การลดระยะเวลาการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยวิธี Latex Agglutination

Latex agglutination test: an effective screening tool for melioidosis diagnosis

ชิดชนก พรมคง
กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลนครพนม จังหวัดนครพนม

Chidchanok Promkong, B.MT.
Nakornpanom Hospital

บทคัดย่อ

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* (Bp) ซึ่งอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยเหล่านี้สัมพันธ์กับการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้องเหมาะสมอย่างทันท่วงที ด้วยข้อจำกัดของการวินิจฉัยการติดเชื้อโดยวิธีการเพาะเลี้ยงและทดสอบระบุชนิดเชื้อด้วยวิธีชีวเคมีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานต้องใช้ระยะเวลาในการรอผลนาน ผู้วิจัยเสนอแนวคิดที่จะนำชุดทดสอบ latex agglutination test มาใช้สำหรับตรวจคัดกรองเชื้อ Bp ควบคู่กับการยืนยันผลการตรวจด้วยการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อ เพื่อความรวดเร็วในการวินิจฉัย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือการประเมินเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของ latex agglutination test สำหรับตรวจคัดกรองเชื้อ Bp เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือการทดสอบระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยการวิเคราะห์ค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ค่าการทำนายผลบวก (positive- predictive value), ค่าการทำนายผลลบ (negative-predictive value) และค่าความถูกต้อง (accuracy) โดยการศึกษาข้อมูลย้อนหลังในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ.2558 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2560 รวบรวมข้อมูลผลการตรวจวินิจฉัยชนิดเชื้อในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลนครพนมที่มีอาการสงสัยการว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียและเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือด, หนอง (pus), เสมหะ (sputum), ปัสสาวะ (urine), และของเหลวจากร่างกาย (body fluid) โดยการนำโคโลนีประเภท Gram-negative non-lactose fermenter ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ oxidase ทดสอบด้วย latex agglutination test เพื่อรายงานผลตรวจคัดกรองเชื้อ Bp จากนั้นนำโคโลนีดังกล่าวไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุชนิดเชื้อ (biochemical identification) จนกระทั่งให้ได้ผลรายงานสุดท้าย จากข้อมูลผลการตรวจวินิจฉัยชนิดเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยจำนวนทั้งสิ้น 637 ตัวอย่าง พบว่าประสิทธิภาพของชุดทดสอบ latex agglutination test ในการวินิจฉัยเชื้อ Bp จากตัวอย่าง hemoculture จำนวน 401 ราย ให้ค่าความไว 100%, ความจำเพาะ 96.7%, ค่าการทำนายผลลบ 100% ,ค่าการทำนายผลบวก 99.4% และค่าความถูกต้อง (accuracy) 99.5% ส่วนกรณีการใช้งานกับสิ่งส่งตรวจกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจาก hemoculture จำนวน 236 รายนั้น พบว่าประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยถูกต้อง 100%

โดยการใช้งาน latex agglutination test นั้น สามารถรายงานผลการติดเชื้อ Bp ได้เร็วขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการคัดกรองและรายงานการวินิจฉัยเชื้อ Bp เบื้องต้นด้วยชุดทดสอบ latex agglutination test ในงานบริการประจำนั้นมีประสิทธิภาพและความถูกต้องสูง อีกทั้งยังสามารถรายงานผลได้รวดเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อก่อโรคด้วยวิธีทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ: เมลิออยโดสิส, *Burkholderia pseudomallei*, latex agglutination, โรคติดเชื้อ, การตรวจวินิจฉัย

Abstract

Previously, the incompetency to speed up the diagnosis process of melioidosis, a fetal infections cause by *Burkholderia pseudomallei (Bp)*, consequently, lower down the survival rate of patients. Here, it is clearly demonstrated that the latex agglutination test can serve as an effective screening method for melioidosis diagnosis. To confirm its effectiveness in term of sensitivity, specificity, positive- predictive value, negative-predictive value and accuracy by latex agglutination test, specimen samples including blood, pus, sputum, urine and body fluid were collected from Nakhon Phanom Hospital in northeast Thailand during October 2015 to August 2017 for statistical analysis. Then, bacteria were cultured from the hospital collected specimens, and the bacterial colonies were primarily screened for their (+) oxidase producing and non-lactose fermentative properties. Accordingly, bacterial culture from 637 clinical specimens which were found to be positive for those two criteria, were included for an accuracy assessment of the latex agglutination test in comparison to the goal standard biochemical identification method. Statistical analysis revealed that a sign of melioidosis are able to be detected in 401 hemoculture sample by the latex agglutination with 100% sensitivity, 96.7% specificity, 99.4% positive-predictive value and 100% negative-predictive value. Moreover, melioidosis could be rapidly diagnosed for 236 other non-hemoculture samples with 100% accuracy by latex agglutination test. Timing for latex agglutination test was found to be significantly shorter than that of the standard method. Thus, it implied that this time-minimising test can serve as an effective alternative tool for melioidosis diagnosis.

Key words: Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, latex agglutination, sepsis, diagnosis

บทนำ

Melioidosis เป็นโรคติดเชื้อที่อันตรายต่อชีวิต มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (Bp) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทั่วไปในดินและน้ำ [1] โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้นจัดเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนี้สูงมากเป็นอันดับต้นของโลก [2] โรค melioidosis นั้นสามารถพบได้ทั้งประเภทการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง, กระดูก, หรือการติดเชื้อที่ปอด และยังสามารถพบการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งเป็นประเภทที่มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงถึงมากกว่าร้อยละ 40 [3, 4] ผู้ป่วยอาจมาด้วยอาการไข้สูงเพียงอย่างเดียว อาจมีไข้สูง ช็อคจากการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยไม่มีอาการจำเพาะที่อวัยวะใดๆ หรือมีอาการปอดอักเสบติดเชื้อมีไข้ไอมีเสมหะเจ็บหน้าอก หรืออาจมีเนื้อตายหรือฝีหนองที่ปอดตับหรือม้าม ผู้ป่วยมักมีอาการล้มเหลวของอวัยวะต่างๆ จากการติดเชื้อ (multiple organ failure) และเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว ด้วยลักษณะการแสดงทางคลินิกของโรคมีความหลากหลาย ไม่มีความจำเพาะ ทำให้การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยอาการทางคลินิกของผู้ป่วยทำได้ยาก [5-7] ต้องใช้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการประกอบการวินิจฉัยโรค แต่ด้วยข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงและระบุพบเชื้อ Bp ที่ใช้ในงานประจำของโรงพยาบาล ต้องใช้เวลาในการรอผลนานถึงประมาน 72 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้น [8, 9] นำไปสู่การรักษาผู้ป่วยที่ไม่เหมาะสม และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด [5-7]

การวินิจฉัยโรค melioidosis ทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ โดยวิธี indirect hemagglutination assay หรือ IHA ที่ใช้ในงานบริการประจำของโรงพยาบาล ไม่เหมาะสมกับการใช้งานในประเทศไทยที่มีการระบาดของเชื้อ Bp และเชื้ออื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงกัน ซึ่งบุคคลทั่วไปได้มีการสัมผัสและสร้างภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะมารบกวนการตรวจด้วยวิธี IHA [10-12] ส่วนการตรวจหาเชื้อ Bp ด้วยการใช้ polymerase chain reaction (PCR) หาส่วนสารพันธุกรรมของเชื้อ [13], การย้อมสีเชื้อ Bp ด้วยวิธี immunofluorescent assay (IFA) [14] และการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี lateral flow immunochromatography [15] หรือจะเป็นการตรวจหาแอนติบอดีของผู้ป่วยต่อเชื้อ Bp ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [16, 17], immunochromatography [16, 18, 19] หรือ microarray assay [20] จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์และจำเป็นต้องมีอุปกรณ์พิเศษในการทดสอบและแปลผล

ชุดทดสอบตรวจหาเชื้อ Bp ด้วยวิธี monoclonal antibody-based latex agglutination test ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยมหาวิทยาลัยมหิดล [21, 22] มีข้อดี คือขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยากไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ใช้เวลาในการอ่านปฏิกิริยาการทดสอบเพียง 2 นาที ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะนำชุดทดสอบดังกล่าวมาประยุกต์ใช้งานร่วมกับระบบงานบริการประจำวันในการตรวจวินิจฉัยระบุชนิดเชื้อก่อโรคในสิ่งส่งตรวจมาใช้สำหรับตรวจคัดกรองเชื้อ Bp ควบคู่กับการยืนยันผลการตรวจด้วย

การเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อ (bacterial culture and biochemical identification) เพื่อลดระยะเวลารอคอยผลการวินิจฉัยระบุชนิดเชื้อ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาย้อนหลัง (retrospective study) โดยมีวัตถุประสงค์คือการประเมินเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของ latex agglutination test สำหรับตรวจคัดกรองเชื้อ Bp เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือการทดสอบระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยการรวบรวมข้อมูลการตรวจวินิจฉัยชนิดเชื้อจากโคโลนีประเภท Gram-negative non-lactose fermenter ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ oxidase โดยศึกษาประสิทธิภาพด้านความถูกต้อง แม่นยำในการวินิจฉัยชนิดเชื้อและระยะเวลาการรอผลตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp

วิธีการศึกษา

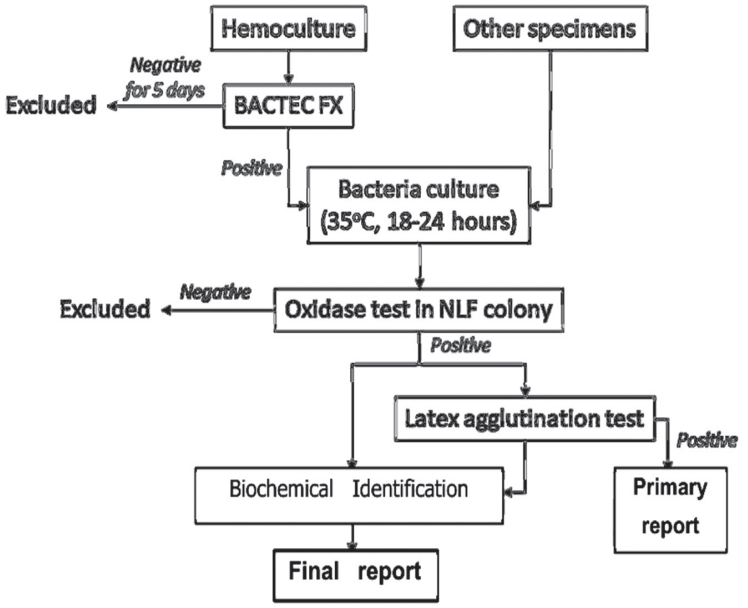
การคัดเลือกข้อมูลและกลุ่มตัวอย่าง

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาคือผลการเพาะเลี้ยงและระบุเชื้อในกลุ่มผู้ป่วยที่รับการรักษาในโรงพยาบาลนครพนมที่มีอาการสงสัยว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียและเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 โดยแบ่งกลุ่มข้อมูลตามชนิดสิ่งส่งตรวจและขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ที่ต่างกันได้แก่ กลุ่มข้อมูลตัวอย่างจาก hemoculture ที่ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย (ผู้ใหญ่ 10 ml, เด็ก 0.5-4 ml) จะถูกใส่ในขวดสำหรับเครื่องเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ BACTEC FX Blood Culture System (BD Diagnostic Systems, ประเทศอเมริกา) และกลุ่มข้อมูลตัวอย่างประเภทอื่นๆ (other specimens) ได้แก่ ตัวอย่างหนอง (pus), เสมหะ (sputum), ปัสสาวะ (urine), และของเหลวจากร่างกาย (body fluid) ซึ่งตัวอย่างกลุ่มนี้จะถูกจัดการและเพาะเลี้ยงเชื้อโดยบุคลากรของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

เพื่อยืนยันแนวทางการคัดกรองเชื้อ BP เบื้องต้นโดยใช้การย้อมสีแกรมและการทดสอบ oxidase นั้น มีความเหมาะสม ที่จะนำมาใช้ร่วมกับ latex agglutination จึงได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างตามชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบจากการเพาะเชื้อและระบุชนิดเชื้อ (bacterial culture and biochemical identification) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม melioidosis และ กลุ่ม non-melioidosis โดยกลุ่ม melioidosis คือ กลุ่มที่ผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยการเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อ Bp ส่วนกลุ่ม non-melioidosis คือกลุ่มที่ผลเพาะเชื้อเป็นเชื้อชนิดอื่นๆ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้นำเสนอแนวทางใหม่ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อ Bp โดยใช้การทดสอบด้วย latex agglutination test (ในการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ต้องสงสัยควบคู่กับการยืนยันผลการตรวจด้วยการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อ (bacterial culture and biochemical identification) ซึ่งถือเป็นวิธี gold standard โดยมีขั้นตอนในการให้บริการแสดงใน **ภาพที่ 1** โดยตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยจะนำมาตรวจหาการเจริญของเชื้อด้วยเครื่อง hemoculture อัตโนมัติ เมื่อเครื่องตรวจพบสัญญาณการเจริญของเชื้อแล้ว ตัวอย่างรายนั้นๆ จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °c เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการระบุชนิดของเชื้อต่อไป แต่ถ้าหากไม่มีสัญญาณการเจริญ

ของเชื้อภายในระยะเวลา 5 วัน ตัวอย่างรายนั้นจะถูกรายงานผลเป็นผลลบ (culture negative) ในขณะที่ตัวอย่างประเภทอื่นๆ ได้แก่ หนอง (pus), เสมหะ (sputum), ปัสสาวะ (urine), และของเหลวจากร่างกาย (body fluid) นั้นจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงหาเชื้อก่อโรคที่อุณหภูมิ 35 °c เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เช่นกัน เมื่อได้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแล้วก็จะทำการทดสอบ oxidase test จากโคโลนีประเภท non-lactose fermenter เพื่อคัดกรองตัวอย่างที่มีโอกาสเป็นเชื้อ Bp โดยตัวอย่างที่ให้ผลลบจะถูกนำออกจากการวิเคราะห์ของการศึกษา และตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะถูกนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ latex agglutination รายที่ให้ผลบวกด้วยวิธีนี้จะถูกรายงานเบื้องต้นไปยังแพทย์ผู้รักษา (primary report) เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจรักษาผู้ป่วยของแพทย์ว่าน่าจะเป็นผู้ป่วย melioidosis แต่อย่างไรก็ตามโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างคนไข้ทั้งหมดนั้นจะต้องทดสอบทางชีวเคมีเพื่อระบุชนิดเชื้อ (biochemical identification) จนกระทั่งให้ได้ผลรายงานสุดท้าย (final report)



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากผู้ป่วยเพื่อวินิจฉัยโรค melioidosis

ชุดน้ำยา latex agglutination test

ชุดน้ำยา latex agglutination test ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ Bp ด้วยวิธี monoclonal antibody-based latex agglutination test ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยมหาวิทยาลัยมหิดล [21, 22] ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเวชศาสตร์เขตร้อนมหาวิทยาลัยมหิดล โดยความไว (sensitivity) ที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับชุดทดสอบ เท่ากับ 98.7% , ความจำเพาะ(specificity) 100% ทดสอบโดยการหยดน้ำยา 5-10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว จากนั้นใช้ไม้เขี่ยเอาโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาผสมกับน้ำยาที่หยดไว้ ผสมเชื้อกับน้ำยาให้เข้ากัน

โดยการเขี่ยเป็นวงกลมและขยับหมุนสไลด์ไปมา (rotate) รอดูผลที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 นาที ผลบวกจะเห็นเป็นตะกอนสีขาวลอยอยู่ในน้ำยาใส ในขณะที่ผลลบจะไม่เห็นการตกตะกอนและน้ำยายังคงเป็นสีขาวขุ่นเช่นเดิม

การวิเคราะห์ข้อมูลและการทดสอบทางสถิติ

ประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp ด้วย latex agglutination test เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี วิเคราะห์และนำเสนอด้วย sensitivity, specificity, positive-predictive value, negative-predictive value และ accuracy [23] การวิเคราะห์ช่วงเวลาการรอผลตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp นับตั้งแต่เวลาที่รับตัวอย่างเข้าสู่ระบบห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไปจนถึงเวลาที่ลงบันทึกผลการทดสอบด้วยวิธี latex agglutination test (primary report) หรือการทดสอบระบุชนิดเชื้อด้วยวิธี biochemical identification (final report) วิเคราะห์นำเสนอเป็นชั่วโมง

ใช้สถิติ Mann-Whitney U test ในการเปรียบเทียบข้อมูลที่มาจากคนละกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เกี่ยวข้องกัน (independent sample) หรือ Wilcoxon test สำหรับข้อมูลที่มาจากกลุ่มตัวอย่างรายเดียวกัน (dependent sample) การวิเคราะห์ช่วงเวลาการรอผลตรวจวินิจฉัยเชื้อนำเสนอเป็นค่ามัธยฐาน (median) และค่าพิสัย (interquartile) จากนั้นเปรียบเทียบผลในทั้งสองกลุ่มด้วยสถิติกำหนดค่า *p-value* ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

จากวิธีการข้างต้นที่ได้นำมาให้บริการในเขตจังหวัดนครพนม ผู้วิจัยได้สืบค้นข้อมูลผลการตรวจของผู้ป่วยตั้งแต่ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ.2558 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2560 ที่เป็นผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประเภท non-lactose fermenter ที่สร้าง oxidase ได้ จำนวนทั้งสิ้น 637 ราย โดยมีรายละเอียดดังแสดงใน **ตารางที่ 1** แบ่งเป็นผู้ป่วย melioidosis ทั้งหมด 544 ราย ประกอบด้วย ผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งเป็นข้อมูลจากการบริการ hemoculture จำนวน 343 ราย (63.1%) และผู้ป่วยที่พบเชื้อ Bp จากตัวอย่างอื่นๆ จำนวน 201 ราย (36.9%) และตัวอย่างที่พบเชื้ออื่นๆที่ไม่ใช่ Bp (non-melioidosis) ทั้งหมด 93 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) จำนวน 58 ราย (62.4%) และจากตัวอย่างอื่นๆ (other specimens) จำนวน 35 ราย (37.6%) (Aeromonas spp. 49 ตัวอย่าง, Plesiomonas spp. 4 ตัวอย่าง, Achromobacter spp. 12 ตัวอย่าง, Chryseomonas spp. 3 ตัวอย่าง, Agrobacterium radiobacter 4 ตัวอย่าง, Burkholderia cepacia 20 ตัวอย่าง หรือ Pseudomonas stutzeri 1 ตัวอย่าง)

ตารางที่ 1 ลักษณะของตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียและได้รับการทดสอบ latex agglutination test โดยเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560

	Median (IQR)	
	Melioidosis (n = 544)	Non-melioidosis (n = 93)
อายุ, ปี (median, IQR)	52 (44-63)	53 (31-72)
เพศ, n (%)		
ชาย	343 (63.1)	69 (74.2)
หญิง	201 (36.9)	24 (25.8)
ประเภทผู้ป่วย, n (%)		
Sepsis/hemoculture	343 (63.1)	58 (62.4)
Other specimens	201 (36.9)	35 (37.6)
Pus	*89 (44.3)*	*17 (48.6)*
Sputum	*77 (38.3)*	*12 (34.3)*
Urine	*25 (12.4)*	*2 (5.7)*
Body Fluid	*10 (5.0)*	*4 (11.4)*

IQR, interquartile range

ตัวอักษรเอียงแสดงถึงจำนวนผู้ป่วย (%) ในแต่ละกลุ่มประชากรย่อย

จากนั้นผู้วิจัยได้วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp โดยวิธี latex agglutination test เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อ ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลจาก 637 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์แสดงใน **ตารางที่ 2** พบว่าการใช้งาน latex agglutination test เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp ในตัวอย่างประเภทอื่นๆ (other specimens) นั้นให้ผลถูกต้องอย่างสมบูรณ์ 100% ในกรณีการใช้งานในตัวอย่างของผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) นั้นพบว่ามีความไว (sensitivity) และค่าการทำนายผลลบ (negative predictive value, NPV) ที่ 100% แต่ในการศึกษานี้พบผลบวกปลอมในผู้ป่วยติดเชื้อ *Achromobacter spp*. 1 ตัวอย่าง และ *Chryseomonas spp.* 1 ตัวอย่าง ทำให้ค่าความจำเพาะ (specificity) และค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV) ได้อยู่ที่ 96.7% และ 99.4% ตามลำดับ กล่าวโดยรวมแล้วค่าความถูกต้อง (accuracy) ของการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp โดยวิธี latex agglutination test นั้นอยู่ที่ 99.5%

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการวินิจฉัยเชื้อ Bp ด้วยชุดทดสอบ วิธี latex agglutination เปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบทางชีวเคมี

	Total sample n=637	Samples with culture positive for Bp	%Sensitivity (95%CI)	%Specificity (95%CI)	%Positive predictive value (PPV) (95%CI)	%Negative predictive value (NPV) (95%CI)	%Accuracy
Hemoculture	401	343	100 (98.9-100)	96.7 (88.5-99.6)	99.4 (97.9-99.9)	100 (93.8-100)	99.5
Other specimens	236	201	100 (98.2-100)	100 (90-100)	100 (98.2-100)	100 (90-100)	100

นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้วิเคราะห์ความแตกต่างของช่วงระยะเวลาการรอผลระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการรอการรายงานผลเบื้องต้น (primary report) ด้วยการทดสอบ latex agglutination test เปรียบเทียบกับระยะเวลาที่รอการรายงานผลสุดท้าย (final report) ด้วยการทดสอบการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อ (Bacterial culture and biochemical identification) ดังแสดงใน **ตารางที่ 3** พบว่า การรายงานผลเบื้องต้นด้วยการทดสอบ latex agglutination test ไปยังแพทย์ผู้รักษานั้นสามารถทำได้ที่ประมาณ 44.5 ชั่วโมง ในขณะที่การรายงานผลสุดท้ายด้วยวิธีทางชีวเคมีไปยังแพทย์ผู้รักษานั้นสามารถทำได้ที่ประมาณ 71.2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบระยะเวลาการรอผลการทดสอบระหว่างวิธี latex agglutination test กับวิธีการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรีย(การทดสอบทางชีวเคมี)

	Median (IQR) ของระยะเวลาการรอผลการทดสอบ (ชั่วโมง)		
	Latex agglutination test	Bacterial culture and bio-chemical identification	*p-value*
ตัวอย่างจากผู้ป่วยทั้งหมด (n = 637)	44.5 (36.6-58.8)	71.2 (64.2-84.5)	<0.001
Hemoculture (n = 401)	45.5 (42.3-63.4)	72.4 (68.1-90.1)	<0.001
Melioidosis (n = 343)	45.3 (42.4-61.5)	72.3 (68.1-88.5)	<0.001
Non-melioidosis (n = 58)	61.3 (41.5-92.2)	86.3 (67.3-117.9)	<0.001
Other specimens (n = 236)	43.2 (23.4-47.3)	68.5 (50.1-73.2)	<0.001
Melioidosis (n = 201)	42.7 (23.3-47.1)	67.5 (49.6-72.8)	<0.001
Non-melioidosis (n = 35)	44.4 (23.5-49.5)	70.4 (52.7-79.9)	<0.001

ตัวอย่างที่พบผลบวกต่อเชื้อ Bp ด้วยวิธี latex agglutination test จากตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemic melioidosis) จำนวนทั้งหมด 343 ราย ที่รายงานผลการทดสอบภายใน 48 ชั่วโมง มีจำนวน 212 ราย คิดเป็น 61.8% ในขณะที่ตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อบริเวณอื่นๆ (other melioidosis) จำนวนทั้งหมด 201 ราย มีจำนวนตัวอย่างที่รายงานผลการทดสอบภายใน 48 ชั่วโมงอยู่ 170 ราย คิดเป็น 84.6%

สรุปและวิจารณ์

จากผลการศึกษาสะท้อนให้เห็นว่าในพื้นที่ระบาดของเชื้อ Bp นั้น 85.4% (544/637) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประเภท non-lactose fermenter ที่สร้าง oxidase ได้นั้นเป็นผู้ป่วย melioidosis ดังนั้น การนำชุดทดสอบที่สามารถช่วยให้แพทย์ผู้รักษาสามารถวินิจฉัยโรค melioidosis เบื้องต้นได้รวดเร็วขึ้นเพื่อการรักษาผู้ป่วยอย่างถูกต้องและจำเพาะจึงนับเป็นการลงทุนที่คุ้มค่าแก่ชีวิตของผู้ป่วย

โดยจากการศึกษาวิจัยเพื่อยืนยันประสิทธิภาพชุดทดสอบครั้งนี้ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Bp ระหว่างวิธี latex agglutination test กับวิธีการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial culture and biochemical identification) ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่เข้ารักษาในเขตจังหวัดนครพนม โดยเก็บข้อมูลการให้บริการย้อนหลังตั้งแต่ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ไปจนถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 พบว่าวิธี latex agglutination test นั้นมีความถูกต้องในการตรวจหาเชื้อ Bp ที่ 99.5% และ 100% เมื่อใช้กับสิ่งส่งตรวจที่มาจาก hemoculture และตัวอย่างประเภทอื่นๆ ตามลำดับ ทั้งนี้ การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี latex agglutination test นั้นสามารถรายงานผลไปยังแพทย์ผู้รักษาได้ที่ประมาณ 44.5 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี biochemical identification รอผล 71.2 ชั่วโมง หลังการรับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

จากรายงานการประเมินประสิทธิภาพการใช้งานอุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดกรองผู้ป่วย melioidosis อย่างวิธี indirect hemagglutination assay หรือ IHA ที่ใช้ในงานบริการประจำของโรงพยาบาลต่างๆ พบว่าวิธี IHA นั้นมีความไวในการแยกผู้ป่วยติดเชื้อ Bp ออกจากผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้เพียง 69.5% และมีความไวเพียง 67.6% [12] ถึงแม้ว่าการทดสอบ IHA และแปลผลบวกโดยใช้ค่า antibody titer ≥ 160 นั้นสามารถรายงานผลได้อย่างรวดเร็ว แต่ด้วยความน่าเชื่อถือที่ค่อนข้างน้อยเมื่อนำมาใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาดสูง จึงทำให้ IHA นั้นมีประโยชน์ต่อการตัดสินใจของแพทย์ผู้รักษาน้อยเช่นกัน [12, 24] และถ้าหากแปลผลโดยดูการเพิ่มขึ้นของ antibody titer แบบ four-fold rising นั้นก็จำเป็นต้องรอผลนานยิ่งกว่าการรอผลการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อในตัวอย่าง [24] และถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาอุปกรณ์ชนิดอื่นขึ้นมาโดยอาศัยหลักการอื่น เช่น PCR [13], IFA [14], ELISA [16,17] หรือ microarray assay [20] หรือ microarray assay [20] แต่วิธีการทดสอบและใช้งานอุปกรณ์ดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์และจำเป็นต้องมีอุปกรณ์พิเศษในการทดสอบและแปลผล ดังนั้น วิธี latex agglutination test จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้งานจริงกับงานบริการประจำวันตามโรงพยาบาล

ทั้งนี้ การที่สามารถรายงานผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้เร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียถึงประมาณ 26.7 ชั่วโมงนี้

สามารถช่วยให้แพทย์ผู้รักษาผู้ป่วย melioidosis ได้อย่างทันท่วงที ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าผู้ป่วย melioidosis นั้นควรได้รับการรักษาที่เหมาะสมภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่อาการของผู้ป่วยจะไม่สามารถกู้คืนกลับมาได้ [1, 25] ซึ่งจะเห็นได้จากการศึกษาว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียนั้นแทบจะไม่สามารถรายงานผลได้ทันภายใน 48 ชั่วโมง โดยค่าต่ำสุดของ interquartile range ที่แสดงใน **ตารางที่ 3** นั้นอยู่ที่ 49.6-68.1 ชั่วโมง และค่าสูงสุดของ interquartile range อยู่ที่ 72.8-117.9 ชั่วโมง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยติดเชื้อ Bp ในกระแสเลือดที่สามารถเสียชีวิตได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อ Bp ในกระแสเลือด [26] ยิ่งต้องการการตรวจวินิจฉัยและการรักษาที่ทันท่วงทีเป็นพิเศษ ซึ่งการทดสอบด้วย latex agglutination test สามารถรายงานผลได้เกือบจะทันทีที่สามารถเพาะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียได้ โดยส่วนใหญ่สามารถรายงานผลบวก Bp ในผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดได้ที่ประมาณ 45.3 ชั่วโมง โดยมีช่วง interquartile range อยู่ที่ 42.4-61.5 ชั่วโมง โดยมีสัดส่วนของตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดที่ทราบผลบวกต่อ Bp ด้วยวิธี latex agglutination test ภายใน 48 ชั่วโมง อยู่ถึง 212 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 61.8 % ของตัวอย่างจำนวน 343 ตัวอย่าง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยคาดหวังว่าการเสนอแนวทางใหม่ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย melioidosis ดังที่แสดงใน **ภาพที่ 1** จะสามารถเป็นแนวทางสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในงานบริการประจำให้แก่สถาบันพยาบาลอื่นๆได้ ซึ่งการรายงานเบื้องต้นจากผลการทดสอบ latex agglutination test ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือสูงนี้ไปยังแพทย์ผู้รักษา อาจส่งผลให้แพทย์ตัดสินใจรักษาผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็วและทันท่วงที แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้พบผลบวกปลอมในผู้ป่วยติดเชื้อ Achromobacter spp. 1 ตัวอย่าง และ Chryseomonas spp. 1 ตัวอย่าง ผลการตรวจยืนยันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมีและการทดสอบ drug susceptibility test ก็ยังคงจำเป็นต้องกระทำเพื่อความมั่นใจในการรักษาผู้ป่วยต่อไป โดยการสื่อสารให้ข้อมูลถึงข้อจำกัดของชุดทดสอบแก่แพทย์เป็นสิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต้องดำเนินการในการนำแนวทางดังกล่าวไปสู่การปฏิบัติ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน โรงพยาบาลนครพนม เลขที่ใบรับรองการอนุมัติ NP-EC11-NO. 20/2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โรงพยาบาลนครพนม, เจ้าหน้าที่ งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลนครพนม, รศ.ดร.นริศรา จันทราทิตย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยามหิดล, ศ.ดร.นพ.ชยันตร์ธร ปทุมานนท์ พร้อมคณะทำงานโครงการ พัฒนางานวิจัยทางคลินิกและการจัดการความรู้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโครงการโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ จังหวัดนครพนม น้ำยา Latex agglutination test ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัย Determinants of outcome and recurrent infections in Melioidosis โดย the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health under award number U01AI115520.

เอกสารอ้างอิง

1. Cheng AC, Currie BJ. 2005. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin Microbiol Rev. Apr;18(2):383-416.
2. Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, Currie BJ, Peacock SJ, Dance DAB, et al. 2018. Melioidosis. Nat Rev Dis Primers. Feb 1;4:17107.
3. Currie BJ, Ward L, Cheng AC. 2010. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. PLoS Negl Trop Dis. Nov 30;4(11):e900.
4. Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, et al. 2010. Increasing incidence of human melioidosisin Northeast Thailand. Am J Trop Med Hyg. Jun;82(6):1113-7.
5. Lau SK, Sridhar S, Ho CC, Chow WN, Lee KC, Lam CW, et al. 2015. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. Exp Biol Med (Maywood). Jun;240(6):742-51.
6. Inglis TJ. 2010. The Treatment of Melioidosis.Pharmaceuticals (Basel). Apr 27;3(5):1296-303.
7. Wiersinga WJ, Currie BJ, Peacock SJ. 2012. Melioidosis. N Engl J Med. Sep 13;367 (11):1035-44.
8. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. 2015. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. Clin Microbiol Infect. Apr;21(4):313-22.
9. Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Wongsuvan G, Pangmee S, Amornchai P, Teparrakkul P, et al. 2011. Repeat blood culture positive for *B. pseudomallei* indicates an increased risk of death from melioidosis. Am J Trop Med Hyg. Jun;84(6):858-61.
10. Cheng AC, O'Brien M, Freeman K, Lum G, Currie BJ. 2006. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia. Am J Trop Med Hyg. Feb;74(2):330-4.
11. Tiyawisutsri R, Peacock SJ, Langa S, Limmathurotsakul D, Cheng AC, Chierakul W, et al. 2005. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. J Clin Microbiol. Sep;43(9): 4872-4.
12. Suttisunhakul V, Chantratita N, Wikraiphat C, Wuthiekanun V, Douglas Z, Day NP, et al. 2015. Evaluation of polysaccharide -based latex agglutination assays for the rapid detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. Am J Trop Med Hyg. Sep;93(3):542-6.

13. Kaestli M, Richardson LJ, Colman RE, Tuanyok A, Price EP, Bowers JR, et al. 2012. Comparison of TaqMan PCR assays for detection of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens. J Clin Microbiol. Jun;50(6):2059-62.

14. Mathai E, Jesudason MV, Anbarasu A. 2003. Indirect immunofluorescent antibody test for the rapid diagnosis of melioidosis. Indian J Med Res. Aug;118: 68-70.

15. Houghton RL, Reed DE, Hubbard MA, Dillon MJ, Chen H, Currie BJ, et al. 2014. Development of a prototype lateral flow immunoassay (LFI) for the rapid diagnosis of melioidosis. PLoS Negl Trop Dis. Mar;8(3):e2727.

16. Pumpuang A, Dunachie SJ, Phokrai P, Jenjaroen K, Sintiprungrat K, Boonsilp S, et al. 2017. Comparison of O-polysaccharide and hemolysin co-regulated protein as target antigens for serodiagnosis of melioidosis. PLoS Negl Trop Dis. Mar;11(3):e0005499.

17. Suttisunhakul V, Wuthiekanun V, Brett PJ, Khusmith S, Day NP, Burtnick MN, et al. 2016. Development of Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. J Clin Microbiol. May;54(5):1259-68.

18. Chuah SC, Gilmore G, Norton RE. 2005. Rapid serological diagnosis of melioidosis: an evaluation of a prototype immunochromatographic test. Pathology. Apr;37(2):169-71.

19. O'Brien M, Freeman K, Lum G, Cheng AC, Jacups SP, Currie BJ. 2004. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity. J Clin Microbiol. May;42(5):2239-40.

20. Kohler C, Dunachie SJ, Muller E, Kohler A, Jenjaroen K, Teparrukkul P, et al. 2016. Rapid and Sensitive Multiplex Detection of *Burkholderia pseudomallei*-Specific Antibodies in Melioidosis Patients Based on a Protein Microarray Approach. PLoS Negl Trop Dis. Jul;10(7):e0004847.

21. Duval BD, Elrod MG, Gee JE, Chantratita N, Tandhavanant S, Limmathurotsakul D, et al. 2014. Evaluation of a latex agglutinationassay for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Am J Trop Med Hyg. Jun;90(6):1043-6.

22. Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V, Aramsri P, Panichakul T, Sirisinha S. 2000. Monoclonal antibody -based rapid identification of *Burkholderia*

pseudomallei in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia. J Med Microbiol.Dec; 49(12):1075-8.

23. Simundic AM. 2009. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. EJIFCC. Jan;19(4):203-11.
24. Hoffmaster AR, AuCoin D, Baccam P, Baggett HC, Baird R, Bhengsri S, et al. 2013. Melioidosis diagnostic workshop, Emerg Infect Dis. Feb;21(2).
25. White NJ, Dance DA, Chaowagul W, Wattanagoon Y, Wuthiekanun V, Pitakwatchara N. 1989. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. Lancet. Sep 23;2(8665): 697-701.
26. Tiangpitayakorn C, Songsivilai S, Piyasangthong N, Dharakul T. 1997. Speed of detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures and its correlation with the clinical outcome. Am J Trop Med Hyg. Jul;57(1):96-9.