

การจำแนกไมโครคอมพิวเตอร์ในงานการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อ Enterobacteriaceae

วรายวิทย์ เกตราไชยอนันต์ มารศรี ภารารจนาพันธ์ และ ประสิทธิ์ ธาวาจิติกุล

บทคัดย่อ รายงานนี้ ได้ศึกษาการพิสูจน์แยกชนิด (Identification) ของเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae โดยหยดเชื้อที่ขุ่นน้ำเกลือลงในหลุมของ microtiter plate ที่มีรายการทดสอบทางชีวเคมี 12 ชนิด หลังจากการอุ่นเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แผลผลที่ได้ด้วยโปรแกรมไมโครคอมพิวเตอร์ "COMENTBACM" ซึ่งวิธีการพิสูจน์ทำได้รวดเร็ว ให้ผลสอดคล้องกันจำนวน 134 จาก 150 รายของเชื้อที่แยกได้ (89.33%) (คำรหัส : ไมโครคอมพิวเตอร์, Enterobacteriaceae) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน 2533 หน้า 149-154

Abstract Rapid Identification of Enterobacteriaceae by Microcomputer and Microbiochemical Methods. Pettrachaiant V, Krairojanant M and Tharavichitkul P.

Rapid identification of Enterobacteriaceae could be performed by suspending the organism in sterile normal saline and dropping into each well of microtiter plate which contained of 12 biochemical tests. After 4 hours of incubation, the biochemical results were interpreted by microcomputer program "COMENTBACM". The program was developed under dBase III plus. It was revealed that this rapid microbiological method gave the correct identification of 134 from 150 isolates (89.33%). (Keyword : Microcomputer, Enterobacteriaceae) Bull Chiang Mai AMS 1990; 23: 149-154

ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ของนายวรายวิทย์ เกตราไชยอนันต์
* ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ** หน่วยปฏิบัติการกลาง คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เรา นี้ ได้มีการนำการทดสอบทางชีวเคมี (เช่น) เข้ามาใช้ในการพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae นอกจากนั้นยังมีเทคนิคอื่นๆ ซึ่งให้ความแม่นยำในการพิสูจน์เชื้อ ได้แก่วิธี Antibiotic susceptibility patterns, Species specific bacteriophages, DNA-DNA hybridization เป็นต้น เทคนิคเหล่านี้ ทำให้สามารถแยกเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ออกเป็น genera, species และ biogroup ได้มากมาย ในปี ค.ศ. 1970 Rapka^(1,2) ได้นำเอาไมโครคอมพิวเตอร์เข้ามาใช้ในการช่วยวิเคราะห์และเก็บข้อมูลทางจุลชีววิทยา ต่อมาได้มีการปรับปรุงโปรแกรม เพื่อให้ได้วิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็ว⁽³⁾ การทดสอบทางชีวเคมีในต่างประเทศ ได้นิยามชุดนํ้ายาสำเร็จรูป (Kit) ได้แก่ API 20E, Micro ID, Enteri tek, Entertube II, Microdilution system, Minetek⁽⁴⁾ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อ และนํ้ายาสำเร็จรูปเหล่านี้มีราคาแพงมากเกินไปที่จะซื้อหามาใช้ได้งานประจำวันในประเทศไทยของเราได้ การศึกษานี้ จึงทำเพื่อพิสูจน์เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นเอง และทำการทดสอบโดยวิธีรวดเร็วภายใน 4 ชั่วโมง ซึ่งหวังว่าต่อไป จะสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์วิธีการ
วิธีรวดเร็ว

นำเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ได้พิสูจน์แล้ว จำนวน 150 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในบิสลัท และกระจายเชื้อในนํ้าเกลือ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.2 และนำเชื้อมาหยด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใน microtiter plate ซึ่งมีนํ้ายาการทดสอบ 12 ชนิด ได้แก่ glucose, OCD, H₂S, Indole,

Malonate, ONPG, Urea, Phenylalanine deaminase, VP, arabinose, sorbitol, motile และ oxidase จากนั้น ปิด microtiter plate ด้วยฟาฟลาสติกภาว แล้วเพาะเชื้อไว้ที่ 37°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งอาจเลือกใช้ Common program หรือ Large program Computer Program

Common program เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่บันทึกข้อมูลของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่พบได้บ่อยๆ ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพื่อลดจำนวนของฐานข้อมูล ทำให้เพิ่มความรวดเร็วในการปฏิบัติงาน ส่วน Large program เป็นโปรแกรมที่ซับซ้อนที่เก็บข้อมูลของเชื้อ ที่มีโอกาสพบได้จากสิ่งส่งตรวจของมนุษย์

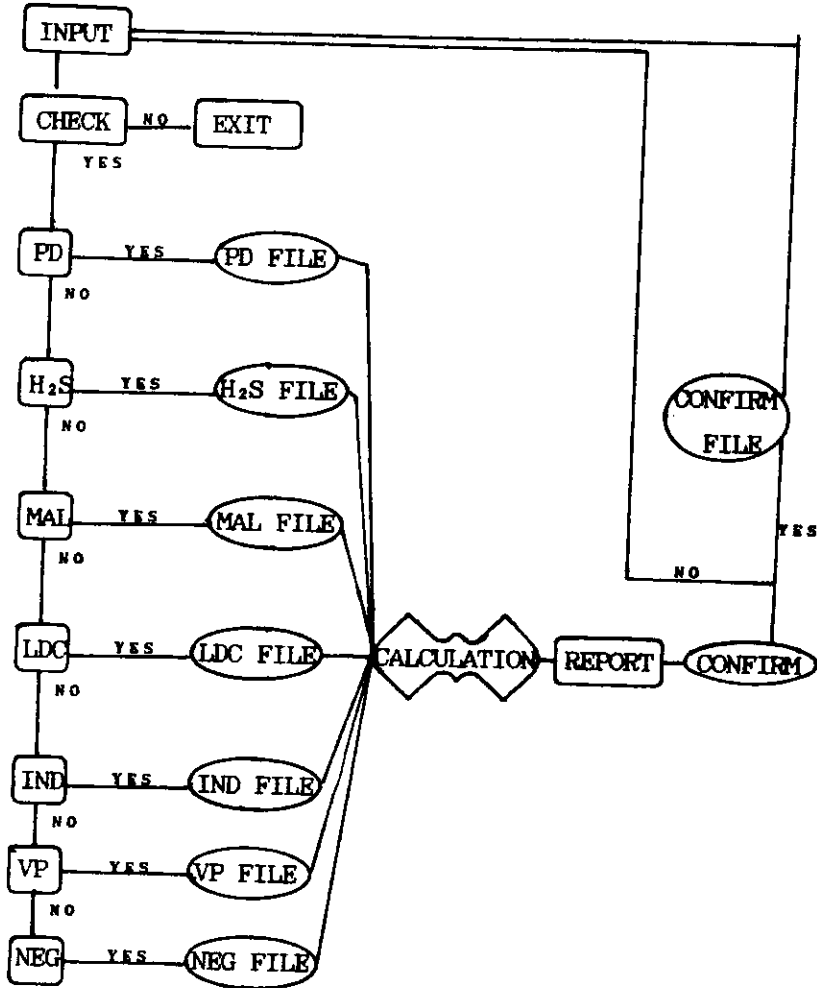
โปรแกรม เขียนโดยใช้โปรแกรมภาษา dBase III plus และมีพนักงานทำงาน ตามแผนภาพที่ 1

ผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบ การทดสอบอย่างรวดเร็ว ระหว่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน blood agar และ McConkey agar จำนวน 100 สายพันธุ์ ปรากฏว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน blood agar ให้ผลการทดสอบถูกต้อง 92% ส่วนเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน McConkey agar ให้ผลถูกต้อง 75%

เมื่อทำการพิสูจน์เชื้อโดยวิธีรวดเร็ว ที่สามารถอ่านผลได้ภายใน 4 ชั่วโมง เทียบกับวิธีมาตรฐานที่จำเป็นประจำ พบว่าให้ผลถูกต้อง 134 isolates จาก 150 isolates คิดเป็น 89.33% ส่วนเชื้อที่อ่านผิดไป 16 isolates คิดเป็น 10.67% ได้แก่ Enterobacter cloacae 6 isolates, Enterobacter sakazakii 2 isolates, Escherichia coli 2 isolates, Shigella sonnei 1 isolate, Klebsiella pneumoniae 2

แผนภาพที่ 1 แสดงการทำงานของ computer program



*** COMMON ORGANISM IN ROUTINE ***

GLU	LDC	ODC	H ₂ S	IND	MAL	ONPG	UR	PD	VP	ARA	SOR	MOT
+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-

NAME	PERCENT	SCORE
<i>K.pneumoniae</i>	96.75	0.96748327
<i>K.oxytoca</i>	1.98	0.01975642
<i>E.aerogenes</i>	1.22	0.01222573
<i>Hafnia alvei</i>	0.05	0.00046486
<i>E.coli</i>	0.01	0.00006973

DO YOU WANT TO CONFIRM (Y/N)

Table 1 Incorrect identification by rapid test

Quantity	Organism	Incorrect identification	Incorrect reaction
1	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.ozaenae</i>	VP
1	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.lipuefaciens</i>	- ^a
1	<i>K.rhinoscleromatis</i>	<i>K.ozaenae</i>	Sor
1	<i>K.sonnei</i>	<i>Y.pestis</i>	ONPG
1	<i>P.rustigianii</i>	<i>P.alcalifaciens</i>	- ^b
1	<i>P.rettgeri</i>	<i>P.stuartii</i>	Urea
3	<i>E.cloacea</i>	<i>E.sakazakii</i>	Sor
2	<i>E.cloacae</i>	<i>E.aggolmerens</i>	Sor
1	<i>E.cloacea</i>	<i>H.alvei</i>	LDC and Sor
1	<i>E.cloacea</i>	<i>E.taylorae</i>	Sor
1	<i>E.sakazakii</i>	<i>H.alvei</i>	LDC and Mal
1	<i>E.sakazakii</i>	<i>E.taylorae</i>	Mal
1	<i>E.coli</i>	<i>E.fergusonii</i>	Sor

^a = differentiate by motility, ^b = differentiate by Trehalose and Inositol

isolates, *Klebsiella rhinoscleromatis* 1 isolate, *Providencia rustigianii* 1 isolate และ *Providencia rettgeri* 1 isolate

การแปลผลเปรียบเทียบระหว่าง computer program 2 program ผลปรากฏว่า common program แปลผลถูกต้อง 89.33% และ Large program แปลผลถูกต้อง 84.66% แสดงถึง เชื่อที่พิสูจน์ผิด ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อใน genus *Enterobacter* และ อาหารทดสอบที่อ่านผลผิดพลาดที่สุดคือ sorbitol

วิจารณ์

เมื่อเปรียบเทียบการทดสอบที่เสนอ กับการวินิจฉัยโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่างๆ ได้แก่ API 20E, Enteri Tek, Enterotube II, Micro Dilution System และ Minetek ซึ่งให้ผลการพิสูจน์เชื้อใน family นี้ถูกต้องเป็น 92%, 96.3%, 96.5%, 97% และ 93.8% ตามลำดับ^(๕) ซึ่งดูจากจำนวนเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง วิธีที่เสนอนี้อาจให้ค่าที่ต่ำกว่า แต่เชื่อว่า ถ้าได้รับการปรับปรุงต่อไป อาจมีความถูกต้องเพิ่มขึ้นจนเป็นที่น่าพอใจได้

สาเหตุ ที่ทำให้วิธีการพิสูจน์เชื้ออย่างรวดเร็วได้ผลผิดพลาด อาจสรุปได้เป็นข้อๆ ดังนี้

1. การอ่านผลการทดสอบผิด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุเกือบทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สารที่ใช้น้ำในการทดสอบได้ช้า ทำให้การอ่านผลภายในเวลาการเพาะเลี้ยง 4 ชั่วโมงไม่ชัดเจน เช่น การทดสอบด้วยน้ำตาล sorbitol ซึ่งมี pH สูงประมาณ 8 ภายในเวลา 4 ชั่วโมง อาจทำให้เชื้อย่อยน้ำตาล แล้วเกิดเป็นกรดได้ไม่มากพอที่จะเปลี่ยน pH ให้ต่ำลงจนทำให้ indicator เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองได้สมบูรณ์ จะเห็นเป็นเพียงสีเขียวอ่อน ทำให้การอ่านผลผิดพลาด ถ้าหากได้ทำการอ่านเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก

มากกว่า 4 ชั่วโมง อาจจะทำให้สีของ indicator เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอย่างสมบูรณ์ ในการทดสอบครั้งนี้ พบความผิดพลาดจำนวน 9 ตัวอย่าง จากการทดสอบ 150 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 6%

น้ำตาล sorbitol สามารถแยก *E.coli* ออกจาก *E.fergusonii*^(๕) ถ้าอ่านผลผิดไป จะอ่านผลเป็นเชื้ออีกชนิดหนึ่ง สาเหตุหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงของ pH เนื่องจากขั้นตอนการ sterile โดยการ autoclave ความร้อนจะทำให้ peptone base ซึ่งเป็นส่วนผสมอยู่ในอาหารชนิดนี้ด้วย เพิ่มความเป็นด่างแก่สารละลาย ทำให้ pH สูงขึ้น การแก้ไขปัญหานี้ ต้องทำการปรับ pH ของสารละลายให้หลังจากทำการ autoclave แล้ว และสีของอาหารเปลี่ยนมาจากสีเขียวเป็นสีฟ้าด้วย HCl 0.1N

2. โปรแกรม ที่ใช้แปลผล การพิสูจน์เชื้ออาศัยผลการทดสอบเพียง 12 ชนิด ยังไม่เพียงพอ เชื้อบางกลุ่มให้ผลที่คล้ายกันมาก แต่สามารถแยกจากกันได้ด้วยวิธีการทดสอบ Motility เช่น *K.pneumoniae* (non motile), *S. lipuefaciens* (motile) ให้เปอร์เซ็นต์ 87% ดังนั้น การทดสอบอย่างรวดเร็วนี้ ควรนำเอาการทดสอบ motility เข้ามาช่วยแปลผลร่วมด้วย

3. เชื้อบางสายพันธุ์ใน genus เดียวกัน การทดสอบ 12 ชนิดของวิธีการทดสอบอย่างรวดเร็วนี้ ไม่สามารถแยกเชื้อบางสายพันธุ์ใน genus เดียวกันออกจากกันได้ เช่น การแยก *P.rustigianii* จาก *P.alcalifaciens* ต้องทำการทดสอบเพิ่ม โดยทดสอบกับน้ำตาล Trehalose, Galactose, Adonitol^(๖) เพื่อแยก species ทั้ง 2 ออกจากกัน

4. Computer program ที่สร้างขึ้น เขียนด้วยภาษา dBase III plus การแปลผล

โดยคอมพิวเตอร์ เชื้อบาง species ให้เปอร์เซ็นต์ความน่าจะเป็นต่ำ หรือแปรปรวนมาก อาจเป็นเพราะฐานข้อมูลที่ใช้ เป็นฐานข้อมูลของต่างประเทศซึ่งมี factor ต่างๆ ผิดกับในประเทศไทยของเรา จึงทำให้ฐานข้อมูลผิดกันบ้าง ผลที่ออกมาจึงมีความแปรปรวน นอกจากนั้น ข้อมูลที่ใช้ เป็นผลที่ได้จากการอ่านผลหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อไปแล้วเพียง 4 ชั่วโมง

สรุป

การทดสอบโดยวิธี Microbiochemical และแปลผลโดยไมโครคอมพิวเตอร์ สามารถให้ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อ Enterobacteriaceae อย่างรวดเร็วเพียง 4 ชั่วโมง โดยให้ผลถูกต้อง 89.33% และเชื้อที่ให้การตรวจพิสูจน์ผิดไป 16 สายพันธุ์ คิดเป็น 10.67% จากเชื้อทั้งหมด 150 สายพันธุ์ การทดสอบที่ทำให้ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อผิดไปได้มากที่สุดคือ การตรวจด้วยน้ำตาล sorbitol ซึ่งต้องมีการปรับปรุงแก้ไขให้แน่นอน และเชื้อที่ใช้ในการทดสอบควรทำการเพาะเลี้ยงบน blood agar เนื่องจากมีการรบกวนจากปัจจัยต่างๆ น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงบน McConkey agar

เอกสารอ้างอิง

1. Rapka EW. Truthable classification and identification. Space Life Sci 1971; 3: 135-156.
2. Rapka EW, Clapper WE, Bowen IG and Babb R. A Model for identification of bacteria. J Gen Microbiol 1967; 46: 407-424.

3. Farmer JJ, III BR, Davis FW, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1984; 21: 46-76.
4. Nissen B. Microtests for rapid identification of Enterobacteriaceae. Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B. 1984; 92: 239-245.
5. มวลัย วรจิตร. ชุดน่ายาสำเร็จรูปที่ใช้ในการวินิจฉัย Bacteria และเชื้อรา. วารสารสมาคมเทคนิคการแพทย์ ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2529 หน้า 13-17.
6. ประสิทธิ์ ธีราภิตรกุล. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และการคิดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา และหน่วยปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2529, หน้า 11-18.

มารศรี ไกรโรจนานันท์,

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่