจหาพวก *Enterobacteriaceae* หรือแยก related coliform bacilli จากสิ่งตรวจผู้ป่วยที่เป็น mixed bacteria, aniline dyes (eosin และ methylene blue) จะยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกและ fastidious gram negative bacteria และทำหน้าที่เป็น indicator ซึ่งจะให้ความแตกต่างได้อย่างชัดเจนระหว่างโคโลนีของเชื้อที่ ferment lactose และเชื้อที่ไม่ ferment lactose อาหารนี้มี sucrose ด้วยใช้ตรวจหา coliform groups ซึ่งจะ ferment น้ำตาลชนิดนี้ได้ชัดเจนกว่า lactose โคโลนีที่ให้ lactose positive จะมีสีดำ หรือ จุดตรงกลางดำโดยบริเวณรอบ ๆ จะใส ขณะที่ lactose หรือ sucrose negative จะไม่มีสี อาหารที่เตรียมเองสามารถเก็บที่ 4-8 ^{O}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 1 เดือน

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = เจริญเป็น lactose fermenter
2. *Salmonella* species = เจริญเป็น non lactose fermenter
3. *Staphylococcus* coagulase negative = ไม่เจริญ

MacCONKEY (MAC)

MAC เป็น moderately inhibitory media เช่นเดียวกับ EMB ใช้ในการแยกกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ related enteric gram negative bacilli, bile salts และ crystal violet ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและ fastidious gram negative bacteria บางชนิด มี lactose เป็นแหล่งของ carbohydrate และ neutral red เป็น indicator เชื้อที่สามารถย่อยสลาย lactose จะให้ โคโลนีสีชมพู-แดง หลังเพาะเชื้อที่ 35-37 ^{O}C 16-18 ชม. เช่น *Escherichia coli* ส่วนเชื้อที่ไม่ย่อยสลาย lactose (non lactose fermenting bacteria) จะให้โคโลนีไม่มีสี หรือใส เช่น *Salmonella* spp., *Shigella* spp. เป็นต้น อาหารที่เตรียมสามารถเก็บที่ 4-8°C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 1 เดือน

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = เจริญเป็น lactose fermenter (colony สีชมพู)
2. *Proteus mirabilis* = เจริญเป็น non lactose fermenter (colony ไม่มีสี) และไม่ swarm
3. *Staphylococcus* coagulase negative = ไม่เจริญ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 338 1/14/58 BE 3:51 PM

HAEMOPHILUS TEST MEDIUM (HTM)

HTM เป็น enriched medium ใช้สำหรับทดสอบหาความไว ของเชื้อ *Haemophilus* species ต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ โดยใช้ MHA แล้วเติม hematin (factor X) และ nicotinamide (NAD) ซึ่งเป็น factor V เพื่อเป็นตัวเสริมที่จำเป็นให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี ข้อดีของอาหารนี้ก็คือเป็นอาหารที่ใส ทำให้การอ่านผลสะดวกเพราะเห็นรอยขอบการเจริญของเชื้อได้ชัดเจน อาหารที่เตรียมสามารถเก็บที่ 4-8 ^{O}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 2 สัปดาห์

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Haemophilus influenzae* = เจริญ
2. Quality control ของการทดสอบความไวกับเชื้อ *Haemophilus* ATCC 49247 และ *Haemophilus* ATCC 49766 ได้ผลตามที่กำหนด

MUELLER HINTON AGAR (MHA)

MHA เป็นอาหารที่แนะนำโดย CLSI ใช้สำหรับทดสอบหาความไวของ non fastidious microorganisms ต่อสารต้านจุลชีพต่าง ๆ โดยวิธีของ disk diffusion method อาหารที่เตรียมเองสามารถเก็บที่ 4-8 ^{O}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 7 วัน

การควบคุมคุณภาพ

1. อาหารที่เตรียมเสร็จต้องมี pH 7.2-7.4 ที่อุณหภูมิห้อง
2. ความหนาของอาหารในจานเพาะเชื้อเชื้อต้องหนา 4 มม. และสม่ำเสมอทั่วจาน
3. อาหารที่นำมาใช้ต้องไม่แห้ง
4. การทำ Quality control กับเชื้อที่ใช้ทดสอบ *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ผลตามที่กำหนด

MUELLER HINTON AGAR WITH 5% SHEEP BLOOD

MHA with 5% sheep blood ใช้สำหรับการทดสอบหาความไวของเชื้อที่ไม่ขึ้นบน MHA เช่น *Streptococcus pneumoniae* และใช้กับเชื้อ *Streptococcus* group อื่นต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ อาหารที่เตรียมเองสามารถเก็บที่ 4-8 ^{O}C ในถุงพลาสติกที่ปิดได้นาน 2 สัปดาห์

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Streptococcus pneumoniae* = เจริญ
2. ดูผล Quality control การทดสอบความไวของ *S. pneumoniae* ATCC 49619 ได้ผลตามที่กำหนด

14-0992(001-354)editnew130158.indd 339 1/14/58 BE 3:51 PM

RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV) MEDIUM

MSRV medium เป็นอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) มี peptone เป็นแหล่งของ carbon และ nitrogen ซึ่งมีความจำเป็นในการเจริญของแบคทีเรีย มี magnesium chloride ไปเพิ่ม osmotic pressure ในอาหาร เติม novobiocin และ malachite green เพื่อยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella*, magnesium chloride pH ต่ำของอาหาร novobiocin และ malachite green ทำให้อาหารนี้เป็น selective medium สำหรับเชื้อ *Salmonella* เหมาะสำหรับใช้ตรวจหา *Salmonella* ที่เคลื่อนไหวได้ (motile) ในอุจจาระและอาหารโดยบริเวณรอบๆที่มีเชื้อ *Salmonella* ขึ้นจะเห็นเป็นวงไม่มีสีแผ่ออก รอบๆ

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

Salmonella Enteritidis	=	เจริญและให้วงไม่มีสีแผ่ออกรอบๆ
Proteus mirabilis	=	ไม่ให้วงไม่มีสี (Halo)

SABOURAUD DEXTROSE AGAR (SDA)

SDA เป็นอาหารที่ถูกแนะนำให้ใช้สำหรับเพาะเชื้อราก่อโรค โดยเฉพาะในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่ผิวหนังเนื่องจากอาหารมีค่า pH ต่ำ จึงช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยทั่วไปอาหารนี้นิยมใช้กับ slide culture technique เพื่อดูลักษณะรูปร่างของเชื้อรา

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Candida albicans*	=	เจริญ
2. *Trichophyton mentagrophytes*	=	เจริญ

SABOURAUD DEXTROSE AGAR (SDA) WITH GENTAMICIN

SDA with gentamicin เป็นการเพิ่มสารต้านจุลชีพ gentamicin ลงไปใน Sabouraud dextrose agar เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียไม่ให้เจริญเติบโต ทำให้เชื้อราก่อโรคสามารถเจริญได้ดีขึ้น

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Candida albicans*	=	เจริญ
2. *Escherichia coli* ATCC 25922	=	ไม่เจริญ

MYCOSEAL AGAR (MYCOSEL)

Mycoseal agar เป็น SDA ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเพาะเชื้อราก่อโรคที่เติม cycloheximide และสารต้านจุลชีพ chloramphenicol ทำให้มี selective มากยิ่งขึ้น เป็นอาหารที่มีประโยชน์สูงมากในการแยกเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง ผม เล็บ และเชื้อราก่อโรคอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุของ systemic disease. cycloheximide ช่วยยับยั้งพวก saprophytic fungi ส่วน chloramphenicol ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

14-0992(001-354)editnew130158.indd 340 1/14/58 BE 3:51 PM

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Candida albicans* = เจริญ
2. *Escherichia coli* ATCC 25922 = ไม่เจริญ
3. *Aspergillus niger* = ไม่เจริญ

SALMONELLA SHIGELLA (SS) AGAR

SS agar เป็น highly selective medium ที่ส่งเสริมให้ *Salmonella* และ *Shigella* spp. เจริญเติบโตในขณะที่มีสารยับยั้งการเจริญของ coliform organisms ส่วนใหญ่ bile salts และ sodium citrate ช่วยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดรวมทั้งกลุ่ม coliforms มี lactose เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต มี neutral red เป็น indicator ซึ่งจะมีสีแดงในสภาวะเป็นกรดและไม่มีสีในภาวะเป็นด่าง sodium thiosulfate เป็นแหล่งของ sulfur gas และ hydrogen sulfide ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจะรวมตัวกับ ferric citrate เกิดเป็น ferric sulfide ซึ่งจะทำให้โคโลนีมีจุดสีดำตรงกลาง โคโลนีของแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำตาล lactose (lactose fermenter) จะมีสีชมพู-สีแดง แบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายน้ำตาล lactose โคโลนีจะใสไม่มีสี เช่น *Shigella* spp. แบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายน้ำตาล lactose ที่สร้าง hydrogen sulfide โคโลนีจะใสไม่มีสีและมีจุดดำตรงกลาง เช่น *Salmonella* spp.

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = ไม่เจริญหรือเจริญน้อย โคโลนีมีสีชมพู
2. *Salmonella* spp. = โคโลนีใสไม่มีสีและมีจุดดำตรงกลาง
3. *Shigella sonnei* = โคโลนีใสไม่มีสี
4. *Staphylococcus* coagulase negative = ไม่เจริญ

THAYER-MARTIN AGAR

Thayer Martin agar เป็น enriched และ selective medium ใช้สำหรับแยกพวก *Neisseria* จากสิ่งตรวจผู้ป่วยที่มีเชื้อประจำถิ่น โดยเป็น CA ที่เติม vancomycin, colistin และ nystatin เพื่อยับยั้งเชื้อประจำถิ่นที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและเชื้อรา

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Neisseria gonorrhoeae* = เจริญ
2. *Staphylococcus* coagulase negative = ไม่เจริญ
3. *Candida albicans* = ไม่เจริญ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 341 1/14/58 BE 3:51 PM

THIOSULFATE CITRATE BILE SALT SUCROSE (TCBS) AGAR

TCBS เป็น highly selective medium สำหรับเชื้อ *Vibrio* ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio* spp. อื่นๆจากอุจจาระและสิ่งตรวจอื่นๆ ใช้เป็นอาหารเพาะเชื้อเพื่อแยกเชื้อ *V. cholerae* จากอุจจาระผู้ป่วยอหิวาตกโรค คิดค้นโดย Kobayashi และคณะซึ่งดัดแปลงจากอาหารที่คิดค้นโดย Nakanishi การใช้ alkaline peptone ร่วมกับ TCBS เพื่อแยกเชื้อ *V. cholerae* และ *Vibrio* spp. อื่นๆ การเติม ox gall ซึ่งประกอบด้วย bile salts และ sodium cholate ใน TCBS เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก, มี sodium thiosulfate เป็นแหล่งของ sulfur และใช้ร่วมกับ ferric citrate ในการตรวจการสร้าง hydrogen sulfide, น้ำตาล sucrose ใช้ดูความสามารถของเชื้อในการย่อยสลาย sucrose โดยมี thymol blue เป็น indicator ความเป็นด่างของอาหารทำให้แยกเชื้อ *V. cholerae* ได้ดี *V. parahaemolyticus* ซึ่งไม่ย่อยสลาย sucrose จะให้โคโลนีสีเขียวบนอาหารนี้ ส่วน *V. cholerae* ให้โคโลนีสีเหลืองเพราะย่อยสลาย sucrose กลุ่ม enteric bacteria เช่น coliforms และ *Proteus* ซึ่งพบปนเปื้อนมากับอุจจาระจะถูกยับยั้ง บางสายพันธุ์ของ *Proteus* และ *Enterococcus* อาจโตได้แต่จะเป็น colony ขนาดเล็กและใส ซึ่งแยกความแตกต่างได้ชัดเจน TCBS ที่ผลิตโดยแต่ละบริษัทและแต่ละ lot อาจมีความจำเพาะแตกต่างกัน

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Vibrio cholerae* = เจริญ โคโลนีสีเหลือง
2. *Vibrio parahaemolyticus* = เจริญ โคโลนี สีเขียว
3. *Escherichia coli* = ไม่เจริญ

XYLOSE LYSINE DESOXYCHOLATE AGAR (XLD)

XLD เป็น selective differential medium ใช้แยก *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. จากอุจจาระหรือ rectal swab แยก *Salmonella* และ *Shigella* จากเชื้อประจำถิ่นในลำไส้โดยอาศัยคุณสมบัติการย่อยสลาย (ferment) xylose และ lactose, lysine decarboxylation และการสร้าง hydrogen sulfide บน XLD *Shigella* ให้โคโลนีใสสีชมพูหรือแดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 mm โคโลนีของ *S. dysenteriae* บน XLD มีขนาดเล็กกว่า *Shigella* spp. อื่น coliform แบคทีเรียให้โคโลนีสีเหลือง *Salmonella* ให้โคโลนีสีแดงมีจุดสีดำตรงกลางหรืออาจให้โคโลนีสีเหลืองมีจุดตรงกลางสีดำก็ได้

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = ไม่เจริญหรือเจริญน้อยโคโลนีสีเหลือง
2. *Salmonella* spp. = โคโลนีสีแดงและมีจุดดำตรงกลาง
3. *Shigella sonnei* = โคโลนีสีชมพู
4. *Staphylococcus* coagulase negative = ไม่เจริญ

14-0992(001-354)editnew130158.indd 342 1/14/58 BE 3:51 PM

อาหารเพาะเชื้อที่บรรจุเป็นหลอด

BRAIN HEART INFUSION (BHI) BROTH

BHI broth เป็นอาหารเหลวที่ใส ซึ่งมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อสูงมาก จึงเหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังใช้เตรียม inoculum เชื้อสำหรับทดสอบ susceptibility test และ identification

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = เจริญ
2. *Staphylococcus* coagulase positive = เจริญ

THIOGLYCOLLATE MEDIUM

Thioglycollate medium เป็น enriched liquid medium ซึ่งเป็น supplement ที่ดีในการช่วยเสริมการเพาะเชื้อแบบ plating mediaในการแยกเชื้อที่เจริญช้าหรือต้องการสารอาหารพิเศษ นอกจากนี้ยังช่วยให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี โดยเฉพาะพวก anaerobic bacteria ที่พบจากสิ่งตรวจผู้ป่วย ทั้งยังใช้ในการตรวจหาเชื้อจากตำแหน่งที่ไม่มีเชื้อประจำถิ่น

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Bacteroides fragilis* = เจริญ
2. *Propionibacterium acnes* = เจริญ

SELENITE BROTH

Selenite broth เป็นอาหารสำหรับแยกเชื้อ *Salmonella* จากสิ่งตรวจผู้ป่วย เช่น อุจจาระ ปัสสาวะ หรือน้ำทิ้ง ซึ่งอาจมีแบคทีเรียปะปนอยู่หลายชนิด sodium selenite จะยับยั้ง *E. coli* และ coliform bacilli อื่น ๆ อาหารนี้จะทำหน้าที่ได้ดีที่สุดในสภาพที่ไร้ออกซิเจนจึงต้องใส่อาหารให้มีความลึกอย่างน้อย 2 นิ้ว หลังจากอบไว้เป็นเวลา 8–12 ชม. ให้ subculture ลง SS agar เพื่อไม่ให้ coliform อื่น หรือเชื้อประจำถิ่นของลำไส้ขึ้นครอบคลุมเชื้อก่อโรค

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Salmonella* spp. = ควบคุมผลบวก
2. *Escherichia coli* = ควบคุมผลลบ

หมายเหตุ sodium selenite เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

14-0992(001-354)editnew130158.indd 343 1/14/58 BE 3:51 PM

อาหารสำหรับทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

BILE ESCULIN AGAR

Bile esculin agar ใช้ตรวจดูความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง hydrolyse glycoside esculin เป็น esculetin และ glucose ในอาหารที่มี bile 40%, esculetin ทำปฏิกิริยากับ ferric ions ให้สารประกอบสีดำที่ซึมได้ ใช้ในการแยก facultative anaerobic bacteria ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยานี้ เช่น แยกเชื้อ

1. *Streptococcus* group D (+) จาก non group D *Streptococcus* (-)
2. *Listeria* spp. (+) จากแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีสปอร์อื่น (-)
3. แบคทีเรียที่สร้าง pigment สีเหลือง เช่น *Flavimonas oryzihabitans* (-), *Sphingomonas paucimobilis* (+) และ *Chryseomonas luteola* (+)

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. Enterococci = ควบคุมผลบวก (สีดำ)
2. β-*Streptococcus* group A = ควบคุมผลลบ (ไม่เกิดสีดำ)

1% CARBOHYDRATE BROTH FOR FERMENTATION TEST

อาหารเหลวที่เติมน้ำตาล 1% ใช้เพื่อตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำตาลจำเพาะแต่ละชนิดที่ใส่ใน basal medium ซึ่งมี indicator สำหรับการทดสอบแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* นิยมใช้ phenol red broth base ซึ่งเป็น peptone ที่ไม่มีน้ำตาล และมี phenol เป็น indicator เมื่อย่อยสลายน้ำตาลให้กรดอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าไม่ย่อยสลายน้ำตาลอาหารจะไม่เปลี่ยนสีถ้าเป็นด่างมากขึ้นจะมีสีชมพูเข้มมากขึ้น สำหรับการตรวจหาแก๊สให้ใส่หลอด Durham โดยคว่ำหลอดอย่าให้มีแก๊สในหลอด ใส่เฉพาะหลอดที่ใส่น้ำตาล glucose หลอดเดียวและดูการเกิดแก๊ส ในการทดสอบควรมีหลอดที่ไม่ใส่น้ำตาลหนึ่งหลอดเพื่อใช้เทียบสีกับหลอดที่มีน้ำตาลเมื่อมีเชื้อขึ้น

<u>หมายเหตุ</u> Carbohydrate ที่ใช้มี 15 ชนิดคือ

1. Arabinose	2. Cellobiose	3. Dextrose
4. Inositol	5. Lactose	6. Maltose
7. Mannitol	8. Mellibiose	9. Raffinose
10. Rhamnose	11. Salicin	12. Sorbitol
13. Sucrose	14. Trehalose	15. Xylose

การควบคุมคุณภาพ

Arabinose	*Enterobacter* spp.	= ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Serratia marcescens	= ควบคุมผลลบ	(ชมพู)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 344 1/14/58 BE 3:51 PM

Cellobiose	*Enterobacter* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Morganella morganii	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Dulcitol	*Salmonella* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Morganella morganii	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Glucose	*Escherichia coli*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Moraxella osloensis	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Inositol	*Enterobacter* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Escherichia coli	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Lactose	*Escherichia coli*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Proteus mirabilis	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Maltose	*Escherichia coli*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Proteus mirabilis	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Mannitol	*Escherichia coli*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Proteus mirabilis	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Mellibiose	*Enterobacter* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Proteus mirabilis	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Raffinose	*Klebsiella pneumoniae*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Morganella morganii	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Rhamnose	*Enterobacter* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Serratia marcescens	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Salicin	*Enterobacter* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Salmonella spp.	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Sorbitol	*Escherichia coli*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Proteus mirabilis	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Sucrose	*Enterobacter* spp.	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Salmonella spp.	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Trehalose	*Klebsiella pneumoniae*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Morganella morganii	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)
Xylose	*Klebsiella pneumoniae*	=	ควบคุมผลบวก	(เหลือง)
	Morganella morganii	=	ควบคุมผลลบ	(ชมพู)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 345 1/14/58 BE 3:51 PM

SIMMONS CITRATE AGAR

Citrate agar ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการใช้ citrate เป็นแหล่ง carbon อาหารนี้จึงต้องไม่มี protein แต่มี sodium citrate เป็นแหล่งของ carbon และมี ammonium phosphate เป็นแหล่งของ nitrogen มี bromothymol blue เป็น pH indicator แบคทีเรียทีสามารถใช้ citrate จะให้ ammonia ทำให้เกิดด่าง อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ผลลบจะเป็นสีเขียวเหมือนเดิมใช้วินิจฉัย *Enterobacteriaceae* ตัวอย่าง เช่น ใช้แยก

1. *Edwardsiella* (-) จาก *Salmonella* (+)
2. *Klebsiella-Enterobacter* (+) จาก *E. coli* (-)

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Enterobacter* spp. = ควบคุมผลบวก (สีน้ำเงิน)
2. *Escherichia coli* = ควบคุมผลลบ (สีเขียว)

CYSTINE TRYPTICASE AGAR (CTA)

CTA เป็นอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เติมน้ำตาล 1% เพื่อใช้ตรวจสอบความสามารถของ *Neisseria* ในการย่อยสลายน้ำตาลจำเพาะแต่ละชนิด มี cystine trypticase agar เป็น base และมี indicator ใช้ทดสอบความสามารถของเชื้อ *Neisseria* ในการย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่างๆ ผลลัพธ์ที่ได้ถ้าเป็นกรดจะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลือง ถ้าไม่สร้างกรดอาหารจะเป็นสีชมพู

น้ำตาลที่ใช้มี 4 ชนิดคือ dextrose, lactose, sucrose และ maltose

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Neisseria gonorrhoeae* = dextrose acid (สีเหลือง)
   น้ำตาลอื่น ควบคุมผลลบ (สีชมพู)
2. *Neisseria meningitidis* = dextrose และ maltose acid (สีเหลือง)
   น้ำตาลอื่น ควบคุมผลลบ (สีชมพู)

ข้อแนะนำในการทดสอบ

1. อาจเติม agar ในอาหารให้เป็น 1% และวางเป็น slant เวลาใส่เชื้อใช้ loop ตักมาป้ายบนผิว slant จะเห็นการย่อยสลายน้ำตาลชัดขึ้น
2. การทดสอบการย่อยสลายน้ำตาลของ *Neisseria* ไม่อบเชื้อในภาวะที่มี CO_2

DECARBOXYLASE TEST MEDIUM

Decarboxylase test medium เพื่อทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างเอนไซม์ที่ไปแยก carboxyl group (carboxylase) หรือ hydroxyl group (hydrolyse) ออกจากกรดอะมิโน (lysine, ornithine และ arginine) เพื่อสร้าง amine ซึ่งมีผลลัพธ์เป็นด่าง การเติม glucose ในอาหารช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีขึ้นและเติม pH

14-0992(001-354)editnew130158.indd 346 1/14/58 BE 3:51 PM

indicator (bromocresol purple) การเกิดปฏิกิริยาจึงเกิดเป็นสองขั้นตอนคือในภาวะที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลาย glucose ได้ ทำให้ pH ลดลง ซึ่งจะเปลี่ยนสีของอาหารจากม่วงเป็นเหลือง pH ที่ต่ำนี้จะไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ decarboxylase ซึ่งเปลี่ยน lysine เป็น cardaverine และเปลี่ยน ornithine เป็น putrescine ส่วน arginine จะถูก hydrolyse เป็น citrulline และ citrulline ถูกเปลี่ยนไปเป็น ornithine และถูก decarboxylate เป็น putrescine เชื้อที่สามารถ decarboxylate amino acid จะได้ด่างทำให้สีของอาหารเปลี่ยนกลับไปเป็นสีม่วงเหมือนเดิม ดังนั้นผลบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อมีสีม่วง ผลลบอาหารมีสีเหลือง

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

	Lysine	Arginine	Ornithine
1. *Klebsiella pneumoniae*	+	-	-
2. *Enterobacter cloacae*	-	+	+

DNase-TOLUIDINE BLUE AGAR

DNase-toluidine blue agar ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างเอนไซม์ deoxyribonuclease (DNase) ซึ่งใช้ในการย่อยสลาย deoxyribonucleic acid (DNA) ได้ oligonucleotides โดย inoculate เชื้อในอาหารที่มี DNA และ metachromatic dye toluidine blue ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยานี้ เช่น ใช้แยกเชื้อ

1. *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* spp. (+) ยกเว้น *S. proteamarculans* subsp. *proteamarculans* (ชื่อเดิม *S. liquefaciens* ส่วนใหญ่ให้ผล V/+) จากเชื้อ *S. fonticola* (-) และ *Klebsiella-Enterobacter* spp. (-)
2. *Moraxella catarrhalis* (+) และ *Kingella dentrificans* (+) จาก *Neisseria* spp. (-) เชื้อประจำถิ่นของทางเดินหายใจขึ้นได้ไม่ดีบนอาหารนี้จึงใช้เป็นอาหารที่แยก *Moraxella catarrhalis* จากเสมหะอย่างรวดเร็ว
3. *Plesiomonas shigelloides* (-) จาก *Aeromonas* spp. (+)

วิธีการทดสอบ ป้ายเชื้อที่ได้จากการเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น BA ค้างคืนมาป้ายเป็นวงบนอาหารนี้ อบที่ 35-37 ^{o}C 24-36 ชม. จนเห็นเชื้อเจริญเต็มที่ ผลบวกจะเห็นเป็นวงสีชมพู ผลลบไม่เกิดสีชมพู

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = ควบคุมผลลบ (ไม่เกิดสีชมพู)
2. *Serratia marcescens* = ควบคุมผลบวก (สีชมพู)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 347 1/14/58 BE 3:51 PM

GELATIN MEDIUM

Gelatin mediun ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (gelatinases) ซึ่งไปย่อย gelatin เป็น amino acid ทำให้เสียคุณสมบัติการเกิด gelling ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยานี้ เช่น ใช้แยก

1. *Listeria monocytogenes* (-) จาก *Arcanobacterium pyogenes* (*Actinomyces pyogenes*/ *Corynebacterium pyogenes*) (+)
2. *Nocardia brasiliensis* (+) จาก *Nocardia asteroids* (-), *N. farcinia* (-), *N. nova* (-), *N. otididiscarviarum* (-) และ *N. transvalensis* (-)

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Serratia marcescens* = ควบคุมผลบวก
2. *Escherichia coli* = ควบคุมผลลบ

INDOLE TEST

จุลชีพที่สามารถสร้างเอนไซม์ trytophanase จะเปลี่ยน tryptophan เป็น indole ตรวจ indole ได้โดยเติม p-dimethyaminobenzaldehyde (Ehlich's หรือ Kovac 's reagent) ลงในอาหารเหลวที่มี trytophan ที่เลี้ยงเชื้อผลบวกจะมีสีแดงที่ชั้นบนของอาหารเหลว ผลลบจะเป็นสีเหลือง ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยานี้ เช่น ใช้แยก

1. *E. coli* (+) จาก *จาก Klebsiella* spp. (-) ยกเว้น *K. oxytoca* (+), *Enterobacter* (-), *Hafnia* (-), *Serratia* (-), *Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans*) (-)
2. *Cardiobacterium hominis* (+weak) จาก *Eikenella corrodens* (-), *Kingella* spp. (-), และ *Suttonella indologenes* (*Kingella indologenes*) (-)
3. *Paenibacillus alvei* (*Bacillus alvei*) (+) จาก *Bacillus* spp. อื่น (-)

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = ควบคุมผลบวก (สีแดงเมื่อหยด Kovac's reagent)
2. *Enterobacter cloacae* = ควบคุมผลลบ (สีเหลืองตรง Kovac's reagent)

LYSINE IRON AGAR

Lysine iron agar ใช้ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งในการ decarboxylate หรือ deaminate lysine และให้ hydrogen sulfide (H_2S) เมื่อ glucose ที่มีปริมาณน้อยในอาหารถูกย่อยสลาย (ferment) ก้นหลอดจะเปลี่ยนเป็นกรด (สีเหลือง) ถ้าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ lysine decarboxylase จะสร้าง cadaverine ขึ้น cadaverine จะ neutralize organic acids ที่ถูกสร้างจากการ ferment glucose ทำให้ก้นหลอดเปลี่ยนกลับไปเป็นด่าง (สีม่วง) เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ lysine deaminase จะได้สารประกอบที่ทำให้ slant เปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง แต่ถ้า

14-0992(001-354)editnew130158.indd 348 1/14/58 BE 3:51 PM

ไม่มี deamination, slant จะยังคงมีสีม่วงเหมือนเดิม แบคทีเรียที่สร้าง gas hydrogen sulfide เมื่อถูกกับ ferric ammonium citrate ในอาหารจะให้ตะกอนสีดำของ ferrous sulfide

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

Organisms	LDA	LDC	H_2S
Salmonella spp.	-	+	+
Proteus mirabilis	+	-	-

MALONATE BROTH

Malonate broth ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการใช้ sodium malonate เป็นแหล่งของ carbon ถ้าสามารถใช้ได้ จะได้ผลลัพธ์ที่เป็นด่าง

ข้อควรระวังในการอ่านผล การอ่านผล malonate เป็นการอ่านความเป็นด่างในอาหารไม่ใช่อ่านการใช้ malonate เชื้อบางชนิดให้ด่างจำนวนน้อย การอ่านผลจึงควรเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ การอ่านผลลบต้องอ่านเมื่ออบหลอดที่ใส่เชื้อไว้ 48 ชม. การอ่านผลหลัง 48 ชม.หากมีด่างเล็กน้อยให้อ่านผลเป็นลบ

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Klebsiella pneumoniae* = ควบคุมผลบวก (สีน้ำเงิน)
2. *Escherichia coli* = ควบคุมผลลบ (สีเขียว)

METHYL RED-VOGES PROSKAUER (MR-VP) MEDIUM

MR-VP medium ใช้

1. ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างและคงไว้ซึ่งผลที่เป็นกรดจากการย่อยสลาย glucose เป็นการตรวจปริมาณของกรด (quantitative test) เชื้อบางชนิดสร้างกรดจำนวนมากกว่าเชื้อบางชนิด อ่านผลโดยเติม methyl red reagent ผลบวกให้สีแดง ผลลบให้สีเหลือง ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยานี้ เช่น ใช้ในการแยกเชื้อ

   1. *E. coli* (+) จาก *Enterobacter aerogenes* (-), *Enterobacter cloacae* (-)
   2. *Edwardsiella ictaluri* (-) จาก *E. tarda* (+) และ *E. hoshinae* (+)

2. ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้าง acetylmethylcarbinol (acetoin) จากการย่อยสลาย glucose ในภาวะที่เป็นกลาง อ่านผลโดยเติม 5% α-naphthol ใน absolute ethyl alcohol และ 40% potassium hydroxide ผลบวกให้สีแดง ผลลบเป็นสีน้ำตาล ปกติแบคทีเรียจะให้ผลMR (+) หรือ VP (+) หรือ (-) ทั้งสองปฏิกิริยา แบคทีเรียที่ให้ผล MR+/VP+ จึงใช้เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ แบคทีเรียที่ให้ผล MR+/VP+ ได้แก่

   1. *Aeromonas hydrophila*
   2. *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*

14-0992(001-354)editnew130158.indd 349 1/14/58 BE 3:51 PM

3. *Aeromonas veronii*
4. *Listeria* spp.
5. *Vibrio metschnikovii*

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = MR + (สีแดง), VP - (สีน้ำตาล)
2. *Enterobacter* spp. = MR - (สีเหลือง), VP + (สีแดง)

MOTILITY TEST MEDIUM

Motility medium ใช้ทดสอบว่าแบคทีเรียเคลื่อนไหวได้หรือไม่ ซึ่งแบคทีเรียเคลื่อนไหวโดย flagella ซึ่งพบในแบคทีเรียที่เป็นรูปแท่ง แบคทีเรียที่เคลื่อนไหวได้อาจมี flagella เส้นเดียวหรือหลายเส้นก็ได้ ตำแหน่งของ flagella อาจแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิดและภาวะที่เลี้ยงเชื้อ ในบางครั้งแบคทีเรียที่เคลื่อนไหวได้อาจเปลี่ยนเป็นแบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนไหว แบคทีเรียที่เคลื่อนไหวไม่ได้ไม่มี flagella ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยา motile ในการแยกเชื้อ เช่น

1 *Bacillus anthracis* (-) และ *B. mycoides* (-) จาก *Bacillus* spp. (+) อื่นๆ
2. *Edwardsiella ictaluri* (-) จาก *E. tarda* (+)
3. *Salmonella* spp. (+) จาก *Shigella* spp. (-)

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Klebsiella pneumoniae* = non motile
2. *Enterobacter cloacae* = motile

NITRATE BROTH FOR NITRATE REDUCTION TEST

Nitrate broth ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการเปลี่ยน nitrate เป็น nitrites หรือ nitrogen gas หลังเพาะเชื้อใน nitrate broth เป็นเวลา 16-24 ชม. เติมน้ำยา α-Naphthylamine 0.5% (ต้องระวังในการใช้เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง) หรือ N, N-dimethyl-α-Naphthylamine 0.6% แล้วเติม sulfanilic acid ในปริมาณเท่ากัน (อย่างละ 5 หยด)

การอ่านผล ผลบวกได้สีแดง (แสดงว่ามีการ reduce nitrate เป็น nitrites) ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติม zinc dust ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าเป็นผลลบ ถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่า nitrate ถูก reduce เป็น nitrogen gas ให้อ่านผลเป็นบวก

14-0992(001-354)editnew130158.indd 350 1/14/58 BE 3:51 PM

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = ควบคุมผลบวก (สีแดง)
2. *Pseudomonas aeruginosa* = ควบคุมผลบวก มีแก๊ส (ไม่มีสีหลังเติม Zinc dust)
3. β-*Streptococcus* group A = ควบคุมผลลบ (ไม่มีสีก่อนเติม Zinc dust หรือ มีสีแดงหลังเติม Zinc dust)

OF MEDIUM

OF-basal medium เป็น based ที่ใช้เติม น้ำตาลต่างๆ 1% เพื่อทดสอบ oxidative หรือ fermentative metabolism ของ carbohydrate ในแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถ ferment น้ำตาลในหลอด จะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองในภาวะที่มีและไม่มี oxygen แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเฉพาะภาวะที่มี oxygen เท่านั้นแสดงว่าเชื้อสามารถ oxidize น้ำตาลในหลอด ถ้าอาหารไม่มีการเปลี่ยนสีทั้งภาวะที่มีและไม่มี oxygen (เป็นสีฟ้า) แสดงว่าแบคทีเรียนั้นเป็นเชื้อ non-oxidizer สำหรับน้ำตาลในหลอด

การควบคุมคุณภาพ เมื่อเตรียม 1% glucose OF ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = fermenter (สีเหลือง ทั้ง 2 หลอด)
2. *Pseudomonas aeruginosa* = oxidizer (สีเหลืองหลอดที่ไม่ปิด oil)
3. *Acinetobacter lwoffii* = non oxidizer (สีน้ำเงิน ทั้ง 2 หลอด)

SALT TOLERANCE TEST

Salt tolerance test ใช้ดูการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในภาวะที่มีเกลือสูง ซึ่งใช้ในการแยก enterococci (positive) ออกจากพวก non enterococci (negative) ใช้ BHI broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมเกลือ NaCl 6.5% ผลบวกเชื้อเจริญ (ขุ่น) ผลลบเชื้อไม่เจริญ (ใส)

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Enterococcus* = ควบคุมผลบวก (ขุ่น)
2. β-*Streptococcus* group A = ควบคุมผลลบ (ใส)

SODIUM CHLORIDE

Sodium chloride ที่มีความเข้มข้น 0, 3, 6, 8 ถูกนำมาใช้ดูความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่จะเจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ในระดับต่างๆกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อและสามารถนำมาใช้เป็นหลักในการแยกเชื้อระหว่างกลุ่มของ *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. และ *Pleisiomonas shigelloides* ผลบวกเชื้อเจริญ (ขุ่น) ผลลบเชื้อไม่เจริญ (ใส)

14-0992(001-354)editnew130158.indd 351 1/14/58 BE 3:51 PM

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

	Sodium chloride	0%	3%	6%	8%
1.	*Vibrio cholerae*	+	+	+/-	-
2.	*Vibrio parahaemolyticus*	-	+	+	+

STUART'S TRANSPORT MEDIUM

Stuart's transport medium เป็น transport medium สำหรับเก็บสิ่งตรวจผู้ป่วยที่มีแบคทีเรีย ยีสต์ หรือรา ในอาหารนี้ใช้ glycerol phosphate เพื่อช่วยรักษาสภาพของสิ่งตรวจรวมทั้งสภาพของ pH methylene blue จะเป็น redox indicator และ sodium thioglycollate จะช่วยให้พวก anaerobic bacteria สามารถอยู่ได้ ถ่านที่เติมทำหน้าที่เป็น detoxifying agent อาหารนี้ใช้สะดวกโดย sterile swab จะถูกดึงออกมาใช้ โดยปราศจากการปนเปื้อนที่ปลาย เป็นวิธีที่ปลอดภัยในการเก็บสิ่งตรวจรวมทั้งการรักษา ตลอดจนการขนส่ง มายังห้องปฏิบัติการ

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Neisseria gonorrhoeae* 8 ชม. subculture บน CA = เจริญ
2. *Stretococcus* group A 8 ชม. subculture บน BA = เจริญ

TRIPLE SUGAR IRON (TSI) AGAR

Triple sugar iron agar ประกอบด้วยน้ำตาลสามชนิด คือ sucrose, lactose และ glucose ในสัดส่วน 10:10:1 ทดสอบการสร้าง H_2S โดยมี sodium thiosulfate เป็นแหล่งของ sulfur atoms มี ferrous sulfate และ ferric ammonium citrate ซึ่งทำปฏิกิริยากับ H_2S ให้ตะกอนสีดำของ ferrous sulfide ในหลอด TSI ส่วนที่เป็น slant มีภาวะ aerobic เพราะสัมผัสกับ oxygenในอากาศ ขณะที่ส่วนที่เป็น butt มีภาวะเป็น anaerobe เพราะไม่สัมผัสกับอากาศ การสร้างก๊าซ CO_2 และ H_2 ตรวจได้จากการพบฟองอากาศในอาหาร การทดสอบใช้ needle ปราศจากเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อที่อยู่เดี่ยวๆ หรือเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวแทงลงไปให้ถึงก้นหลอดและขีดที่หน้า slant อบเชื้อไว้ 16-18 ชม. อ่านผลดังนี้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ (N/N) แสดงว่าไม่ย่อยสลายน้ำตาล ในอาหารจึงไม่ใช่เชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ถ้าเชื้อย่อยสลาย glucose อย่างเดียว จะให้สีเหลืองที่ butt ส่วน slant จะเป็นสีแดงเนื่องจากการย่อย peptones ในภาวะที่มีออกซิเจนผลที่ได้เป็น K/A ถ้าได้ A/A แสดงว่าย่อยสลาย glucose และ lactose หรือ sucrose

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Escherichia coli* = A/A, gas +
2. *Proteus mirabilis* = K/A, H_2S +
3. *Pseudomonas aeruginosa* = K/K หรือ K/N

14-0992(001-354)editnew130158.indd 352 1/14/58 BE 3:51 PM

UREASE TEST MEDIUM

Urease test medium ใช้ทดสอบความสามารถของจุลชีพในการสร้างเอนไซม์ urease ไป hydrolyse urea ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ammonia และ CO_2 และรวมเป็น ammonium carbonate ซึ่งเป็นด่างมีค่า pH 8.1 ในอาหารมี phenol red เป็น indicator เมื่อได้ด่างจะเกิดสีชมพู-สีบานเย็น ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี ตัวอย่างการใช้ปฏิกิริยานี้ในการวินิจฉัยเชื้อ เช่น

1. Genus *Proteus* ให้ผลบวกอย่างรวดเร็ว ยกเว้น *P. inconstans* ให้ผลลบ
2. Genus *Providencia* ให้ผลลบหรือ variable
3. ใช้แยก *Actinobacillus seminis* (-) จาก *Actinobacillus* spp. (+) อื่น
4. ใช้แยก *Bartonella felis* (+) จาก *Bartonella* spp. (-) อื่น
5. ใช้แยก *Olligella ureolytica* (+) จาก *O. urethralis* (-)
6. ใช้แยก *Weeksella zoohelcum* (+) จาก *W. virosa* (-)
7. ใช้ช่วยในการวินิจฉัย *V. parahaemolyticus* คือผล urease ไม่แน่นอนแต่ส่วนใหญ่เป็นบวก *Helicobacter* spp., *Brucella* spp. ให้ผล urease test บวกอย่างรวดเร็ว เป็นต้น

การควบคุมคุณภาพ ใช้เชื้อ

1. *Proteus mirabilis* = positive (สีบานเย็น)
2. *Escherichia coli* = negative (ไม่เปลี่ยนสี)

หมายเหตุ การทำให้ urea ปราศจากเชื้อต้องใช้วิธีกรอง

เอกสารอ้างอิง

1. Luis M. de la Maza, Marie T. Pezzlo, Janet T Shigei and Ellena M Peterson. Color Atlas of Medical Bacteriology. Washington, DC: ASM Press; 2004.
2. MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
3. Mindy J Perilla , et al. 2003. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. WHO.CDS/CSR/RMD/2003.6

14-0992(001-354)editnew130158.indd 353 1/14/58 BE 3:51 PM