



THE EVALUATION OF THE HEMOCULTURE PROCEDURES IN NAKORN CHIANG MAI HOSPITAL LABORATORY

เพ็ญประภา จันทร์บรรเจิด วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
สุชาติ ศิริกุล วท.ม. (จุลชีววิทยา)*

บทคัดย่อ

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย จำนวน 172 ตัวอย่างที่ส่งมาจากแผนกอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ นำมาทำ hemoculture โดยวิธี routine subculture bottle (RB) และ control bottle (CB) system พบว่า RB ให้ผลที่ Sensitive มากกว่า CB system 4.07% ในขณะเดียวกัน ตัวอย่างเลือด 167 ตัวอย่างจากแหล่งเดียวกัน นำมาทำ hemoculture แบบ routine subculture test tube (RT) system ก็ให้ผลที่ sensitive มากกว่า control test tube (CT) system ด้วย 1.2%. จากการเปรียบเทียบ sensitivity ของการใช้เลือด ตัวอย่าง 5 ml. (RB) และ 1 ml. (RT) โดยที่ให้อัตราส่วนของเลือดต่อ broth 1:10 คงเดิม ในการทำ hemoculture พบว่า RB มีแนวโน้มที่จะให้ผล sensitivity มากกว่า RT 5.13% แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เพราะพบว่าในบางราย (0.87%) RT ให้ผลที่ Sensitive ต่ำกว่า CB จึงควรมีการทดลองต่อไป.

บทนำ

เลือดของคนปกติจะอยู่ในลักษณะที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด ดังนั้นเลือดที่มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ จึงเป็นเครื่องชี้ให้เห็นถึงภาวะที่ผิดปกติ หรือภาวะที่เป็นโรค การที่เลือดมีเชื้ออยู่นั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากผู้ป่วยมี traumatic

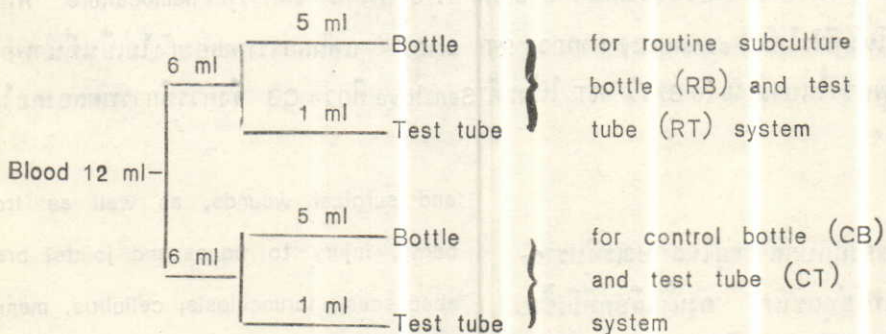
and surgical wounds, as well as from burns, injury to bones and joints, brain abscesses, furunculosis, cellulitis, meningitis, Pneumonia, lung abscesses, empyema, mucoviscidosis, mycotic aneurysm, cardiac anomalies, peritonitis, intestinal or biliary

* ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

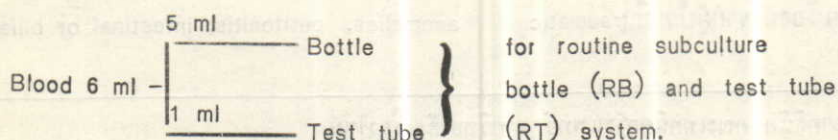
obstruction, cholangitis, carcinoma, urinary obstruction, nephropathies, post partum endometritis and septic abortion.⁽¹⁾ เป็นต้น ซึ่งการที่ผู้ป่วยมีเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต จะมีผลทำให้เกิด Septicemia โลหิตเป็นพิษ และตายในที่สุดได้, ฉะนั้นการทำ blood หรือ Hemoculture จึงเป็นประโยชน์ในด้านการหาสาเหตุของโรคเพื่อการรักษา และติดตามผลของการรักษา วิธีการแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของ Septicemia ให้ได้โดยทันทีและแม่นยำเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุด⁽¹⁾ ดังนั้นการทดลองนี้จึงสนใจวิธีการ การทำ Hemoculture โดยมีวัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบวิธีการทำ hemoculture แบบวิธี subculture system และ control system ในด้าน contamination และ Sensitivity ของวิธีการทั้ง 2 แบบ

วิธีการที่ 1 เจาะเลือด 12 ml ใส่ลงในขวดหรือหลอดแก้วดังนี้



วิธีการที่ 2 เจาะเลือด 6 ml



2. เปรียบเทียบ sensitivity ของการเจริญของเชื้อเมื่อใช้จำนวนเลือดในการทำ culture 5 ml และ 1 ml ในอัตราส่วนของเลือดต่ออาหารเลี้ยงเชื้อคงเดิม

วัตถุและวิธีการ

1. สิ่งส่งตรวจ เลือดเจาะจากผู้ป่วยของแผนกอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่

2. อาหารเพาะเชื้อ broth ที่ใช้เป็น Brain Heart Infusion broth (BHI) (Difco) prepared according to the manufacturer's instruction บรรจุในขวด 45 ml. และใน test tube 1 ml.

3. Blood Collection การเจาะเก็บเลือด ทำวิธีการใดวิธีการหนึ่ง ใน 2 วิธีการดังนี้

การทดลอง

Subculture system

Day	Blood in Brain Heart Infusion broth (1:10)
1	All incubate at 37°C
2	All streak on chocolate agar plate incubate at 37°C (10%CO ₂) and check turbidity and reincubate
3	Check turbidity Check chocolate agar identify and antibiotic sensitivity test
4	Check turbidity Report organism and antibiotic sensitivity
5	Check turbidity
6	Check turbidity All streak on chocolate agar plate as day 2 nd .
7	Report :- No growth in 7 days.

วันที่ 1 incubate ขวดและหลอดแก้ว hemoculture ไว้ที่ 37°C

วันที่ 2 subculture broth จากขวดและหลอดแก้วลงใน chocolate agar plate, incubate ไว้ที่ 37°C ในบรรยากาศของ 10% CO₂ ตลอดคืน ถ้ามีขวดหรือหลอดแก้วที่ขึ้นก็ทำการย้อมด้วยวิธี gram stain ถ้าพบเชื้อก็รายงานผลเป็น preliminary report ว่าพบเชื้อพวกใด. ขวดและหลอดแก้วทั้งหมด Reincubate ต่อไปอีกเดิม

วันที่ 3 อ่าน chocolate agar plate ถ้าพบว่ามีเชื้อขึ้นก็ identify และทำ antibiotic

sensitivity test และรายงานผลในวันรุ่งขึ้น ส่วนขวดหรือหลอดแก้วที่ยังไม่ขึ้นเชื้อขึ้น ก็สังเกตดูความขึ้น ถ้าขึ้นก็ Subculture ลงใน chocolate agar plate ถ้าไม่ขึ้นก็ reincubate ต่อไป

วันที่ 4 สังเกตดูความขึ้นของ broth ถ้าขึ้นก็ subculture ดังกล่าวแล้ว ถ้ายังไม่ขึ้นก็ reincubate ต่อไป

วันที่ 5 เช่นเดียวกับวันที่ 4

วันที่ 6 subculture broth ลงใน chocolate agar แล้ว incubate ที่ 37°C ในบรรยากาศ 10% CO₂ ตลอดคืน

วันที่ 7 อ่าน Chocolate agar plate ถ้ามีเชื้อขึ้นก็ identify และทำ antibiotic sensitivity test และรายงานผลในวันรุ่งขึ้น ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นก็รายงานผลว่า "No growth in 7 days"

หมายเหตุ ขวดหรือ tube รายใดก็ตามที่ รายงานโดยสมบูรณ์ออกไปแล้ว ให้คัดทิ้งไปได้เลย ไม่ต้อง Reincubate ต่อไป

Control system

Incubate ขวดและหลอดแก้ว hemoculture

ไว้ที่ 37°C สังเกตดูความขุ่นทุกวัน ถ้าพบ วันที่มีความขุ่นเกิดขึ้นก็ทำการย้อม และ subculture ลงใน chocolate agar plate, incubate 37°C ในบรรยากาศ 10% CO₂ ตลอดจน ถ้ามีเชื้อขึ้น ก็ทำการ identify และ antibiotic sensitivity test และรายงานผลต่อไป ถ้าไม่มีเชื้อขึ้น ก็ reincubate culture ที่หมกต่อไป จนถึงวันที่ 6 จึง subculture broth ที่หมกลงบน chocolate agar plate ถ้ามีเชื้อขึ้นในวันรุ่งขึ้นก็ทดสอบต่อไป ถึงกล่าวแล้ว แต่ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นก็รายงานผลว่า "No growth in 7 days"

Table 1 Comparison of number of specimens that have found organisms obtained with routine subculture bottle (RB) and control bottle (CB) system, routine subculture test tube (RT) and control test tube (CT) system.

RB	CB	Number of Specimens	%
—	—	152	88.37
+	+	13	7.56
+	—	7	4.07
—	+	0	0
Total		172	100.00
RT	CT	Number of Specimens	%
—	—	157	94.01
+	+	8	4.79
+	—	2	1.20
—	+	0	0
Total		167	100.00

ผลการทดลอง

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยแผนกอายุรศาสตร์
โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ที่เจาะใส่ขวด และ
หลอดแก้วเพื่อทำ hemoculture แบบ routine
subculture bottle (RB), control bottle
(CB), routine subculture test tube (RT),

และ control test tube (CT) system พบว่า
ในจำนวนเลือด 172 ตัวอย่าง ที่ทั้ง RB และ
CB ไม่พบเชื้อขึ้นเลยมีจำนวน 152 ตัวอย่าง
(88.37%), ที่ทั้ง RB และ CB พบเชื้อขึ้นและ
เป็นชนิดเดียวกันมี 13 ตัวอย่าง (7.56%), RB
พบเชื้อขึ้นแต่ CB ไม่พบเชื้อมี 7 ตัวอย่าง

Table 2 Recovery of organisms have been found in type RB positive but CB negative, and RT positive but CT negative

Type	Patient No	Specimen No.	Organisms
RB + ve CB - ve	I	1	Pneumococci
		2	No growth
		3	Pneumococci
	II	1	No growth
		2	No growth
		3	Salmonella group C1
	III	1	<u>Acinetobacter anitratum</u>
		2	No growth
		3	<u>Acinetobacter anitratum</u>
	IV	1	Escherichia coli
		2	Both RB and CB positive for <u>E coli</u>
		3	Both RB and CB positive for <u>E.coli</u>
	V	1	No growth
		2	No growth
		3	<u>Staphylococcus aureus coag-ve</u>
RT + ve CT - ve	i	1	Both RT and CT positive for <u>Klebsiella pneumoniae</u>
		2	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
		3	<u>Klebsiella pneumoniae</u>

Table 3 Results showing number of specimens and percentage that have found organisms in routine subculture bottle (RB) and routine subculture test tube (RT) system from 575 samples.

RB-ve RT-ve		RB - ve RT + ve		RB + ve RT - ve		RB - ve RT + ve		Total RB + ve		Total RT + ve	
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
507	88.17	50	8.70	18	3.13	5	0.87	68	11.83	55	9.56

(4.07%) และที่ RB ไม่มีเชื้อขึ้นแต่ CB พบเชื้อขึ้นนั้น ปรากฏว่าไม่มีในทำนองเดียวกัน จำนวนเลือด 167 ตัวอย่าง ที่ทั้ง RT และ CT Negative มี 157 ตัวอย่าง (94.01%), ทั้ง RT และ CT positive มี 8 ตัวอย่าง (4.79%) ส่วนที่พบเชื้อเฉพาะใน RT มี 2 ตัวอย่าง (1.20%) และที่พบเชื้อเฉพาะใน CT อย่างเดียวพบว่าไม่มีเลย (ตารางที่ 1)

ชนิดของเชื้อที่พบใน RB แต่ไม่พบใน CB และที่พบใน RT แต่ไม่พบใน CT แสดงไว้ในตารางที่ 2

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบ sensitivity ของการใช้เลือด 5 ml (RB) และ 1 ml (RT) ในอัตราส่วนของเลือดและ broth ยังคงเป็น 1:10 พบว่าในจำนวน sample 575 ตัวอย่าง ทั้ง RB และ RT ไม่พบเชื้อขึ้นเลย 507 ตัวอย่าง (88.17%) พบเชื้อเฉพาะใน RB แต่ไม่พบใน RT มี 18 ตัวอย่าง (3.13%), พบเชื้อเฉพาะใน RT แต่ไม่พบใน RB 5 ตัวอย่าง (0.87%) และที่พบเชื้อทั้งใน RB และ RT 50 ตัวอย่าง (8.70%), รวมพบเชื้อใน RB ทั้งหมด 68 ตัวอย่าง (11.83%) และ RT

ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง (9.56%) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบวิธีการทำ hemoculture โดย routine subculture bottle (RB) และ Control bottle (CB) system ปรากฏผลว่า RB พบเชื้อมากกว่า CB 4.07% ดังตารางที่ 1 แต่มีปัญหาย่อยว่า การพบเชื้อของ RB ที่สูงกว่า CB system ถึง 4.07% นั้น จะเป็น contamination ในระหว่างทำการทดลองหรือไม่? จากตารางที่ 2 ซึ่งแสดงชนิดของเชื้อที่พบใน RB แต่ไม่พบใน CB 4.07% ดังกล่าวแล้ว จะเห็นว่าในคนไข้ No. I และ II เชื้อที่พบเป็น Pneumococci และ Salmonella group C₁ ซึ่งไม่ใช่ contaminant organism ในคนไข้ No. III พบเชื้อ Acinetobacter anitratum ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถ contaminate ในระหว่างทำการทดลองได้ แต่จากการพบถึง 2 Specimens ในจำนวน 3 Specimens ย่อมยืนยันได้ว่า เชื้อ

วันไม่ใช่ contamination ในระหว่างการทดลองในผู้ป่วย No. IV พบเป็นเชื้อ E. coli ใน Specimens ที่ 1 และใน Specimens ที่ 2 และ 3 ก็พบเชื้ออย่างเดียวกันทั้งใน RB และ CB ปัญหา contamination ก็หมดไป แต่ในผู้ป่วย No. V พบเชื้อ Staphylococcus aureus coagulase - ve ใน Specimen ที่ 3 ในขณะที่ Specimens ที่ 1 และที่ 2 ให้ผล No growth ทั้งใน RB และ CB จึงเป็นปัญหาอยู่ว่าเชื้ออาจเป็น contaminant organism ก็ได้ (2,3) แต่อย่างไรก็ตาม โดยสรุปแล้วจากการทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่หรือทั้งหมดไม่ได้ contaminate ในระหว่างการทดลองดังนั้น การที่พบว่า RB ให้จำนวนการพบเชื้อได้สูงกว่า CB system จึงอาจกล่าวได้ว่า RB sensitive ดีกว่า CB system และปัญหา contamination ก็จะไม่เกิดขึ้นเลย ในการทำแบบ RB system ในทำนองเดียวกันจากผลการทดลองใน Routine subculture test tube (RT) และ control test tube (CT) system (ตารางที่ 1) ก็ให้ผลสนับสนุนคำวิจารณ์ดังกล่าวข้างต้นนี้ด้วย การที่ RB ให้ sensitivity ที่ดีกว่า CB นั้น อาจเนื่องมาจากเชื้อบางชนิดเจริญช้าและไม่แสดงความขุ่นในการเจริญ การ subculture ลงบน Solid media จะช่วยให้เชื้อมีโอกาสเจริญให้เห็นได้ (4) เชื้อบางชนิดเช่น Pneumococci จะเกิด Autolysis ได้ง่าย ดังนั้นจึงคายได้ง่ายและไม่แสดงความขุ่น ใน broth ในผู้ป่วยบางรายที่ได้รับยาปฏิชีวนะสารทำให้มีการ

ทำลายผนังเซลล์ของตัวเชื้อ หากไม่มีการ subculture ลงบน solid media เชื้อก็อาจตายไปได้ทำให้ไม่มีความขุ่นเกิดขึ้นใน broth (4) และในกรณีที่เชื้อเกิดแข็งตัวจับกัน เป็นก้อนใน broth เชื้ออาจถูกจับเข้าไว้ในก้อนเล็กนั้น ทำให้ไม่มีโอกาสเจริญได้ แต่ถ้ามีการทำ subculture ย่อมมีการขยายตัว โอกาสที่เชื้อจะหลุดออกมาจากก้อนเล็กย่อมมีได้มากกว่า (5)

ในการทดลองเปรียบเทียบ sensitivity ของการพบเชื้อ เมื่อใช้เลือด 5 ml. (RB) กับ 1 ml. (RT) โดยอัตราส่วนของเลือดต่อ broth เป็น 1:10 คงเดิม พบว่า RB ให้ผลในการพบเชื้อมากกว่า RT 3.13% ซึ่งมีแนวโน้มที่ว่า RB น่าจะ sensitive ดีกว่า RT และมีทางเป็นไปได้มาก เพราะปริมาณเลือดที่ใช้ใน RT อาจทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงไปด้วย (1) แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปถึงความเห็นข้างต้นนี้ได้ เพราะในการทดลองยังพบด้วยว่า ในบางราย (5 ราย) RT จะให้ผล positiva ได้มากกว่า RB 0.87% และเชื้อที่พบเป็น Pneumococci ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าไม่ใช่ contamination และการพบเช่นนั้น ผู้ทดลองยังหาเหตุผลที่จะใช้วิจารณ์ไม่ได้ว่าทำไมถึงเป็นเช่นนั้น แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ไม่หวังที่จะให้ได้ผลว่า RT ควรมีความ sensitive ที่ดีกว่า RB แต่หวังไว้ว่า RT ควรจะมี sensitivity ของการพบเชื้อได้เท่า หรือเกือบเท่า RB ก็เป็นที่น่าพอใจแล้ว เพราะจะเป็นประโยชน์ในการเจาะ เก็บเลือดจากผู้ป่วย ซึ่งบางครั้งเจาะยากและได้ไม่เพียงพอกับจำนวนที่ต้องการ โดยเฉพาะในรายที่ต้องเจาะเลือดจำนวนมากเพื่อใช้ทดสอบในท่านอื่น ๆ ด้วย เช่นทาง Chemistry และ Serology เป็นต้น.

Abstract

The blood sample from 172 patients at Chiang Mai Hospital were collected in sterilized Brain Heart Infusion broth by Routine Subculture Bottles (RB) System and by Control Bottles (CB) system. It was found that RB system gave more sensitivity than CB system 4.07%. At the same time, 167 blood samples were collected by Routine Subculture Test Tube (RT) System and also the results from this system gave more sensitivity than that of Control Test Tube (CT) system only for 1.2%. In comparison of the using of volume of blood samples for hemoculture, 5 ml (RB) and 1 ml (RT), RB was tended to give better sensitivity than RT. However, the results are still unsatisfied.

REFERENCES

1. Lennette, E.H., E.H., Spanlaling, and J.P. Traunt (Editors), Manual of clinical microbiology. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C., P 55 - 62, 1974.
2. Conner, V, and O.T. Mallery. Blood culture: a clinical laboratory study of two method. Am, J. Clin Pathol. 21:785-788, 1951.
3. Ellner, P,D. System for inoculation of blood in the laboratory. Appl. Microbiol, 16:1892-1894,1968.
4. J.G. Collee, B.I. Duerden, and R. Brown. Recovery of anaerobic bacteria fram small inocula: a model for blood culture studies. J. Clin. Pathol. 57:220-227, 1977.
5. Rosner, R. A quantitative evaluation of thrne blood culture systems. J. Clin. Pathol. 57:220-227, 1972.