

Review article

Laboratory diagnosis of anaerobic infections in King Chulalongkorn Memorial Hospital

Mayuree Khantipong**Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*

Abstract

Laboratory testing of anaerobic infections has exploded with molecular techniques and high technology. New species of anaerobic bacteria are increasing. However, laboratory diagnosis of anaerobic bacteria is not routinely performed because of special culture requirement, difficulty to isolate, time consumption, the expense, and experienced technicians. This article aimed to share an experience in anaerobic laboratory diagnosis and literature review for guidance to other clinical laboratories about specimen collection and transportation, selection of suitable culture media and incubation techniques including the use of anaerobic chamber, anaerobic jar, and anaerobic pouch bag. Currently, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has proved to be rapid and reliable for the identification of anaerobic bacteria in routine laboratory. Epsilon test (E-test) which has been developed for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of antibiotics has proved to be easy with reduced workload, compared to the standard agar dilution or broth microdilution method, and appropriate for use in routine laboratory.

Keywords: Anaerobic bacteria, anaerobic culture, anaerobic incubation technique.

***Correspondence to:** Mayuree Khantipong, Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.

E-mail: mkhantipong@gmail.com

Received: February 23, 2024

Revised: July 31, 2024

Accepted: August 20, 2024

บทฟื้นฟูวิชาการ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแอนแอโรบในห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

มยุรี ชันติพงศ์*

ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแอนแอโรบทางห้องปฏิบัติการมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและเทคโนโลยีขั้นสูง ทำให้พบแอนแอโรบิคแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ๆ มากมาย อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยแอนแอโรบิคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกยังไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญ ทั้งการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ และการบำรุงรักษา บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแบ่งปันประสบการณ์และบททวนวรรณกรรมเพื่อเป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทุกระดับและหน่วยงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ในการเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจให้ถูกวิธี การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และเทคนิคการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ประกอบด้วยการใช้งานตูบ่มไร้ออกซิเจน โหลไร้ออกซิเจน และถุงไร้ออกซิเจน ปัจจุบันการวิเคราะห์เชื้อด้วยเทคนิค matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight massspectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายสำหรับงานประจำทางห้องปฏิบัติการช่วยให้รายงานผลได้รวดเร็ว และแม่นยำขึ้น รวมทั้งการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Epsilometer test (E-test) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นตอนการทดสอบให้ง่ายขึ้นใช้แรงงานและอุปกรณ์น้อยลงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน agar dilution หรือ broth microdilution สามารถตรวจหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และแปลผลการทดสอบตาม Clinical laboratory standards institute (CLSI) จึงเป็นการทดสอบที่เหมาะสมกับงานประจำทางห้องปฏิบัติการเช่นกัน

คำสำคัญ: แอนแอโรบิคแบคทีเรีย, การเพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรบ, เทคนิคการบ่มเชื้อแอนแอโรบ.

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแอนแอโรบิกทางห้องปฏิบัติการมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วด้วยเทคโนโลยีที่ก้าวหน้า จึงเป็นเครื่องมือที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยวินิจฉัยค้นหาสาเหตุของโรค ตลอดจนการเลือกยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยให้ประสบผลสำเร็จและติดตามการรักษาได้อย่างต่อเนื่อง แอนแอโรบิคแบคทีเรียมีทั้งที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของมนุษย์ซึ่งตั้งถิ่นฐานที่ผิวหนังในระบบทางเดินอาหารตั้งแต่ช่องปากจนถึงลำไส้ และในระบบทางเดินปัสสาวะของเพศหญิง⁽¹⁻⁴⁾ อีกทั้งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อจากภายในร่างกายเองและการติดเชื้อจากภายนอกร่างกาย เช่น อุบัติเหตุ การผ่าตัด และสัตว์กัด เป็นต้น แอนแอโรบิคแบคทีเรียมักก่อโรคร่วมกับเชื้ออื่นและทำให้เกิดอาการรุนแรง⁽⁴⁾ การเพาะแยกแอนแอโรบิคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกยังไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง มีเทคนิคที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานาน อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน จึงมีเพียงกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โรงพยาบาลระดับตติยภูมิของรัฐ และโรงเรียนแพทย์เท่านั้นที่ให้บริการเพาะแยกเชื้อกลุ่มนี้ บทความนี้เขียนขึ้นจากประสบการณ์และการทบทวนวรรณกรรม โดยให้ความสำคัญกับการเพาะแยกแอนแอโรบิคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก ตั้งแต่การเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ อาหารเลี้ยงเชื้อ เทคนิคการเพาะเลี้ยง การวิเคราะห์เชื้อ และการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกของโรงพยาบาลทุกระดับและหน่วยงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

การเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ

ในการเพาะแยกแอนแอโรบิคแบคทีเรีย สิ่งแรกที่ต้องให้ความสำคัญคือ การเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ ห้องปฏิบัติการควรจัดทำคู่มือแนะนำแก่บุคลากรทางคลินิก

เกี่ยวกับสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมและไม่เหมาะสมต่อการเพาะแยก ระยะเวลาการเก็บและนำส่ง การใช้อาหารสำหรับนำส่ง สิ่งส่งตรวจแบบไร้ออกซิเจน (anaerobic transport medium) และข้อควรคำนึงดังนี้

1. วิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจที่ดีที่สุดคือ เก็บจากบริเวณที่มีการติดเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้อประจำถิ่น^(1, 5, 6)
2. หลีกเลี่ยงการเก็บสิ่งส่งตรวจด้วยไม้พันสำลี เนื่องจากมีโอกาสปนเปื้อนสูงจากเชื้อประจำถิ่น สิ่งส่งตรวจเก็บได้ปริมาณน้อย อีกทั้งเชื้อบางชนิดจับกับเส้นใยของสำลี ทำให้โอกาสในการพบเชื้อก่อโรคน้อยลงไปด้วย^(2, 7) หากจำเป็นต้องเก็บด้วยไม้พันสำลี เช่น แผลเปิด แผลจากสัตว์กัด แผลลึก ควรเก็บ 2 อัน สำหรับเพาะแยกเชื้อและย้อมสีแกรม
3. นำส่งสิ่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ หากไม่สามารถนำส่งได้ในขณะนั้น ให้เก็บที่อุณหภูมิห้อง หลีกเลี่ยงอุณหภูมิที่ร้อนหรือเย็นเกินไป^(2, 4, 6)
4. ห้ามนำส่งสิ่งส่งตรวจด้วยกระบอกพร้อมเข็มฉีดยา เพราะไม่ปลอดภัยต่อผู้นำส่งอาจถูกเข็มตำ และเกิดการปนเปื้อนต่อสิ่งแวดล้อมหากสิ่งส่งตรวจรั่วไหล^(2, 4, 6)
5. สิ่งส่งตรวจจากการติดเชื้อทางจักว เช่น เยื่อบุตาอักเสบ กระบอกตาอักเสบ หนองตาอักเสบ ท่อน้ำตาอักเสบ และการติดเชื้อภายในลูกตา เป็นสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณน้อยมาก เก็บค่อนข้างยาก และอาจเก็บใหม่ไม่ได้อีก แนะนำให้ทำการเพาะเชื้อโดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากสิ่งส่งตรวจเป็นรูปตัวซี (C) บนผิวหน้าวุ้นซึ่งเรียกว่าวิธีนี้ว่า C-shaped streaks^(8, 9) (รูปที่ 1) จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในถุงไร้ออกซิเจน และนำส่งห้องปฏิบัติการทันที ทั้งนี้ผู้เก็บสิ่งส่งตรวจจำเป็นต้องเรียนรู้วิธีเพาะเชื้อ และวิธีใช้ถุงไร้ออกซิเจน ดังนั้นการสื่อสารระหว่างผู้ปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการกับผู้ปฏิบัติงานทางคลินิกจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ



Figure 1. Inoculating specimen on the surface of agar in C-shaped streaks.

ภาชนะนำส่ง

นอกจากการเก็บสิ่งส่งตรวจที่ดี ถูกที่ และถูกเวลา แล้ว การเลือกภาชนะนำส่งยังมีความสำคัญเป็นอย่างมากเช่นกัน แม้มีผู้ผลิตหลายบริษัทแต่แหล่งผลิตล้วนอยู่ในต่างประเทศ ทำให้ราคาค่อนข้างสูง และอายุการใช้งานเหลือน้อยเมื่อนำเข้ามาใช้งาน ฝ่ายจุลชีววิทยามีความสามารถในการผลิตภาชนะนำส่งเพื่อใช้ภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ อีกทั้งจำหน่ายในราคาถูกให้กับหน่วยงานภายนอกที่ต้องการเก็บสิ่งส่งตรวจ โดยใช้ modified Cary-Blair transport medium⁽⁵⁾ ซึ่งเป็นวุ้นกึ่งแข็ง บรรจุในภาชนะแก้วเพื่อป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจน ประกอบด้วยสารอาหารที่ทำให้แอนแอโรบิกแบคทีเรียมีชีวิต แต่ไม่เพิ่มจำนวนระหว่างการนำส่งห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยเกลือแร่ที่มีคุณสมบัติเป็น buffer มี sodium thioglycolate และ cysteine เป็น reducing agent ทำให้ค่า oxidation reduction potential (OR potential) ต่ำ และมี resazurin เป็นดัชนีชี้วัดปริมาณออกซิเจน วุ้นจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีชมพูจากผิวบนลงถึงก้นหลอดเมื่อสัมผัสออกซิเจน modified Cary-Blair transport medium บรรจุในบรรจุภัณฑ์ 2 แบบเพื่อความสะดวกในการเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ (รูปที่ 2)

1. **Anaerobic transport tube (รูปที่ 2A)** เป็นหลอดแก้วที่บรรจุ modified Cary-Blair transport medium สูงสามในสี่ของหลอดแก้ว และปิดด้วยฝาเกลียว ใช้สำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจด้วยไม้พันสำลี โดยแทงไม้พันสำลีให้ถึงก้นหลอด แล้วหักปลายไม้พันสำลีทิ้ง ปิดฝาเกลียวให้แน่น กรณีสิ่งส่งตรวจเป็นชิ้นเนื้อ ให้ตัดชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางบนผิววุ้น แล้วปิดฝาเกลียวให้แน่น นำส่งห้องปฏิบัติการทันที⁽²⁾

2. **Anaerobic transport vial (รูปที่ 2B)** เป็นขวดแก้วขนาดเล็กที่บรรจุ modified Cary-Blair transport medium สูงหนึ่งในสองของขวด ปิดด้วยจุกยางและครอบด้วยฝาลูมิเนียมอีกชั้น ใช้สำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจที่เป็นสารน้ำ เช่น pleural fluid, abdominal fluid และ liver abscess เป็นต้น โดยเก็บสิ่งส่งตรวจด้วยเข็มฉีดยา แล้วฉีดลงใน anaerobic transport vial ซ้ำๆ ไม่ให้เกิดฟองอากาศและสิ่งส่งตรวจลอยอยู่บนผิววุ้น⁽²⁾

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการเพาะเลี้ยงแอนแอโรบิกแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจควรเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานให้ครอบคลุมเชื้อก่อโรคทั้งหมด และไม่ควรรี้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียวโดยทั่วไปมีดังนี้^(2, 4, 5, 10, 11)

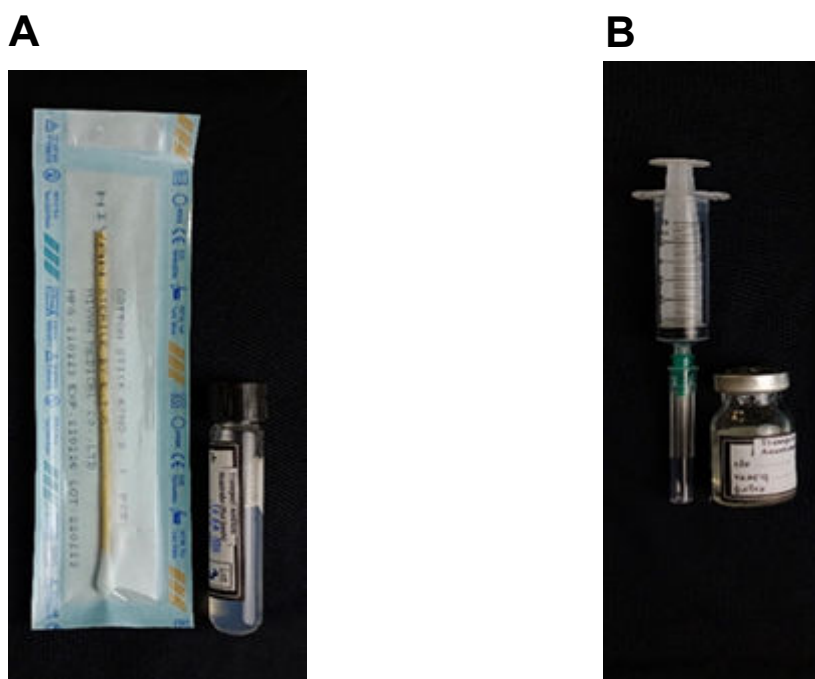


Figure 2. Modified cary-Blair transport medium; (A) anaerobic transport tube for swab collecting, tissue specimen; (B) anaerobic transport vial for liquid specimen. Products of Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Redcross Society.

Brucella blood agar (BR) เป็น enrichment medium ที่แอนแอโรบิคแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดี เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ การต่อเชื้อ (subculture) เพื่อการทดสอบอื่นๆ เช่นการทดสอบทางชีวเคมี และการทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

Phenylethyl alcohol blood agar (PEA) เป็น selective medium เนื่องจากยับยั้งการเจริญของกลุ่ม facultative gram-negative bacilli ยับยั้งการแผ่ลามของ *Proteus* และ *Clostridium* ขณะที่แอนแอโรบิคแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบส่วนใหญ่เจริญได้ดี เชื้อกลุ่ม *Porphyromonas* และ *Prevotella* สามารถเรืองแสงสีแดงส้มเมื่ออายุน้อย และเห็นเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น บน PEA

Bacteroides bile esculin agar (BBE) เป็น selective medium ที่ยับยั้งการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อกลุ่ม *Bacteroides fragilis* ที่ทนน้ำดี (bile resistant) เจริญได้บน BBE เกิดโคโลนีสีเทาถึงดำ ขณะที่ *Bilophilla wadsworthia* สร้างโคโลนีเล็กโปร่งแสงมีจุดดำตรงกลาง เรียกว่า fisheye ส่วน *Fusobacterium mortiferum* โคโลนีมีสีเทาถึงดำเหมือน *Bacteroides fragilis* แต่ต่างกันที่รูปร่างจากการย้อมสีแกรม

Thioglycolate broth (THIO) เป็นอาหารพื้นฐานชนิดเหลวที่เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดี หลังจากเพาะสิ่งส่งตรวจบนอาหารวุ้นแข็ง BR, PEA และ BBE แล้ว ให้หยดสิ่งส่งตรวจลงใน THIO บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อสังเกตการเจริญของเชื้อ และเป็นแหล่งเก็บสำรองสิ่งส่งตรวจกรณีเครื่องมือเสียหาย หรือสิ่งส่งตรวจที่มีเชื้อปริมาณน้อยอาจถูกยับยั้งการเจริญจากยาปฏิชีวนะ การเพาะสิ่งส่งตรวจใน THIO จะเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อได้มากขึ้น ทั้งนี้ควรต้มไล่ออกซิเจน และทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้งาน และไม่ควรต้มซ้ำๆ

เทคนิคการบ่มเชื้อ

ใช้เทคนิคการสร้างพื้นที่จำกัดที่มีภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อให้แอนแอโรบิคแบคทีเรียเจริญ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ขาดคุณสมบัติในการสร้าง enzyme catalase จึงไม่สามารถกำจัดสารประกอบ peroxide หรือ hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน^(2, 12) พื้นที่จำกัดที่มีสภาวะไร้ออกซิเจน ได้แก่ ตู้บ่มไร้ออกซิเจน (anaerobic chamber) โหลไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) กล่องไร้ออกซิเจน (anaerobic box) หรือถุงไร้ออกซิเจน (anaerobic bag)

โดยมีแหล่งกำเนิดแก๊สในรูปแบบแก๊สผสมบรรจุถังหรือสารเคมีบรรจุซอง นอกจากนี้ยังต้องมีดัชนีบ่งชี้สภาวะไร้ออกซิเจน เช่น resazurin ที่มีสีชมพูเมื่อมีออกซิเจนและเปลี่ยนเป็นสีขาวเมื่อไร้ออกซิเจน หรือ methylene blue ที่มีสีฟ้าและเปลี่ยนเป็นสีขาวเมื่อไร้ออกซิเจน⁽¹²⁾ สำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ให้บริการเพาะเลี้ยงแอนแอโรบิคแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจด้วย anaerobic chamber เป็นเทคนิคหลัก และใช้การเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar หรือ anaerobic box เป็นเทคนิคสำรองเมื่อ anaerobic chamber ใช้งานไม่ได้ การใช้ anaerobic bag เป็นทั้งเทคนิคการเพาะเลี้ยงและการขนส่งสิ่งส่งตรวจ เทคนิคที่ใช้มีดังนี้

Anaerobic chamber technique ใช้ตู้บ่มไร้ออกซิเจนรุ่น Concept 400 (Ruskin technology, UK) ปรับอุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียสแหล่งกำเนิดแก๊สประกอบด้วยแก๊สผสม 1 ถัง และแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 อีก 1 ถัง แก๊สผสมประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ไนโตรเจนร้อยละ 5 และไนโตรเจนร้อยละ 90 ในการติดตั้งเพื่อใช้งานครั้งแรก ไนโตรเจนถูกปล่อยเข้าแทนที่อากาศที่มีในตู้บ่มให้มากที่สุด อากาศปกติประกอบด้วยออกซิเจนร้อยละ 79 ไนโตรเจนร้อยละ 20 และแก๊สเฉื่อยร้อยละ 1 จากนั้นจะปล่อยแก๊สผสมเข้าตู้บ่มจนภายในตู้บ่มไร้ออกซิเจนโดยสมบูรณ์ โดยสังเกตจากดัชนีบ่งชี้เปลี่ยนเป็นสีขาวภายในตู้บ่มติดตั้งตัวเร่งปฏิกิริยา Palladium catalyst เพื่อดักจับออกซิเจนที่หลงเหลือให้กลายเป็นน้ำและระบายออกด้านนอก ข้อดีของตู้บ่มไร้ออกซิเจนคือ 1) เพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงภายในตู้บ่ม ลดการสัมผัสออกซิเจน; 2) ตรวจสอบการเจริญของเชื้อได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก ไม่จำเป็นต้องรอถึง 48 ชั่วโมงสามารถตรวจสอบเชื้อสายพันธุ์ที่เจริญเร็วและทำการทดสอบได้ทันที เช่น *Clostridium* spp. และบ่มต่อ (reincubate) เพื่อตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ที่เจริญช้า เช่น *Fusobacterium* spp., *Actinomyces* spp. หรือเพื่อการต่อเชื้อ โดยไม่จำเป็นต้องนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตู้บ่ม 3) เพาะเลี้ยงเชื้อได้คราวละมาก ๆ เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่สิ่งส่งตรวจมากกว่า 5 ตัวอย่างต่อวัน⁽⁴⁾ ส่วนข้อเสียคือ 1) ค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีสิ่งส่งตรวจน้อย; และ 2) บุคลากรต้องมีความชำนาญทั้งการใช้งานและการบำรุงรักษาเครื่องมือ

Table 1. Identification and preliminary report of anaerobic bacteria. ^(2, 4)

BR	PEA	BBE	Pigm.	Fluo.	Gram reaction	Colony morphology	Presumptive identification
G	G	G	-	-	Pale, negative-bacilli	2 - 3 mm. circular, convex, gray to gray-white (shiny)	<i>Bacteroides fragilis</i> group <i>Parabacteroides</i> spp.
G	G or NG	NG	-	-	Thin, negative-bacilli with rounded ends	Small, smooth and convex, pitting, spreading	<i>Bacteroides ureolyticus</i> group. (<i>B. ureolyticus</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. gracilis</i> and <i>Sutterella</i>)
G	G	NG	black	-*	Negative-bacilli or coccobacilli	Circular, convex, brown to black	<i>Porphyromonas</i> - <i>Prevotella</i> group
G	G	NG	-**	+	Negative-bacilli or coccobacilli	Circular, convex, Brick red fluorescence	<i>Porphyromonas</i> - <i>Prevotella</i> group
G	G/ NG	NG	-	+/-	Negative-bacilli, slender shape	< 0.5 - 2 mm. breadcrumb, speckled, smooth, greening agar	<i>Fusobacterium</i> spp.
G	G	NG	-	-	Positive-bacilli, box-car shape	Double zone of hemolysis	<i>C. perfringens</i>
G	G/ NG	NG	-	-	Positive-bacilli, branching	molar tooth	<i>Actinomyces israelii</i>

G, growth; NG, no growth; BBE, Bacteroides bile esculin agar; BR, Brucella blood agar; PEA, phenylethyl alcohol blood agar; Pigm, pigment; Fluor, fluorescence; *Mature pigmented colonies do not florescence; **Very young colonies (48 hours) may not be black; black pigment often takes 4 - 5 days incubation.

การทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ

ตามมาตรฐาน Clinical laboratory standards institute (CLSI)⁽²¹⁾ การทดสอบความไวรับต่อยาปฏิชีวนะของแอนแอโรบิคแบคทีเรียใช้วิธี agar dilution หรือ broth microdilution เพื่อหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ข้อดีของ 2 วิธีนี้คือราคาถูก สามารถทดสอบตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก แต่ไม่เหมาะกับการนำมาใช้ในงานประจำทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากวิธี agar dilution มีขั้นตอนการทดสอบที่ยุ่งยากทั้งการเตรียมสารด้านจุลชีพ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และยังต้องใช้อุปกรณ์และแรงงานจำนวนมาก⁽²²⁾ ขณะที่แอนแอโรบิคบางสายพันธุ์เจริญได้ไม่ดีในอาหารเหลวจึงไม่เหมาะกับวิธี broth microdilution⁽²³⁾ ทำให้วิธีนี้ทดสอบได้เฉพาะ *Bacteroides fragilis group* และ *Parabacteroides*^(21, 24) วิธี Epsilonometer (E-test) เป็นวิธีการทดสอบความไวต่อยาวิธีใหม่ที่ถูกพัฒนาขึ้นและมีการทดสอบความใช้ได้ (validation)^(25, 26) ในการตรวจหาค่า MIC โดยการเคลือบยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามากตามลำดับบนแผ่นทดสอบ ซึ่งจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยา⁽²⁶⁾ หลักการและวิธีทดสอบคล้ายกับ disk diffusion โดยการปรับความขุ่นของเชื้อตามที่ผู้ผลิตแนะนำแล้วเพาะเชื้อลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและวางแผ่น E-test ของยาแต่ละชนิดลงไป บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน 24 - 48 ชั่วโมงแปลผลการทดสอบตาม CLSI ข้อดีของวิธีนี้คือขั้นตอนการทดสอบง่าย ใช้แรงงานและอุปกรณ์น้อย สามารถทดสอบได้คราวละมาก ๆ เหมาะกับงานประจำแต่อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการต้องมีการประเมินวิธี E-test เทียบกับวิธี agar dilution เพื่อเป็นการทวนสอบ (verification) ให้แน่ใจว่าวิธี E-test สามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีมาตรฐานได้ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้ทำการทวนสอบโดยใช้แอนแอโรบิคแบคทีเรียจำนวน 30 ตัวอย่างประกอบด้วย แกรมลบรูปแท่ง 15 ตัวอย่าง แกรมบวกรูปแท่งสร้างสปอร์ 5 ตัวอย่าง แกรมบวกรูปแท่งไม่สร้างสปอร์ 3 ตัวอย่าง และแอนแอโรบิครูปกลม 7 ตัวอย่าง ต่อยา clindamycin, cefoxitin, imipenem, metronidazole และ penicillin พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 89.3 โดยระดับค่าร้อยละของความไวรับที่สอดคล้องระหว่าง 2 วิธีให้ค่าสูงในยา clindamycin ร้อยละ 100.0 metronidazole ร้อยละ 97.0 และ penicillin ร้อยละ 97.0 ให้ค่าค่อนข้างต่ำ

เล็กน้อยในยา cefoxitin ร้อยละ 80.0 และยา imipenem ร้อยละ 73.0 เนื่องจากแนวโน้มของค่า MIC ที่ได้จากวิธี E-test จะต่ำกว่าวิธี agar dilution ในกลุ่มยา 2 ชนิดนี้ (ไม่ได้ตีพิมพ์) ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบความไวรับของเชื้อแอนแอโรบิคในงานประจำทางห้องปฏิบัติการ—ประกอบด้วย ampicillin, penicillin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, piperacillin/tazobactam, clindamycin, ertapenem, imipenem, meropenem และ metronidazole⁽²⁴⁾

สรุป

การเพาะแยกแอนแอโรบิคแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกจะประสบความสำเร็จได้ สิ่งสำคัญประการแรกคือ สิ่งส่งตรวจ หากเก็บสิ่งส่งตรวจไม่ถูกวิธี นำส่งใน transport medium ที่ไม่เหมาะสมและไม่ทันเวลา โอกาสพบแอนแอโรบิคแบคทีเรียก็น้อยลง ประการที่สองคือ การสื่อสารที่ดีระหว่างผู้ปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการกับผู้ปฏิบัติงานทางคลินิก ไม่ว่าจะเป็นแพทย์ พยาบาล หรือนุคลากรผู้นำส่งสิ่งส่งตรวจจะนำมาซึ่งความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแอนแอโรบิคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการเช่นกัน และประการสำคัญที่สุดคือความร่วมมือของห้องปฏิบัติการทั้งบุคลากรที่มีความชำนาญ เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ได้มาตรฐาน และเทคนิควิเคราะห์เชื้อที่ทันสมัย MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่นิยมอย่างแพร่หลายในงานประจำทางห้องปฏิบัติการในอนาคต เทคนิค Next-generation sequencing (NGS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในงานวิจัยระดับสูง อาจเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจใช้ควบคู่ หรือทดแทน MALDI-TOF MS ในงานประจำทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากสามารถทดสอบจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้โดยตรง รวมทั้งระบุชนิดของแบคทีเรีย ยีนดื้อยา และตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีนดื้อยานั้นได้ ช่วยให้การวิเคราะห์เชื้อแอนแอโรบิคแบคทีเรียได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วขึ้นสามารถช่วยแพทย์ในการวิเคราะห์โรค และดำเนินการรักษาได้ทันที่ ในช่วง 50 ปีของการพัฒนางานทางห้องปฏิบัติการแอนแอโรบิคแบคทีเรีย ฝ่ายจุลชีววิทยา ได้รับการสนับสนุนเป็นอย่างดีทั้งด้านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคที่ทันสมัยในการวิเคราะห์เชื้อแอนแอโรบิคแบคทีเรีย จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Nagy E, Boyanova L, Justesen US. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:1139-48.
2. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. Belmont, CA: Start Now Pr; 2002.
3. Cohen-Poradosu R, Kasper DL. Anaerobic infections: general concept. . In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders; 2015. p.2736-43.
4. Schuetz AN, Brown K, Harriott M, Morris TE, Carroll KC, Paulick AL, et al. Anaerobic bacteriology In: Leber AL, Burnham CAB, editors. *Clinical microbiology procedures handbook*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press; 2022. p. 4.1-4.17.
5. Peterson LR. Effect of media on transport and recovery of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1997;25 Suppl 2:S134-6.
6. McElvania E, Singh K. Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. In: Carroll KC, Pfaller MA editors. *Manual of clinical microbiology*. 12th ed. Washington, DC: ASM Press; 2019. p.302-30.
7. Baron EJ. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, editors. *Manual of clinical microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 270-315.
8. Leck A. Taking a corneal scrape and making a diagnosis. *Community Eye Health* 2015;28:8-9.
9. Ranjini CY, Waddepally VV. Microbial profile of corneal ulcers in a tertiary care hospital in South India. *J Ophthalmic Vis Res* 2016;11:363-7.
10. Mangels JI, Douglas BP. Comparison of four commercial brucella agar media for growth of anaerobic organisms. *J Clin Microbiol* 1989;27: 2268-71.
11. Murray PR. Growth of clinical isolates of anaerobic bacteria on agar media: effects of media composition, storage conditions, and reduction under anaerobic conditions. *J Clin Microbiol* 1978;8:708-14.
12. Anderson KL, Fung DY. Anaerobic methods, techniques and principles for food bacteriology: a review. *J Food Prot* 1983;46:811-22.
13. Rosenblatt JE, Stewart PR. Anaerobic bag culture method. *J Clin Microbiol* 1975;1:527-30.
14. Hirunwiwatkul P, Wachirasereechai K, Khantipong M, Chongthaleong A. Identifications of hordeolum pathogens and its susceptibility to antimicrobial agents in topical and oral medications. *Asian Biomed* 2012;6:297-302.
15. Rodríguez-Sánchez B, Alcalá L, Marín M, Ruiz A, Alonso E, Bouza E. Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2016;42:101-7.
16. Alcalá L, Marín M, Ruiz A, Quiroga L, Zamora-Cintas M, Fernández-Chico MA, et al. Identifying anaerobic bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry: a four-year experience. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:521014.
17. Nagy E. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new possibility for the identification and typing of anaerobic bacteria. *Future Microbiol* 2014;9:217-33.
18. Kierzkowska M, Majewska A, Kuthan RT, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk G. A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level. *J Microbiological Methods* 2013;92:209-12.
19. Li Y, Gu B, Liu G, Xia W, Fan K, Mei Y, et al. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis* 2014;6:517-23.
20. Lawson PA, Moore E, Falsen E. *Prevotella amnii* sp. nov., isolated from human amniotic fluid. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58(Pt 1):89-92.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 9th ed. CLSI standard M11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
22. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 2014;59:698-705.
23. Wilkins TD, Thiel T. Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1973;3: 350-6.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
25. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;22:279-84. .
26. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991;29: 2197-203.