

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Haemophilus* spp. จากตัวอย่างส่งตรวจด้วยวิธีทดสอบชีวเคมีเปรียบเทียบกับวิธีพีซีอาร์

แพรวชมพู แซ่ตั้ง^{1,2}, อรุณลักษณ์ อุลิตานนท์^{2*}, โชติชนะ วิไลลักษณ์², อรุณวดี ชนะวงษ์²,
พิพัฒน์ ศรีบุญจักษณ์², อัญชลี เจนวรสุน³

บทคัดย่อ

Haemophilus influenzae เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยในทางเดินหายใจส่วนบนของมนุษย์ สามารถก่อโรคได้หลากหลาย และรุนแรง ส่วนเชื้อชนิดอื่นในจีนัสนี้ส่วนใหญ่ไม่ก่อโรคในมนุษย์แต่สามารถแยกได้บ่อยจากตัวอย่างส่งตรวจ เช่น เสมหะ เนื่องจากเชื้อเหล่านี้มีความสามารถในการก่อโรคได้แตกต่างกัน ห้องปฏิบัติการชันสูตรจึงจำเป็นต้องมีวิธีที่น่าเชื่อถือสำหรับพิสูจน์แยกสปีชีส์ การศึกษานี้จึงทำการเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยเชื้อ *Haemophilus* ด้วยวิธีทางพีโนไทป์และจีโนไทป์ โดยศึกษา *Haemophilus* จำนวน 101 ตัวอย่างด้วยวิธีทางพีโนไทป์ 4 วิธีคือ *Staphylococcus* streak technique, XV paper strip technique, porphyrin test และการทดสอบทางชีวเคมี ส่วนวิธีทางจีโนไทป์ใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) ตรวจยีนที่จำเพาะในส่วน 16SrDNA, *p6* และ *sodA* ผลการศึกษาพบว่าวิธีทางพีโนไทป์ 3 วิธีคือ XV paper strip technique, porphyrin test และการทดสอบทางชีวเคมี ได้ผลตรงกันคือเป็น *H. influenzae* 88 ตัวอย่างและ *H. parainfluenzae* 13 ตัวอย่าง ขณะที่การพิสูจน์ด้วยวิธี *Staphylococcus* Streak technique ได้เป็น *H. influenzae* 54 ตัวอย่างและ *H. parainfluenzae* 47 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ 3 วิธีแรกร้อยละ 66.4 ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าวินิจฉัยได้เป็น *H. influenzae* 83 ตัวอย่างและเป็น *H. parainfluenzae* 12 ตัวอย่างและมี 6 ตัวอย่างที่ให้ผลว่าไม่ใช่ทั้งสองสปีชีส์ จากการศึกษาพบว่า การทดสอบด้วยวิธี XV paper strip technique, วิธี porphyrin และการทดสอบทางชีวเคมี ให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์ร้อยละ 93.1 แต่วิธี *Staphylococcus* streak technique ให้ผลสอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์เพียงร้อยละ 71.3

คำสำคัญ: *Haemophilus*, PCR, XV factor, *Staphylococcus* streak technique, Porphyrin test

¹ บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Identification of *Haemophilus* spp. from clinical specimens by biochemical tests compared with PCR method

Pairshompoo Saetung^{1,2}, Aroonlug Lulitanond^{2*}, Chotechana Wilailuckana², Aroonwadee Chanawong²,
Pipat Sribenjalux², Unchalee Janewatana³

Abstract

Haemophilus influenzae is a part of normal upper respiratory flora of human, which can cause a wide variety of infections. Other members of genus *Haemophilus* rarely cause human infection but are frequently isolated from clinical specimens, such as sputum. The pathogenicity between *H. influenzae* and other *Haemophilus* species is different therefore a reliable method for identification of *H. influenzae* is essential. The aim of this study was to compare the identification methods for *Haemophilus* by four phenotypic tests with that by a PCR-based method. A total of 101 *Haemophilus* isolates were identified by biochemical tests and the XV requirement test by using XV paper strip technique, porphyrin test and *Staphylococcus* streak technique. The PCR-based method was performed using specific primers for 16SrDNA, *p6* genes of *H. influenzae* and *sodA* gene of *H. parainfluenzae*. Using the XV paper strip technique, porphyrin test and biochemical tests, 88 and 13 isolates were identified as *H. influenzae* and *H. parainfluenzae* respectively, whereas 54 *H. influenzae* and 47 *H. parainfluenzae* were identified by using *Staphylococcus* streak technique (66.4 % agreement with that of the three tests). The PCR-based method revealed that 83 *H. influenzae* and 12 *H. parainfluenzae* were identified, whereas 6 isolates could not be categorized into both species. This study showed that identification of *Haemophilus* by the XV paper strip technique, porphyrin test and biochemical test gave 93.1 % agreement with that of the PCR method, whereas the *Staphylococcus* streak technique gave only 71.3 % agreement.

Keywords: *Haemophilus*, PCR, XV factor, *Staphylococcus* streak technique, Porphyrin test

¹ Graduate School,

² Centre for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University,

³ Bacteriology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University

*Corresponding author (e-mail: arolul@kku.ac.th)

บทนำ

Haemophilus influenzae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดเล็ก สามารถก่อโรคในเด็กและผู้ใหญ่ได้หลากหลาย ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบรุกรานสู่กระแสเลือด *H. influenzae* จำแนกได้ 2 ชนิดคือชนิดที่สร้างและไม่สร้างแคปซูล ส่วนแคปซูลประกอบด้วยโครงสร้างที่ต่างกัน แบ่งได้เป็น 6 ชนิดคือชนิด a ถึง f เชื้อที่สร้างแคปซูลชนิด b (Hib) มีความสามารถก่อโรครุนแรงมากกว่าเชื้อที่สร้างแคปซูลชนิดอื่น รวมถึงชนิดที่ไม่สร้างแคปซูล Hib เป็นชนิดเดียวที่แคปซูลมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (pentose sugar) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยที่ซ้ำๆ กันของน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดไรโบสจับกับไรโบทอลฟอสเฟต (polyribose ribitol phosphate หรือ PRP)⁽¹⁾ Hib เป็นสาเหตุการเกิดเยื่อสมองอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด และฝาปิดกล่องเสียงอักเสบ โรคติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจาก *H. influenzae* ชนิดไม่สร้างแคปซูล ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในผู้ที่มีอายุมาก ก่อให้เกิดโรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง หูชั้นกลางอักเสบ ไซนัสอักเสบ และการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ข้ออักเสบ เป็นต้น⁽²⁾

การวินิจฉัยและรักษาที่รวดเร็วมีความสำคัญมากในกรณีติดเชื้อแบบรุนแรง ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุจาก Hib ความล้มเหลวในการแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุ มีผลทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดนำไปสู่การรักษาที่ไม่เหมาะสม การวินิจฉัยโรคโดยอาศัยข้อมูลจากอาการแสดงทางคลินิกและการตรวจยืนยันด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้เวลาอย่างน้อย 18-24 ชั่วโมง ซึ่งการได้รับยาปฏิชีวนะเบื้องต้นก่อนการเก็บตัวอย่างเพื่อเพาะเชื้อและความล่าช้าในการขนส่งตัวอย่าง เป็นสาเหตุสำคัญให้การตรวจเพาะเชื้อพบได้น้อยลง⁽³⁾ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อได้โคโลนีแล้ว ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่วินิจฉัยเชื้อ *H. influenzae* โดยอาศัยลักษณะโคโลนี การย้อมแกรม การทดสอบคาตาเลส และการทดสอบความต้องการแฟกเตอร์ X และ V เป็นการทดสอบในงานประจำ การทดสอบความต้องการแฟกเตอร์ X และ V นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้ paper strip, *Staphylococcus* streak technique และ porphyrin test นอกจากนี้อาจนำวิธีภูมิคุ้มกันวิทยามาใช้วินิจฉัยชนิดของแคปซูลของเชื้อเช่น วิธี Latex agglutination ซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ

ทางการแพทย์ในประเทศพัฒนาแล้ว อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีรายงานว่าให้ผลความไวต่ำและอาจเกิดผลบวกปลอม^(4,5)

ปัจจุบันการใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลประสบความสำเร็จมากขึ้นในการวินิจฉัยเชื้อหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส และโปรโตซัว ซึ่งเทคโนโลยีเหล่านี้มีศักยภาพที่ดีเยี่ยมในด้านความไวและใช้เวลาน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ⁽⁶⁻⁹⁾ สำหรับเชื้อ *Haemophilus* ได้มีการศึกษาต่างๆ ที่พยายามพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. influenzae* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และพบว่ายีน *p6* ซึ่งกำกับการสร้าง outer membrane protein ในเชื้อ *H. influenzae* มีความจำเพาะและความไวสูง⁽¹⁰⁻¹²⁾ เมื่อไม่นานมานี้ Abdeldaim และคณะได้ศึกษายีนต่างๆ จำนวน 4 ยีนเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ *H. influenzae* ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่ายีน *p6* มีความจำเพาะและความไวสูง⁽¹⁰⁾ การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H. influenzae* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ยังไม่มีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากความพร้อมของเครื่องมือ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Haemophilus* ด้วยวิธีพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยด้วยวิธีทางฟิโนไทป์ต่างๆ เพื่อทราบวิธีวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำ และเป็นข้อมูลสำหรับห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทั่วไป ใช้ประกอบการพิจารณาเพื่อเลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสม และถูกต้องในการวินิจฉัยเชื้อกลุ่มนี้

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ *Haemophilus* spp. ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์จำนวน 74 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลรามารับดี 27 ตัวอย่าง รวม 101 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงเชื้อใน chocolate agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5-10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตและบันทึกลักษณะโคโลนี การดิสเสิร์ส และเก็บรักษาไว้ใน skimmed milk (Oxoid) ที่ผสมกลีเซอรอล (VWR International, Poole, England) ร้อยละ 15-20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป

แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้คือ *H. influenzae* ATCC 47966, ATCC 46919, ATCC 49247 และ

H. parainfluenzae ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างและเชื้ออ้างอิงด้วยวิธีต้ม (boiling method)⁽¹³⁾ โดยกระจายเชื้อประมาณ 8 โคโลนี ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากันดีอย่าให้เชื้อจับกันเป็นก้อน ต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 3 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 3 นาที ดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบต่อไป

3. การทดสอบทางฟิโนไทป์

นำตัวอย่างเชื้อมาทดสอบความต้องการแฟคเตอร์ X และ V โดยใช้ 3 วิธี คือ 1) Paper strip technique ทำโดยปรับความขุ่นของเชื้อที่ต้องการทดสอบในน้ำเกลือ ให้เท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นนำเชื้อไปป้ายบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ trypticase soy agar (TSA) ให้ทั่ว แล้วนำ strip ที่มีแฟคเตอร์ X มาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้ววาง strip ที่มีแฟคเตอร์ V ให้ห่างกันประมาณ 15 มิลลิเมตร รอบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญเฉพาะบริเวณ รอบแฟคเตอร์ X หรือ V อย่างใดอย่างหนึ่งแสดงว่า เชื้อต้องการเฉพาะแฟคเตอร์ X หรือ V ตามลำดับ แต่ถ้า เจริญระหว่างแฟคเตอร์ X และ V แสดงว่าเชื้อต้องการ ทั้งสองแฟคเตอร์ 2) *Staphylococcus* streak technique ทำโดยเตรียมเชื้อทดสอบเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 แล้วนำมาป้าย ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ blood agar และ TSA จากนั้นนำเชื้อ *S. aureus* มาเพาะในอาหารทั้งสองจาน โดยลากเป็นแถบเล็กยาวตรงกลางจานเพาะเชื้อ ซึ่งเชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างแฟคเตอร์ V และปล่อยสู่นอกเซลล์ได้ อย่านเพาะเชื้อไว้ในอุณหภูมิและบรรยากาศ เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อ ถ้าเจริญ รอบ *S. aureus* ใน blood agar เพียงอย่างเดียว แสดงว่า เชื้อต้องการทั้งแฟคเตอร์ X และ V แต่ถ้าเจริญรอบ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด แสดงว่าเชื้อต้องการเฉพาะ แฟคเตอร์ V 3) Porphyrin test ทำโดยเชื้อที่ต้องการ ทดสอบลงในสารละลายของสารตั้งต้น delta-aminolevulinic acid รอบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อ่านผลโดยหยดน้ำยา Kovacs' แล้วเขย่าเบาๆ ผลบวกจะเป็น สีชมพูในชั้นของสารละลายตั้งต้น⁽¹⁴⁾ เชื้อ *H. parainfluenzae* มีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นนี้ให้เป็น porphobilinogen ได้จึงเกิดเป็นสีชมพู ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีประกอบ ด้วยการทดสอบเอนไซม์คาตาเลส และการหมักย่อยน้ำตาล 4 ชนิดคือ กลูโคส ซูโครส แลคโตส และ แมนโนส โดยมี phenol red (PR) เป็น pH indicator ทำการทดสอบ ใน microtiter plate ที่ปราศจากเชื้อ โดยหยดอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่จะทดสอบได้แก่ PR glucose, sucrose, lactose และ mannose (ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1) อย่างละ 250 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate แล้วเขี่ยเชื้อทดสอบ ซึ่งเพาะใหม่ๆ บน chocolate agar มาประมาณ 8 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหลุม อบที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เลี้ยงเชื้อ หากอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อสามารถหมักย่อยน้ำตาลชนิดนั้น

4. การทดสอบทางจีโนไทป์

ตรวจหาชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อ *H. influenzae* ด้วยวิธี multiplex พีซีอาร์ (M-PCR) โดยใช้ยีน 16SrDNA และ *p6* เป็นเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA-F (5'-TCCTAAGAAGAGCTCAGAGAT-3') และ 16SrDNA-R (5'-TGATCCAACCGCAGGTTCC-3'), P6-F (5'-TTGGCGGWTACTCTGTTGCT-3') และ P6-R (5'-TGCAGGTTTTTCTTCACCGT-3') ซึ่งให้ product ขนาด 538 และ 296 ตามลำดับ⁽¹¹⁾ (ไพรเมอร์ เหล่านี้สังเคราะห์โดย Sigma-Proligo, USA) ส่วนผสม ใน M-PCR สำหรับปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer (New England Biolabs, Ontario, Canada), deoxynucleotide triphosphate (Promega, Medicson, WI, USA) ชนิดละ 200 µM, ไพรเมอร์ 16SrDNA-F, 16SrDNA-R, P6-F และ P6-R อย่างละ 1.0 mM, *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, Ontario, Canada) 1 U, MgCl₂ 1.5 µM และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.5 µl สภาวะของปฏิกิริยา M-PCR ดัดแปลงจากวิธีของ Billal และคณะ⁽¹⁵⁾ คือ pre-denaturation 94°C 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94°C 1 นาที, annealing ที่ 55°C 1 นาที, extension ที่ 72°C 1 นาที 25 รอบ และ final extension 72°C 10 นาที โดยใช้เครื่อง PCT-200

(MJ Research Inc, USA) จากนั้นแยกชิ้นส่วนของ DNA ในแผ่นวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (agarose, Promega, USA) ด้วยเครื่อง gel electrophoresis (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder (New England Biolabs) และย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (Boehringer Mannheim, Germany) ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง UV illumination Gel DOC 1000 (Bio-Rad, CA, USA) ขึ้น DNA ที่จำเพาะของเชื้อ *H. influenzae* จาก primer ทั้งสองคู่มีขนาด 538 คู่เบสและ 296 คู่เบส ตามลำดับ

ตรวจหายีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *H. parainfluenzae* ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *sodA* ซึ่งกำกับการสร้าง manganese-dependent superoxide dismutase ของเชื้อ *H. parainfluenzae* คือไพรเมอร์ *sodA-F* (5'-TGCAAATGCCGTGTTAGAAA-3') และ *sodA-R* (5'-GAACCGAAATCACGTTCGAT-3') ซึ่งให้ product ขนาด 216 คู่เบส ใช้ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับการตรวจยีน *p6* และใช้สภาวะของปฏิกิริยา PCR ดังนี้ คือ pre-denaturation 94°C 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94°C 1 นาที annealing ที่ 57°C 1 นาที extension ที่ 72°C 1 นาที 25 รอบ และ final extension 72°C 10 นาที

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้สถิติที่วัดความสอดคล้องกันของผลที่ได้จากการวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีต่างๆ โดยแสดงในรูปของตารางความสอดคล้อง ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบแต่ละวิธีคือ paper strip technique, porphyrin test, *Staphylococcus* streak technique และการทดสอบชีวเคมีกับวิธีพีซีอาร์ ซึ่งแบ่งผลการวินิจฉัยเชื้อเป็นสามกลุ่มคือ *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* และ non-identify สรุปผลทางสถิติ โดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์ kappa (K) ถ้าค่า K เข้าใกล้ 1 แสดงว่าสองวิธีนั้นให้ผลสอดคล้องกัน คำนวณค่า K ได้จากสูตรดังนี้⁽¹⁵⁾

$$K = \frac{N \sum_{i=1}^r x_{ii} - \sum_{i=1}^r (x_{i+} \times x_{+i})}{N^2 - \sum_{i=1}^r (x_{i+} \times x_{+i})}$$

r = จำนวน row ในเมตริกซ์; x_{ii} = จำนวนที่สังเกตได้ใน row ที่ i และ column i ; x_{i+} = ผลรวมใน row i ; x_{+i} = ผลรวมใน column i ; N = จำนวนทั้งหมดที่สังเกตได้ การแทนค่าเพื่อวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างผลการทดสอบวิธี porphyrin กับวิธี PCR

$$x_{1-} = 83, x_{2-} = 12, x_{3-} = 0 \quad x_{+1} = 88, x_{+2} = 83, x_{+3} = 13, x_{+4} = 12, x_{+5} = 0, x_{+6} = 6$$

$$K = \frac{101(83 + 12 + 0) - [(88 \times 83) + (13 \times 12) + (0 \times 6)]}{101^2 - [(88 \times 83) + (13 \times 12) + (0 \times 6)]}$$

$$K = 0.78$$

การแปลผลค่า K ค่าระหว่าง 0.40 ถึง 0.60 ถือว่ามีความเที่ยงระดับปานกลางหรือพอใช้ (fair) ค่าระหว่าง 0.60 ถึง 0.75 ถือว่ามีความเที่ยงระดับดี (good) และค่าตั้งแต่ 0.76 ขึ้นไป ถือว่ามีความเที่ยงระดับดีมาก (excellent)

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *Haemophilus* จำนวน 101 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่แยกได้จากเสมหะและทางเดินหายใจ 54 ตัวอย่าง หนองจากแผล หูและตา 13 ตัวอย่าง เลือด 2 ตัวอย่าง ระบบสืบพันธุ์ 2 ตัวอย่างและที่ไม่ทราบชนิดของสิ่งส่งตรวจ 30 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางฟิโนไทป์พบว่าการทดสอบความต้องการแฟกเตอร์ X และ V ด้วยวิธี paper strip technique และ porphyrin test ได้ผลตรงกับการทดสอบทางชีวเคมีคือวินิจฉัยเชื้อได้เป็น *H. influenzae* 88 ตัวอย่าง และเป็น *H. parainfluenzae* 13 ตัวอย่าง ส่วนวิธี *Staphylococcus* streak technique ได้ผลเป็น *H. influenzae* 54 ตัวอย่างและ *H. parainfluenzae* 47 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ 3 วิธีแรกเพียง 67 ตัวอย่าง (ร้อยละ 66.4) ดังแสดงใน ตารางที่ 1 ส่วนผลจากการทดสอบทางจีโนไทป์ ซึ่งตรวจด้วยยีน *16SrDNA* ที่จำเพาะต่อเชื้อ *H. influenzae* และยีน *p6* พบว่าการตรวจด้วยยีน *p6* สามารถวินิจฉัยว่าเป็น *H. influenzae* 83 ตัวอย่าง แต่การตรวจด้วยยีน *16SrDNA* สามารถวินิจฉัยว่าเป็น *H. influenzae* เพียง 64 ตัวอย่าง ผลการตรวจทั้ง 2 ยีนมีความสอดคล้องกันร้อยละ 77.1 คือ ได้เป็น *H. influenzae* 64 ตัวอย่างและไม่สอดคล้องกัน 19 ตัวอย่าง และผลการตรวจด้วยยีน *sodA* ซึ่งจำเพาะ

ต่อเชื้อ *H. parainfluenzae* สามารถวินิจฉัยว่าเป็น *H. parainfluenzae* 12 ตัวอย่าง ดังแสดงใน ตารางที่ 2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Kappa analysis พบว่า ผลการวินิจฉัยเชื้อ *Haemophilus* ด้วยวิธี XV paper strip, วิธี porphyrin และวิธีทดสอบชีวเคมีได้ผลสอดคล้องกับวิธี พีซีอาร์ คิดเป็นร้อยละ 94.1 (ค่า $k = 0.78$) ส่วนวิธี

Staphylococcus streak technique ได้ผลสอดคล้องกับวิธี PCR คิดเป็นร้อยละ 60.4 (ค่า $k = 0.22$) แสดงว่าวิธี XV paper strip, porphyrin test และการทดสอบด้วยชุดทดสอบชีวเคมีสามารถวินิจฉัยเชื้อกลุ่มนี้ได้ผลถูกต้องใกล้เคียงกับวิธีพีซีอาร์มากกว่าวิธี *Staphylococcus* streak technique

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณสมบัติของ *Haemophilus* ด้วยวิธีทางพีโนไทป์

Organism		XV paper strip, porphyrin and biochemical tests		
		<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	Total
<i>Staphylococcus</i>	<i>H. influenzae</i>	54	0	54
streak technique	<i>H. parainfluenzae</i>	34	13	47
Total		88	13	101

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ *Haemophilus* เปรียบเทียบวิธีพีโนไทป์กับวิธีพีซีอาร์

Organism		วิธี PCR			
		<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	Unidentified	Total
XV paper strip, porphyrin and biochemical tests	<i>H. influenzae</i>	83	0	5	88
	<i>H. parainfluenzae</i>	0	12	1	13
	Total	83	12	6	101
<i>Staphylococcus</i>	<i>H. influenzae</i>	49	0	5	54
streak technique	<i>H. parainfluenzae</i>	34	12	1	47
	Total	83	12	6	101

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจแยกสปีชีส์ของ *Haemophilus* โดยใช้เชื้อ 101 ตัวอย่าง ทดสอบด้วยวิธีทางพีโนไทป์เทียบกับวิธีทางจีโนไทป์ ผลจากวิธีทางพีโน

ไทป์ได้ผลสอดคล้องกันทุกวิธี ยกเว้นวิธี *Staphylococcus* streak technique ซึ่งได้ผลต่างจากการทดสอบทางพีโนไทป์วิธีอื่นๆ จำนวน 34 ตัวอย่าง ซึ่งการวินิจฉัยเชื้อ *H. influenzae* และ *H. parainfluenzae* ด้วยการใช้วิธีทดสอบที่ดูผล

จากปรากฏการณ์ satellite นี้ มีรายงานต่างๆ กล่าวถึงสาเหตุที่อาจทำให้เกิดการวินิจฉัย *H. influenzae* ผิดเป็น *H. parainfluenzae* หรือสลับกันได้มากถึงร้อยละ 18-30^(16, 17) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในขั้นตอนที่ทดสอบ และมีหลายปัจจัยที่อาจทำให้การแปลผลผิดพลาด ได้แก่ 1) การปนเปื้อนของ hemin (แฟคเตอร์ X) ในอาหารที่ใช้ทำการทดสอบ 2) การนำพาแฟคเตอร์ X มาจากอาหารที่มีส่วนประกอบของเลือด 3) *H. parainfluenzae* บางสายพันธุ์เจริญได้ยากทำให้อ่านผลผิดพลาดเพราะมองไม่เห็นการเจริญของเชื้อ ในการศึกษานี้ได้ป้องกันการเกิดผลผิดพลาดดังกล่าว โดยเชื้อเชื้อทดสอบลงในน้ำเกลือ เพื่อเจือจางแฟคเตอร์ต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนมากับเชื้อ และได้ปรับเชื้อทดสอบให้ปริมาณเชื้อมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland ซึ่งวิธี *Staphylococcus* streak technique ในการศึกษานี้ให้ผลต่างจากการทดสอบด้วยวิธีอื่นๆ อาจเกิดจากขั้นตอนการนำโคโลนีของ *S. aureus* มาโดยตรงจาก blood agar เพื่อมา streak ในอาหารที่ใช้ทำการทดสอบ จึงอาจมีการนำพาแฟคเตอร์ X จาก blood agar ติดมาด้วย และมีรายงานที่กล่าวถึงวิธี porphyrin test ว่าให้ผลการวินิจฉัยเชื้อ *Haemophilus* ได้ถูกต้องกว่าการทดสอบด้วยวิธี XV paper strip และ *Staphylococcus* streak technique⁽¹⁸⁾ แต่จากการศึกษานี้พบว่าการวินิจฉัยเชื้อวิธี XV paper strip ได้ผลตรงกับวิธี porphyrin test

การตรวจแยกสปีชีส์เชื้อในกลุ่ม *Haemophilus* ชนิดที่พบบ่อยด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *p6* และยีนส่วน *16SrDNA* มีรายงานว่าการใช้ยีน *p6* เป็นเป้าหมายเพื่อตรวจหา *H. influenzae* มีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 96⁽¹⁰⁾ ในการศึกษานี้จึงใช้วิธีตรวจด้วยพีซีอาร์สำหรับยีน *p6* เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยด้วยวิธีอื่นๆ จากการศึกษานี้พบว่าวิธีทางพีโนไทป์ให้ผลส่วนใหญ่สอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์ แต่มีเชื้อที่ให้ผลแตกต่างกัน 6 ตัวอย่างคือเชื้อทั้ง 6 ตัวอย่างไม่สามารถวินิจฉัยว่าเป็น *H. influenzae* หรือ *H. parainfluenzae* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่ง 5 ตัวอย่างเป็น *H. influenzae* จากการทดสอบด้วยวิธี paper strip, *Staphylococcus* streak technique

และ porphyrin แต่ผลจากวิธีชีวเคมีไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น *H. influenzae*, *H. aegyptius* หรือ *H. haemolyticus* ซึ่ง *H. haemolyticus* แตกต่างจาก *H. influenzae* และ *H. aegyptius* โดยสามารถสลายเม็ดเลือดแดงของม้า แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้เลือดม้าในการทดสอบ ส่วนการจำแนกเชื้อ *H. influenzae* และ *H. aegyptius* ทำได้โดยการวิเคราะห์ outer membrane protein profiles⁽¹⁴⁾ ซึ่งไม่ได้ทดสอบในการศึกษานี้ ส่วนอีก 1 ตัวอย่างเป็น *H. parainfluenzae* จากการทดสอบด้วย paper strip, porphyrin, *Staphylococcus* streak technique และชีวเคมี ซึ่งเชื้อทั้ง 6 ตัวอย่างตรวจไม่ได้ด้วยวิธี PCR อาจมีสาเหตุจากลำดับเบสในบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ทั่วไป จึงทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ ดังนั้นจึงควรนำตัวอย่างเหล่านี้ไปทำการศึกษาต่อไป โดยอาจศึกษาหาลำดับเบสในยีนที่เกี่ยวข้อง เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบและวินิจฉัยเชื้อต่อไป

จากการศึกษานี้พบว่าวิธีพีซีอาร์โดยการตรวจยีน *p6* สำหรับ *H. influenzae* และยีน *sodA* สำหรับ *H. parainfluenzae* เป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็วและถูกต้องเมื่อเทียบกับวิธีทดสอบทางพีโนไทป์ซึ่งต้องใช้เวลานาน 48-72 ชั่วโมงและอาจเกิดความผิดพลาดได้ในหลายขั้นตอนของการทดสอบ การตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ทั้งสองยีนนี้สามารถนำมาดัดแปลงรวมทดสอบในปฏิกิริยาเดียวกันเป็น multiplex พีซีอาร์ได้ และอาจใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ *Haemophilus* โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจได้ ซึ่งมีรายงานของ Jbara และคณะได้ตรวจหาเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ รวมทั้ง *H. influenzae* ด้วยการตรวจโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจน้ำไขสันหลังและน้ำจากหูชั้นกลาง (middle ear effusion) ด้วยวิธีพีซีอาร์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธีพีซีอาร์มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และ 87.3 ตามลำดับ⁽¹⁹⁾ สำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่สามารถตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ จำเป็นต้องตรวจด้วยการเพาะเชื้อ การเลือกทดสอบด้วยวิธี XV paper strip ให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์มากกว่าการทดสอบด้วยวิธี *Staphylococcus* streak technique

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) และทุนบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2550 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ โรงพยาบาลรามาริบัติ โรงพยาบาลอุดรดิตถ์ และคุณยิ่งฤทธิ์ จันทรสขุ ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Winn WC Jr. Miscellaneous fastidious gram-negative bacilli. In: Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, eds. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 429-548.
2. Yadav MC, Chakraborti A, Ray P, Sapru S, Majumdar S, Narang A, et al. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* by *hel* gene polymerase chain reaction. Appl Microbiol 2003; 37: 190-5.
3. Cart WK, Reilly S, White D, Stuart J. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. Br Med J 1992; 18: 143-7.
4. Gridley DS. *Haemophilus*. In: Shimeld LA, Rodgers AT, eds. Essentials of diagnostic microbiology. 2nd ed. Albany: Delmar Publishers; 1999: 159-71.
5. LaClaire LL, Tondella MLC, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsular typing. J Clin Microbiol 2003; 41: 393-6.
6. Caugant DA, Hoiby EA, Froholm LO, Brandtzaeg P. Polymerase chain reaction for case ascertainment of meningococcal meningitis: application to the cerebrospinal fluids collected in the course of the Norwegian meningococcal serogroup B protection trial. Scand J Infect Dis 1996; 28: 149-53.
7. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990; 322: 178-83.
8. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the *16S*rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1994; 32: 335-51.
9. Jordan JA. Identification of human parvovirus B19 infection in idiopathic non immune hydrops fetalis. Am J Obstet Gynecol 1996; 174: 37-42.
10. Abdeldaim GM, Stralin K, Kirsebom LA, Olcen P, Blomberg J, Herrmann B. Detection of *Haemophilus influenzae* in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64: 366-73.
11. Stralin K, Backman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. APMIS 2005; 113: 99-111.
12. van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol 1990; 33: 271-6.

13. Ishiwada N, Cao LD, Kohno Y. PCR-based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 895-8.
14. Kilian M. *Haemophilus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM; 2007: 636-48.
15. Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Kobayashi I, Fujihara K, et al. Rapid identification of nontypeable and serotype b *Haemophilus influenzae* from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2007; 71: 269-74.
16. Kilian M. *Haemophilus*. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP, eds. Manual of Clinical Microbiology. 3rd ed. Washington DC: ASM; 1980: 330-6.
17. Lund ME, Blazevec DJ. Rapid speciation of *Haemophilus* with the porphyrin production test versus the satellite test for X. J Clin Microbiol 1977; 5: 142-4.
18. Munson E, Pfaller M, Koontz F, Doern G. Comparison of porphyrin-based, growth factor based, and biochemical-based testing methods for identification of *Haemophilus influenzae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 196-203.
19. Jbara I, Baysallar M, Kilic A, Yetiser S, Unay B, Acikel C, et al. Comparison of culture and polymerase chain reaction methods for the detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in cerebrospinal fluids and middle ear effusions. Mikrobiyol Bul 2007; 41: 495-502.