วิธีมาตรฐานการปฏิบัติงาน

Standard Operating Procedure (SOP)

การวินิจฉัยเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ด้วยเทคนิค Latex Agglutination

รวบรวมโดย:

นางวรรณพร วุฒิเอกอนันต์, ดร. นริศรา จันทราทิตย์,

นพ. เดวิด ดานซ์, ดร. นพ. ดิเรก ลิ้มมธุรสกุล, ศ. ดร. ชารอน พีค๊อก

ในนามของ

คณะกรรมการดำเนินการ www.melioidosis.info

1. ความเป็นมา

เชื้อเมลิออยด์เป็นเชื้อก่อโรคเมลิออยด์ ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญที่สุดเป็นอันดับสามในประเทศไทย เป็นรองแค่เพียงโรคเอดส์และโรควัณโรคเท่านั้น [1] แต่การวินิจฉัยเชื้อเมลิออยด์จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกนั้นต้องใช้ความชำนาญสูง เชื้อเมลิออยด์อาจจะถูกมองข้ามหรือถูกละเลยว่าเป็นเชื้ออื่นหรือเชื้อปนเปื้อนได้ ถ้าผู้ตรวจไม่มีความชำนาญเพียงพอ [2] อีกทั้งการวินิจฉัยยืนยันเชื้อเมลิออยด์ก็ต้องการความพร้อมของอุปกรณ์และเครื่องมืออย่างมาก อีกทั้งการวินิจฉัยด้วยเครื่องมือมาตรฐาน เช่น API20NE หรือเครื่องวินิจฉัยแบคทีเรียแบบอัตโนมัติก็อาจให้ผลการวินิจฉัยเชื้อเมลิออยด์ที่ผิดพลาดได้ [3,4]

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก

3. การนำไปใช้ประโยชน์

เชื้อ Gram-negative bacillus ที่ให้ผลการทดสอบ oxidase เป็นบวก และไม่ใช่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก (รวมไปถึงเลือด, เสมหะ, ปัสสาวะ, หนอง และสารคัดหลั่งต่างๆที่เก็บมาจากอวัยวะภายในที่ปลอดจากเชื้อ) ควรจะใช้การคัดกรองโดยวิธี latex agglutination, โดยเฉพาะถ้าพบว่าเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides และ colistin หรือ polymyxin แต่ไวต่อยา co-amoxiclav ทั้งนี้เพราะการพบเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกมาได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกแม้เพียงแค่โคโลนีเดียว (รวมไปถึงในปัสสาวะ) ก็ช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรคเมลิออยด์

ลักษณะโคโลนีโดยทั่วไปของ *B. pseudomallei* จะมีสีครีม มันเงาและอาจจะแห้งและย่นเมื่อบ่มเพาะไว้บน blood agar มากกว่า 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามลักษณะที่มองเห็นอาจมีได้หลายลักษณะ และอาจถูกมองข้ามว่าเป็นเชื้อปนเปื้อน ลักษณะของเชื้อ *B. pseudomallei* บน MacConkey agar จะมีลักษณะขาวขุ่น มันเงา (non-lactose fermenter) และจะเป็นสีชมพู เหี่ยวย่นภายหลัง 48 ชั่วโมง

หลังจากที่แยกเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ออกไปแล้วห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาส่วนใหญ่มักจะวินิจฉัยเชื้อที่ให้ผล oxidase-positive Gram-negative bacteria เป็น '*Pseudomonas* spp.', และมักพิจารณาให้เป็นเชื้อปนเปื้อน **ในภูมิภาคเขตร้อนที่มีฝนตกชุก และโดยเฉพาะประเทศที่พบโรคเมลิออยด์ หรือสงสัยว่าอาจจะพบได้ (ตารางที่ 1) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในประเทศไทย เราแนะนำให้นำเชื้อ '*Pseudomonas* spp.' ที่แยกได้จากการเพาะเชื้อในเลือดควรทำการทดสอบด้วยชุดตรวจ latex agglutination เพื่อแยก *B. pseudomallei* ออกจากเชื้อชนิดอื่น**

Latex agglutination ยังอาจจะใช้เพื่อการคัดกรองโคโลนีของเชื้อที่สงสัยที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เดินทางมาจากพื้นที่เหล่านั้น และจากผู้ป่วยในภูมิภาคอื่นๆที่สงสัยโรคเมลิออยด์อีกด้วย

ตารางที่1 รายชื่อประเทศที่พบหรือสงสัยว่าจะพบโรคเมลิออย [5]

ทวีป	ประเทศ
แอฟริกา	บูกินา ฟาโซ, ชาด, แกมเบีย, เคนย่า, มาดาร์กัสการ์, ไนเจอร์, ไนจีเรีย, เซียร่า ลีโอนส์, แอฟริกาใต้ และอูกันด้า
เอเชีย	บังคลาเทศ, บรูไน, พม่า, กัมพูชา, จีนตอนใต้, อียิปต์, ฮ่องกง, อินเดีย, อินโดนิเซีย, อิหร่าน, ญี่ปุ่น, ลาว, มาเลเซีย, ปากีสถาน, ฟิลิปปินส์, ซาอุดิอาระเบีย, สิงค์โปร์, ศรีลังกา ,ไต้หวัน, ไทย และเวียตนาม
ยุโรป	ตุรกี
อเมริกากลาง	คอสตาริกา, เอล ซัลวาดอร์, เมกซิโก และปานามา
โอเซียเนีย	ออสเตรเลีย, ฟีจิ และปาปัวนิวกินี
อเมริกาใต้	บราซิล, โคลัมเบีย, เอลควาดอร์, ฮอนดูรัส, เปรู, เปอร์โตริโก และเวเนซูเอล่า
อื่นๆ	อารูบา,ไอวอรี โคสต์, กวาเดอลูป, กวม, เฮติ, เมอริตัส, มาร์ทินีค และนิวเซเลโดเนีย

4. การทดสอบ Latex agglutination

Latex agglutination เป็นการตรวจคัดกรองเพื่อวินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei* โดยใช้ monoclonal antibodies ขนาด 200-kDa ซึ่งจำเพาะต่อ exopolysaccharide ของ *B. pseudomallei* เคลือบบนพื้นผิวของอนุภาค Latex [6]. Latex agglutination เป็นวิธีการชนิดหนึ่งที่ใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งควรใช้ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอื่นด้วย โดยเฉพาะผู้ใช้ที่ไม่มีประสบการณ์ ผู้ที่สนใจที่จะได้ชุดตรวจ Latex agglutination สามารถติดต่อได้ที่ คุณวรรณพร วุฒิเอกอนันต์ ที่ Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit (lek@tropmedres.ac) หรือ ดร.สุรศักดิ์ ที่ Melioidosis Research Center (sura_wng@kku.ac.th).

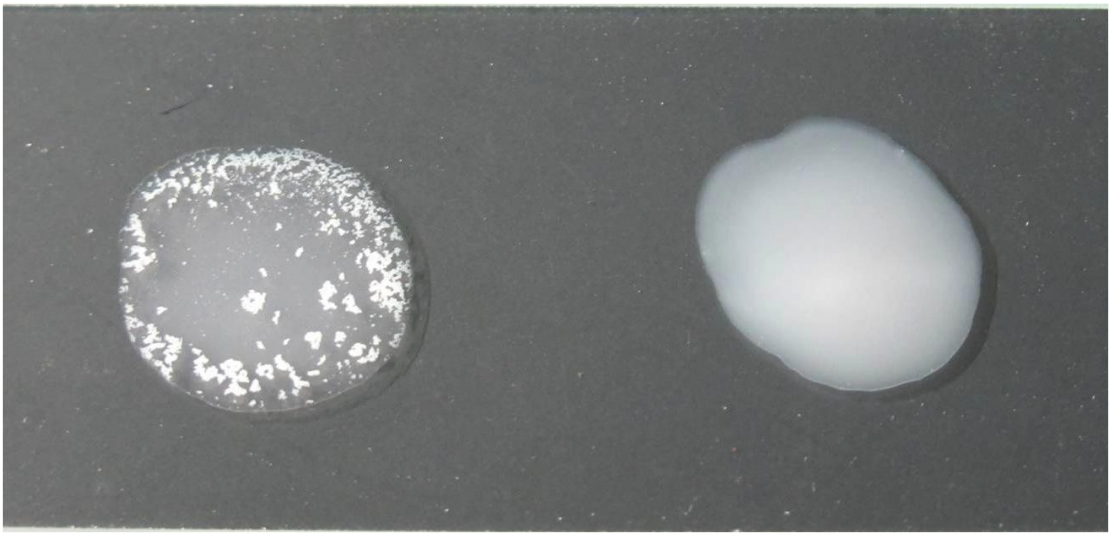
5. วิธีการ

5.1 หยดน้ำยา latex 5-10 ul บนแผ่นสไลด์แก้วโดยใช้แผ่นสีดำรองพื้น แล้วใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเอาโคโลนีที่สงสัยโดยใช้ไม้คนเชื้อให้ผสมกับน้ำยา

5.2 พลิกสไลด์กลับไปกลับมาเพื่อให้ส่วนผสมของน้ำยาและเชื้อเข้ากันประมาณ 2 นาที

5.3 ผลบวกจะเห็นการตกตะกอนเป็นเม็ดละเอียดและน้ำยาสีขาวขุ่นเปลี่ยนเป็นใสขึ้น ผลลบจะไม่เห็นการตกตะกอนและน้ำยายังคงสีขาวขุ่น

5.4 ในการทดสอบควรทำการทดสอบโดยใช้ positive control และ negative control ที่ให้มาพร้อมน้ำยา (Figure 1), หรือด้วยเชื้อ positive (เช่น *B. pseudomallei* NR 8071 – ดูรายละเอียดเพิ่มเติมที่ http://www.beiresources.org) และเชื้อ negative (เช่น *B. thailandensis* ATCC 700388) เป็นเชื้อควบคุมตามที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 1: Positive latex agglutination test (ซ้าย) หลังจากผสมน้ำยา latex 10 µl ด้วยน้ำยา positive control 10 µl ที่ให้มา และ negative latex agglutination test (ขวา) หลังจากผสมน้ำยา latex 10 µl ด้วยน้ำยา negative control 10 µl ที่ให้มา

6 ความแม่นยำของชุดตรวจในการใช้วินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei*

เชื้อ Gram-negative bacillus ที่ให้ผล oxidase-positive ที่มีลักษณะโคโลนีปรากฏคล้าย *B. pseudomallei* และ การทดสอบ latex agglutination ให้ผลบวก สามารถสันนิษฐานได้ว่าน่าจะเป็น *B. pseudomallei* อย่างไรก็ตามเชื้อบางตัวก็อาจให้ผลบวกปลอมได้เช่น เชื้อ *B. mallei* [7] และเชื้อ *B. cepacia* complex (Bcc) บางสายพันธ์ รูปแบบของความไวต่อยาปฏิชีวนะสามารถช่วยแบ่งแยกเชื้อ *B. pseudomallei* จากเชื้ออื่นๆได้โดยเชื้อ *B. pseudomallei* โดยปกติจะดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides และ colistin หรือ polymyxin แต่ไวต่อยา co-amoxiclav เป็นลักษณะที่ไม่ค่อยพบในเชื้ออื่นๆ ในการทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) เชื้อ *B. pseudomallei* อาจจะให้ผลได้ทั้ง ‘ไม่มีการเปลี่ยนแปลง’ หรือ ‘เกิด oxidation เล็กน้อย’ โอกาสที่จะเกิดผลบวกปลอมโดยวิธี latex agglutination จึงต่ำมาก <u>เราแนะนำว่าถ้าพบเชื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นครั้งแรกในประเทศหรือภูมิภาคที่อ้างอิงไว้ ควรจะส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการระดับชาติ หรือนานาชาติเพื่อวินิจฉัยยืนยัน</u>

มีการทดสอบหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้วินิจฉัยยืนยันเชื้อ *B. Pseudomallei* รวมไปถึงชุดทดสอบทางชีวเคมีแบบสำเร็จรูปเช่น API 20NE หรือการทดสอบเพื่อวินิจฉัยด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล ขึ้นกับวิธีที่มีใช้ในพื้นที่นั้นๆ ซึ่งวิธีเหล่านั้นอธิบายรายละเอียดเพิ่มเติมในคู่มือการใช้งานนั้นๆ

โปรดทราบว่าโดยปกติชุดทดสอบ API 20 NE (หรืออาจเรียกว่า 20 NFT) (BioMerieux, Durham, N.C.), จะให้เลขรหัสของเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นหมายเลข 1156577, 1556577 หรือ 1156576. แต่บางครั้งเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* อาจถูกวินิจฉัยผิดเป็นเชื้อ *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, หรือ *Chromobacterium violaceum*.

7. การพิจารณาด้านความปลอดภัย

การปฏิบัติงานทุกขั้นตอนควรจะปฏิบัติตามกฎความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการนั้นๆ และข้อบังคับระดับชาติ และควรจะมีการประเมินความเสี่ยงในห้องปฏิบัติการนั้น โดยปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติที่มีใช้อยู่

7.1 การตรวจสอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเชื้ออยู่ และการจัดการเกี่ยวกับเชื้อทางจุลชีววิทยาควรจะดำเนินการในตู้ปลอดเชื้อ biosafety cabinet (Class I หรือ II).

7.2 เมื่อสงสัยว่าพบเชื้อ *B. pseudomallei* ถ้าเป็นไปได้การปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการที่เหลือทั้งหมดควรจะดำเนินการใน biosafety level 3 (BSL3)

7.3 เชื้อที่ได้รับการวินิจฉัยสันนิษฐานว่าเป็น *B. pseudomallei* เป็นครั้งแรกในประเทศหรือภูมิภาคที่อ้างอิงไว้ ควรจะส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการระดับชาติ หรือนานาชาติเพื่อวินิจฉัยยืนยัน และเพิ่มเติมกรุณาติดต่อ ดร.ดิเรก ลิ้มมธุรสสกุล (direk@tropmedres.ac) ในนามของคณะกรรมการ www.melioidosis.info ซึ่งจะรายงานการตรวจพบบนเวบไซท์เมื่อได้รับการยืนยันจากผู้ตรวจสอบในพื้นที่ หรือหลังจากการตีพิมพ์ของรายงานผลการทดสอบที่เกี่ยวข้อง

8. เอกสารอ้างอิง:

1. Currie BJ, Dance DA, Cheng AC (2008) The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. Trans R Soc Trop Med Hyg 102 Suppl 1: S1-4.
2. John TJ, Jesudason MV, Lalitha MK, Ganesh A, Mohandas V, et al. (1996) Melioidosis In India: the tip of the iceberg? Indian J Med Res 103: 62-65.
3. Weissert C, Dollenmaier G, Rafeiner P, Riehm J, Schultze D (2009) *Burkholderia pseudomallei* misidentified by automated system. Emerg Infect Dis 15: 1799-1801.
4. Deepak RN, Crawley B, Phang E (2008) *Burkholderia pseudomallei* identification: a comparison between the API 20NE and VITEK2GN systems. Trans R Soc Trop Med Hyg 102 Suppl 1: S42-44.
5. Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, et al. (2012) Fool's gold: why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics. A re-evaluation of five diagnostic tests for leptospirosis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.
6. Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V, Aramsri P, Panichakul T, et al. (2000) Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia. J Med Microbiol 49: 1075-1078.
7. Anuntagool N, Sirisinha S (2002) Antigenic relatedness between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Microbiology and immunology 46: 143-150.