A Preliminary Study of The Real Time PCR Method for *Streptococcus suis* Detection in Clinical Blood Samples

Jate Wantang[1*], Wittaya Wangsomboonsiri[2] and Warangkana Oncoung[1]

[1]*Regional Medical Sciences Center 3 Nakhonsawan, Nakhonsawan Province*
[2]*Sawanpracharak Hospitals, Nakhonsawan Province*

Abstract

Streptococcus suis (S. suis) **infection is a zoonosis causing septicemia, meningitis, endocarditis and Streptococcal toxic shock syndrome. Most patients are infected by eating raw contaminated pork or pork-derived products. The severe cases of *S. suis* infection may develop rapid disease progression with short incubation time and cause death within 24-48 hours. To overcome the serious infection, a better and rapid diagnostic method with high accuracy is needed. Optimized real time PCR assay has been developed for detection of *S. suis* in human blood samples. This study aimed as a preliminary study to compare the recently developed method to the standard bacterial culture method using sixty-seven clinical blood samples from septicemia patients in Sawanpracharak Hospital, Nakhonsawan Province, between August 2012 and October 2013. The results showed that from the total of 67 samples, 8 (11.9%) were positive by real-time PCR, while 5 (7.5%) were positive by culture method. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values as well as accuracy of both methods were analyzed. The values for real-time PCR were 80, 100, 100, 96.61 and 97.01% respectively, while those of the bacterial culture method were 50, 100, 100, 91.94 and 92.54% respectively. The results indicated that the real-time PCR method is 30% more sensitive than the bacterial culture method for detection of *S. suis* in human blood samples.**

Key words: *Streptococcus suis*, Real-time PCR, Culture method

***Corresponding author** E-mail address: jatew@hotmail.com

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อสเตร็พโตค็อกคัส ซูอิส ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

เจตน์ วันแต่ง[1*] วิทยา หวังสมบูรณ์ศิริ[2] และ วรางคณา อ่อนทรวง[1]

[1]ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์
[2]โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อ *Streptococcus suis (S. suis)* เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ผู้ป่วยอาจมีอาการรุนแรงถึงชีวิต การตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องและรวดเร็วอาจช่วยลดอัตราการเสียชีวิต และภาวะแทรกซ้อนได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพวิธีตรวจวินิจฉัย *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยกลุ่มอาการติดเชื้อในกระแสเลือด หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าอาจติดเชื้อ *S. suis* และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 67 ตัวอย่าง ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* พบการตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง (11.9%) วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลบวก 5 ตัวอย่าง (7.5%) การประเมินความไว ความจำเพาะ การทำนายผลบวก การทำนายผลลบ และความถูกต้องของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ให้ค่าผลการประเมินเท่ากับ 80, 100, 100, 96.61 และ 97.01% ตามลำดับ ขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลการประเมินเท่ากับ 50, 100, 100, 91.94 และ 92.54% ตามลำดับ พบว่าวิธีทดสอบด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ มีค่าความไวสูงกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ 30%

คำรหัส: สเตร็พโตค็อกคัส ซูอิส เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

***ผู้รับผิดชอบบทความ** E-mail address: jatew@hotmail.com

บทนำ

สเตร็พโตค็อกคัส ซูอิส *(Streptococcus suis, S. suis)* เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นคู่หรือต่อเป็นสาย[1] เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อรุนแรงทั้งในหมู และมนุษย์ โดยผู้ติดเชื้ออาจมีอาการรุนแรงถึงชีวิต หรือหากรอดชีวิตอาจสูญเสียการได้ยิน จนถึงขั้นหูหนวกถาวรได้[2] โรคติดเชื้อ *S. suis* จัดเป็นกลุ่มโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อครั้งแรกที่ประเทศเดนมาร์ก เมื่อปี 1968[3] จากนั้นมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้ออีกหลายประเทศ ทั้งในยุโรป อเมริกาเหนือ ออสเตรเลีย และเอเชีย[4,5] ในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี 1987[6] ส่วนใหญ่พบรายงานการติดเชื้อในเขตภาคเหนือของประเทศ ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากการรับประทานเนื้อหมู เลือดหมู หรือส่วนประกอบของหมูที่ปรุงไม่สุก เช่น ลาบหมูดิบ หลู้เลือด เป็นต้น[7] ระยะฟักตัวของโรคใช้เวลาตั้งแต่ไม่กี่ชั่วโมงถึง 3 วัน ขึ้นกับปริมาณของเชื้อที่ได้รับและทางเข้าของเชื้อ ตลอดจนภาวะสุขภาพของผู้ป่วย โดย 85% ของผู้ป่วยมีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปวดข้อ นำมาก่อน 1-2 วัน และ 54-80% ของผู้ป่วยสูญเสียการได้ยินถึงขั้นหูหนวกถาวรภายใน 24 ชั่วโมง ในรายที่มีอาการรุนแรงถึงชีวิต มักมีสาเหตุจากการติดเชื้อในกระแสเลือดทำให้เกิดภาวะช็อก (septic shock)[8] ในประเทศไทยพบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* รายแรกตั้งแต่ปี 1987 และมีรายงานเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน โดยเชื้อ *S. suis* ที่พบเป็น serotype 1, 2, 1/2, 7, 9, และ 14

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* สามารถทำได้โดยการเพาะเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานจากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ น้ำไขสันหลัง เลือด หรือน้ำจากข้อ และแยกชนิดของเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งเชื้อ *S. suis* ส่วนใหญ่ให้ลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-hemolysis บน sheep blood agar[1] แต่อาจไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง หรืออาจรายงานผิดพลาดเป็นเชื้อ *Streptococcus* species, *Streptococcus pneumonia* หรือ *Streptococcus viridans*[9] เนื่องจากการแยกชนิดของเชื้อให้ถูกต้องจำเป็นต้องใช้การทดสอบทางชีวเคมีชนิดพิเศษ[10] หรือชุดทดสอบสำเร็จรูปนอกเหนือจากที่ใช้ทดสอบในงานประจำ ซึ่งห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ไม่มีความพร้อมจึงไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อ *S. suis* ได้ และมีความจำเป็นต้องส่งต่อตัวอย่างเพื่อตรวจยืนยัน ณ ห้องปฏิบัติการอื่น ทำให้ต้องใช้เวลานาน 2-3 วันจึงจะทราบผลการตรวจวิเคราะห์ และกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพก่อนการเก็บตัวอย่าง การเพาะเชื้อเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. suis* อาจให้ผลลบลวงได้ เนื่องจากเชื้ออาจไม่มีชีวิตแล้ว แต่เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) หรือ real-time PCR ที่อาศัยหลักการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียจะมีความได้เปรียบในการตรวจวินิจฉัยกว่า คือ สามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งในกรณีที่เชื้อแบคทีเรียมีและไม่มีชีวิต

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ได้มีการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์การติดเชื้อ การศึกษาระบาดวิทยาในหมู และการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกในมนุษย์ เช่น Hilde E. Smith และคณะ พัฒนาเทคนิค conventional PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 1, 2 และ 9 strains ในตัวอย่างทอนซิลของหมู[11] Yang และคณะพัฒนาเทคนิค TaqMan real-time quantitative PCR ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. suis* serotype 2 เท่ากับ 100% และมีความไวเท่ากับ 10 copies/μL สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* serotype 2 เพื่อใช้ศึกษาปริมาณเชื้อในเลือดของหมูทดลอง[12] เป็นต้น ผู้วิจัยได้ศึกษาและพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สำหรับใช้ตรวจติดตามเชื้อ *S. suis* โดยตรงในตัวอย่างเลือดมนุษย์

เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีมาตรฐาน ทำให้สามารถทราบผลการตรวจวิเคราะห์ได้ภายในเวลาเพียง 4 ชั่วโมง โดยได้ออกแบบไพร์เมอร์และโพรบ ให้มีความจำเพาะต่อยีน NAD (P) H-dependent glutamate dehydrogenase *(gdh)* ของเชื้อ *S. suis* ทุกสายพันธุ์ (ผลงานยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่) ซึ่งก่อนหน้านี้ Yang และคณะใช้ยีนนี้ในการออกแบบไพร์เมอร์สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. suis* ด้วยเช่นกัน[12] ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่าวิธีการวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. suis* 100% โดยมีความไวหรือปริมาณเชื้อ *S. suis* น้อยที่สุดที่ตรวจพบในเลือดคือ 20 cfu/mL (ผลงานยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยกลุ่มอาการติดเชื้อในกระแสเลือดหรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ เลขที่ 9/2555 โดยศึกษาจากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครผู้ป่วยกลุ่มอาการติดเชื้อในกระแสเลือด หรือได้รับการวินิจฉัยเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ ระหว่างเดือนสิงหาคม 2012 ถึง เดือนตุลาคม 2013 จำนวน 67 ราย

2. วัสดุอุปกรณ์

การศึกษานี้ใช้แบบส่งตัวอย่างตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ในการบันทึกข้อมูลของผู้ป่วยอาสาสมัคร ได้แก่ ข้อมูลทั่วไป ปัจจัยเสี่ยง และอาการทางคลินิก ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAamp® DNA Mini kit) ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. suis* จากเลือดผู้ป่วย ใช้เครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ใช้ชุดน้ำยาตรวจเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ซึ่งผู้วิจัยได้ออกแบบไพร์เมอร์และโพรบให้มีความจำเพาะต่อยีน *gdh* ของเชื้อ *S. suis* ทุกสายพันธุ์ ประกอบด้วย forward primer SS_F: GCACACCCAGAATACATC-GAAGAAA reverse primer SS_R: ATGGAA-CACGGAAGCTGATGAT และ probe SS_P: FAM-ACGCTCAGGCTCAACG-NFQ น้ำยา 2X TaqMan® Universal Master Mix ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *S. suis* ที่เจือจางใน Tryptic Soy Broth ให้ได้ความเข้มข้น 10^7 cfu/mL เป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพบวก และใช้เครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ยี่ห้อ ABI รุ่น 7500 และโปรแกรม SDS versions 3.1.3 ในการตรวจและวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดผู้ป่วย

วิธีการศึกษา

1. การเก็บข้อมูล และการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย

1.1 การเก็บข้อมูล และการเก็บตัวอย่าง เพื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

เจ้าหน้าที่พยาบาลเวชกรรมสังคม โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ ซักประวัติผู้ป่วยอาสา

สมัครเกี่ยวกับประวัติ และปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *S. suis* ตามแบบส่งตัวอย่างตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ จากนั้นเจ้าหน้าที่พยาบาลประจำห้องผู้ป่วยอายุรกรรมเจาะเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 2.5 mL ใส่ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA โดยใช้วิธีเจาะเก็บเลือดด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วส่งให้ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ˚C เพื่อรอนำส่งตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ โดยเจ้าหน้าที่จากศูนย์ฯเดินทางมารับตัวอย่างภายในวันที่ได้รับแจ้งจากห้องปฏิบัติการ และดำเนินการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ภายใน 7 วัน

1.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำส่งตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ณ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ของโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ โดยการเจาะเลือดด้วยวิธีปลอดเชื้อก่อนได้รับยาปฏิชีวนะ ในกรณีผู้ป่วย acute sepsis หรือ meningitis เป็นผู้ใหญ่ เจาะเลือด 2 ตำแหน่ง เพาะลงในขวด hemoculture ตำแหน่งละขวด (รวม 2 ขวด) ในกรณีผู้ป่วยเป็น subacute endocarditis หรือ continuous bacteremia เจาะเลือด 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เจาะ 2 ตำแหน่ง เพาะลงในขวด hemoculture 2 ขวด และเจาะครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรกไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง เพื่อเพาะลงขวด hemoculture ขวดที่ 3 จากนั้นดำเนินการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* วิธีมาตรฐานด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และทดสอบทางชีวเคมี ตามวิธีมาตรฐานการตรวจของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ทางห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

ดำเนินการโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เริ่มด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดปริมาตร 200 μL โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAamp® DNA Mini kit) ซึ่งจะได้สารสกัดดีเอ็นเอปริมาตร 50 μL วัดปริมาณสารสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer เพื่อควบคุมและยืนยันกระบวนการสกัดตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพ แล้วเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นเตรียมน้ำยาตรวจวิเคราะห์ตามรายละเอียดดังแสดงใน Table 1 เติมตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลอดน้ำยาแล้วนำหลอดตัวอย่างที่จะทดสอบใส่ลงในเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ รุ่น ABI 7500 โดยตั้งโปรแกรมดังแสดงใน Table 1 ขั้นตอนสุดท้ายคือการวิเคราะห์ผล และแปลผลการทดสอบด้วยโปรแกรม SDS versions 1.3.1 ของเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ เพื่อหาค่า Ct ของแต่ละตัวอย่าง โดยค่า Ct หรือ threshold cycle หมายถึงจำนวนรอบที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้สัญญาณ fluorescence สูงกว่า threshold ค่า Ct ที่ได้นี้เป็นค่าตัวเลขจำนวนรอบซึ่งหากพบสัญญาณก็แสดงว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวิเคราะห์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยค่า Ct ที่ได้จะแปรผันตามปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ คือ หากปริมาณดีเอ็นเอมาก สัญญาณ fluorescence ที่เกิดขึ้นก็จะเพิ่มสูงกว่า threshold เร็วทำให้ได้ค่า Ct ที่น้อย แต่หากมีประมาณดีเอ็นเอน้อย สัญญาณ fluorescence ที่เกิดขึ้นก็จะเพิ่มสูงกว่า threshold ช้าทำให้ได้ค่า Ct ที่มาก หรือหากไม่มีดีเอ็นเอที่ตรวจวิเคราะห์ก็จะไม่มีสัญญาณ fluorescence เกิดขึ้น เป็นต้น โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ให้ผล

Table 1 Configuration of real-time PCR master mix and setting on real time PCR machine model ABI 7500

Real-time PCR master mix				Setting on real time PCR machine			
Reagent	**Initial conc.**	**Final conc.**	**Volume in one reaction (µL)**	**Stage**	**Round**	**Temp. (°C)**	**Time (min: sec)**
Custom TaqMan® Gene Expression assays	20X	1X	1	Hold	1	50	02:00
-Forward primer	18 µM	900 nM		Hold	1	95	10:00
-Reverse primer	18 µM	900 nM		PCR	40X	95	00:15
-Probe	5 µM	250 nM				60**	01:00
TaqMan® Universal Master Mix	2X	1X	10	** Fluorescence data collection			
Sterile RNase-free water	N/A	N/A	5				
DNA template	N/A	N/A	4				
Total volume of real-time PCR master mix			20				

บวกต่อเชื้อ *S. suis* ต้องให้ค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 และหากค่า Ct มากกว่า 40 ถือว่าให้ผลลบต่อเชื้อ *S. suis*

2.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือด ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมีดำเนินการตามวิธีมาตรฐานการตรวจของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ ดังนี้ หลังจากบ่มขวด hemoculture ในเครื่องอัตโนมัติ จนพบสัญญาณเชื้อขึ้น จึงย้อมสีแกรมและ subculture ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน คือ sheep blood agar, chocolate agar และ Mc Conkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 ˚C ในบรรยากาศที่มี CO_2 5-7% เมื่อเชื้อขึ้นบน sheep blood agar และให้ผล alpha -hemolysis เป็นบวกจะแยกชนิดเชื้อ *S. suis* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep ของบริษัท Bio Merieux

3. เกณฑ์การวินิจฉัยผู้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ *S. suis*

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis* แพทย์ผู้รักษาจะใช้ข้อมูลประวัติผู้ป่วย อาการทางคลินิก และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการประกอบการวินิจฉัยโรค โดยเกณฑ์การวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ *S. suis* ประกอบด้วยประวัติการรับประทานอาหารที่ปรุงจากเนื้อหมู หรือเลือดหมูดิบ มีประวัติสัมผัสหมูมีชีวิต หรือ

เนื้อหมูดิบ เช่น ผู้เลี้ยง ผู้ชำแหละ ผู้จำหน่ายหรือผู้นำมาปรุงอาหาร มาพบแพทย์ด้วยอาการทางคลินิกกลุ่มอาการติดเชื้อในกระแสเลือดหรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการพบเชื้อ *S. suis* เป็นต้น

4. การประเมินผลวิธีการตรวจวิเคราะห์

นำผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ และการตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ เทียบกับผลการวินิจฉัยโรคของแพทย์ เพื่อศึกษาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบ จากนั้นเปรียบเทียบผลวิธีตรวจวิเคราะห์ระหว่างการตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ กับการตรวจด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การประเมินวิธีทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ค่าต่าง ๆ จากการทดสอบดังแสดงใน Table 2 เพื่อคำนวณหาค่าทางสถิติดังนี้

Table 2 Parameters of laboratory testing

Test outcome	Patients with *Streptococcus suis* infection		Total
	Positive	Negative	
Positive	True positive (TP)	False positive (FP)	TP+FP
Negative	False negative (FN)	True negative (TN)	TN+FN
Total	TP+FN	TN+FN	N

ความไว (sensitivity) ของวิธีทดสอบ หมายถึง ความสามารถของวิธีการทดสอบในการแยกบุคคลที่เป็นโรคได้ถูกต้อง (โอกาสที่ผู้เป็นโรค จะตรวจได้ผลบวก) มีสูตรดังนี้ sensitivity = (TP/(TP+FN)) x 100%

ความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบ หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบในการตรวจแยกบุคคลที่ไม่เป็นโรคได้ถูกต้อง (โอกาสที่ผู้ไม่เป็นโรคจะตรวจได้ผลลบ) มีสูตรดังนี้ specificity = (TN/(TN+FP)) x 100%

ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) หมายถึง ค่าทำนาย หรือโอกาสของบุคคลที่มีผลการทดสอบเป็นบวกจะเป็นโรค มีสูตรดังนี้ positive predictive value = (TP/(TP+FP)) x 100%

ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) หมายถึง ค่าทำนาย หรือโอกาสของบุคคลที่มีผลการทดสอบเป็นลบจะไม่เป็นโรค มีสูตรดังนี้ negative predictive value = (TN/(TN+FN)) x 100%

ความถูกต้องของวิธีทดสอบ (accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของการตรวจที่จะบอกจำนวนที่เป็นโรคเมื่อการทดสอบได้ผลบวก และไม่เป็นโรคเมื่อการทดสอบได้ผลลบ มีสูตรดังนี้ accuracy of test = ((TP+TN)/N) x 100%

ผลการวิจัย

1. รายละเอียดกลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยอาสาสมัครจำนวนทั้งสิ้น 67 ราย เป็นเพศชาย 42 ราย (62.7%) เพศหญิง 25 ราย

(37.3%) อายุเฉลี่ย 55.3 ปี แยกเป็น 3 กลุ่มอาชีพ ได้แก่ รับจ้าง 45 ราย (67.2%) เกษตรกร 8 ราย (11.9%) และไม่ประกอบอาชีพ (เกษียณ) 14 ราย (20.9%) มีประวัติรับประทานอาหารที่ปรุงจากเนื้อหมู หรือเลือดหมูดิบในช่วง 1-2 สัปดาห์ก่อนป่วย 20 ราย (29.85%) มีประวัติสัมผัสหมูมีชีวิต หรือเนื้อหมูดิบ (ผู้เลี้ยง ผู้ชำแหละ ผู้จำหน่าย หรือผู้นำมาปรุงอาหาร) 5 ราย (7.46%) และมีประวัติดื่มสุราเป็นประจำหรือบ่อย 40 ราย (59.7%) รายละเอียดดังแสดงใน Table 3

2. ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

ผลการตรวจวินิจฉัย พบว่าจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วย 67 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. suis* 8 ตัวอย่าง ให้ผลลบ 59 ตัวอย่าง ค่า Ct ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *S. suis* มีค่าต่ำสุดที่ Ct 33 ค่าสูงสุดที่ Ct 38 รายละเอียดดังแสดงใน Table 4 และ Fig. 1

3. ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียวิธีมาตรฐานด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยทั้ง 67 ตัวอย่าง ผลไม่พบเชื้อ 56 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. suis* 5 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ รวม 6 ตัวอย่าง จำแนกเป็น *Bacillus* spp. 1 ตัวอย่าง *E.coli* 3 ตัวอย่าง *Salmonella* Group C 1 ตัวอย่าง และ *Streptococcus* Group B 1 ตัวอย่าง

4. ผลการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ *S. suis*

จากข้อมูลประวัติผู้ป่วย อาการทางคลินิก ภาวะแทรกซ้อน และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ แพทย์สามารถยืนยันการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้ทั้งสิ้น 10 ราย โดยมีประวัติการรับประทานอาหารที่ปรุงจากเนื้อหมูหรือเลือดหมูดิบ และสัมผัสหมูมีชีวิตหรือเนื้อหมูดิบ รวม 7 ราย หลังการรักษา

Table 3 The profile of patients

Data	Male	Female	Total
Average age (years)	53.5	58.8	55.3
Occupation			
- Employee	31	14	45
- Farmers	5	3	8
- Unemployed (retired)	6	8	14
Risk			
- Eating meat or raw pig blood	13	7	20
- Touching live pigs or raw pork	5	0	5
- Drinking alcohol regularly	34	6	40
Total	**42**	**25**	**67**

Table 4 The information of *Streptococcus suis* infection patients

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10
Sex	**Male**	**Male**	**Male**	**Male**	**Male**	**Male**	**Male**	**Male**	**Female**	**Male**
Age (years)	72	51	51	46	85	52	57	39	81	54
Occupation	retired	Employee	Farmer	Employee	Employee	Employee	Employee	Employee	farmer	farmer
Risk	Drinking alcohol regularly	Eating meat or raw pig blood	Eating meat or raw pig blood Drinking alcohol regularly	Eating meat or raw pig blood Drinking alcohol regularly	Drinking alcohol regularly	Drinking alcohol regularly	Eating meat or raw pig blood Drinking alcohol regularly	Touching live pigs or raw pork Drinking alcohol regularly	Eating meat or raw pig blood	Eating meat or raw pig blood Drinking alcohol regularly
Main diseases	*S. suis* meningitis	*S. suis* meningitis	N/A	Meningitis (R/O *S.suis* miningitis)	Infected bronchiectasis	Bacterial meningitis	*S. suis* meningitis	N/A	Infectious endocarditis	*S. suis* meningitis
Complications	Hearing loss	*S. suis* septicemia	Hearing loss	Hearing impaired	Septic shock	Cellulitis at back Hearing loss	Hearing loss	N/A	*S. suis* septicemia	Hearing loss
Treatment	Ceftriaxone 2 gm	Ceftriaxone 2 gm	N/A	Ceftriaxone 2 gm	Ceftriaxone 2 gm	Ceftriaxone 2 gm	Ceftriaxone 2 gm	N/A	ceftriaxone 2 gm	ceftriaxone 2 gm
Discharge conditions	Improved symptoms	Improved symptoms	N/A	Improved symptoms	Improved symptoms	Improved symptoms	Improved symptoms	N/A	Died	Improved symptoms
Hemoculture	*S. suis*	*S. suis*	*S. suis*	No growth	No growth	No growth	No growth	No growth	*Sreptococcus* (alpha-hemolytic) *Acinetobacter lwoffii*	*S. suis*
Real-time PCR	Positive (Ct 37)	Positive (Ct 35)	Positive (Ct 34)	Positive (Ct 38)	Positive (Ct 33)	Positive (Ct 36)	Positive (Ct 38)	Positive (Ct 37)	Negative	Negative

N/A: not available

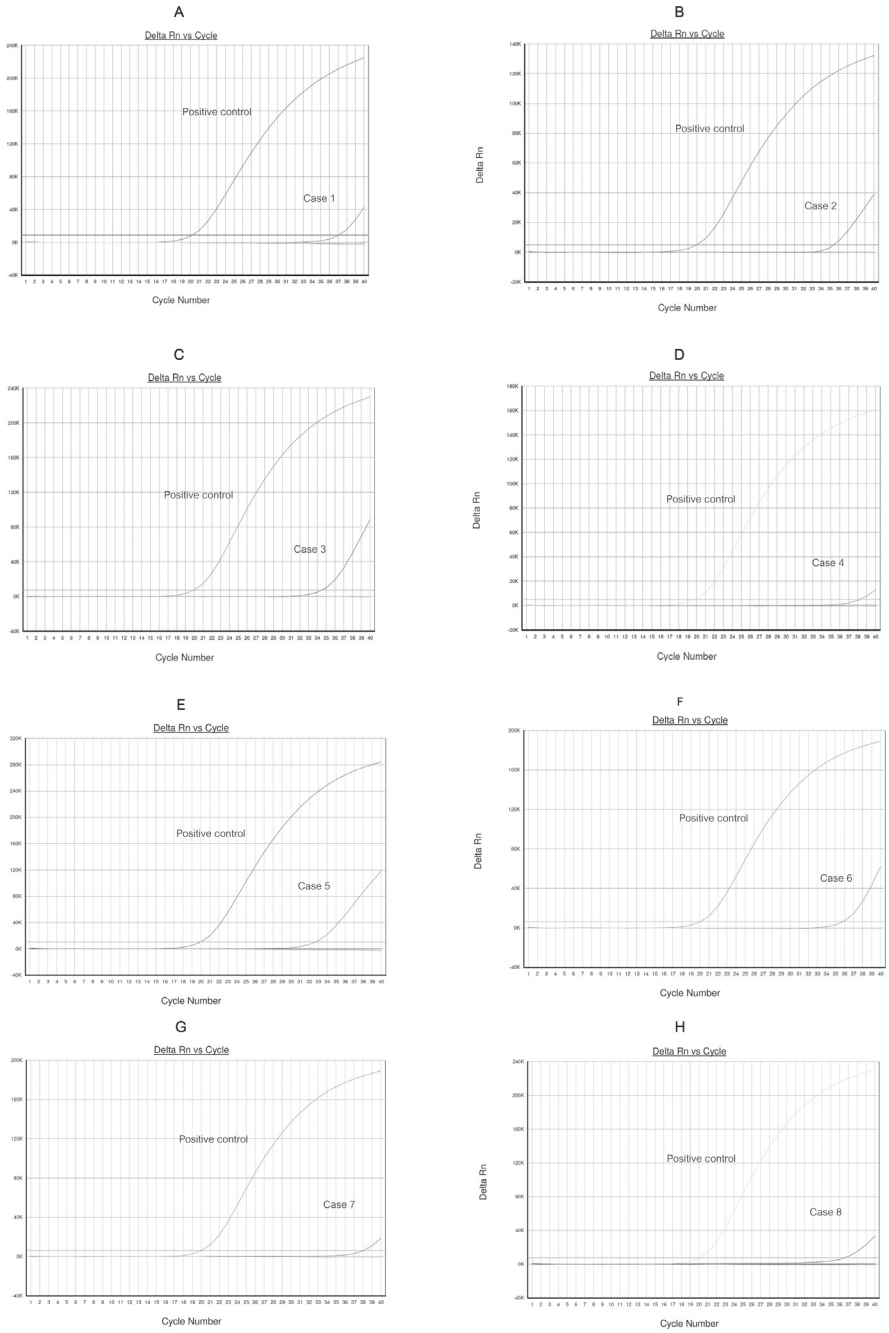

Fig.1 Amplification curve of *S.suis*-positive samples by the real time PCR technique. Blood samples were collected from patients with suspected infection of *S.suis* and analyzed by the real time PCR techniques. The results showed that 8 (11.9%) samples from the total of 67 samples were positive for *S.suis* by real-time PCR. For the positive controls, DNA samples were extracted from *S. suis* (10^7 cfu/mL) and included in each run of the real time PCR. A-H: amplification curve of case 1-8 showing threshold cycle at 37; 35, 34, 38, 33, 36, 38 and 37, respectively.

พบภาวะแทรกซ้อนสูญเสียการได้ยิน 6 ราย และเสียชีวิต 1 ราย รายละเอียดดังแสดงใน Table 4

5. ผลการประเมินวิธีการตรวจวิเคราะห์

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 67 ราย ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ สามารถตรวจวินิจฉัยให้ผลบวกในผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้ทั้งสิ้น 8 ราย ให้ผลลบในผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้ทั้งสิ้น 57 ราย เมื่อประเมินประสิทธิภาพวิธีการตรวจวิเคราะห์ พบว่าได้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และความถูกต้องของวิธีทดสอบเท่ากับ 80, 100, 100, 96.91 และ 97.01% ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงใน Table 5

Table 5 The results of real time PCR method for *Streptococcus suis* detection

Result of real time PCR method	*Streptococcus suis* infection		Total
	Positive (diseased)	Negative (healthy)	
Positive	8	0	8
Negative	2	57	59
Total	10	57	67

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียวิธีมาตรฐานด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมีในตัวอย่างจากผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 67 ราย สามารถตรวจวินิจฉัยพบเชื้อ *S. suis* ในผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้ทั้งสิ้น 5 ราย ให้ผลไม่พบเชื้อหรือพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นในผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้ทั้งสิ้น 57 ราย เมื่อประเมินประสิทธิภาพวิธีการตรวจวิเคราะห์ พบว่าได้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบ เท่ากับ 50, 100, 100, 91.94 และ 92.54% ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงใน Table 6

Table 6 The results of bacteria culture method for *Streptococcus suis* detection

Result of bacterial culture method	*Streptococcus suis* infection		Total
	Positive (diseased)	Negative (healthy)	
Positive	5	0	5
Negative	5	57	62
Total	10	57	67

ผลการประเมินประสิทธิภาพวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างเลือด ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียวิธีมาตรฐานด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าความจำเพาะและค่าทำนายผลบวกเท่ากันที่ 100% ขณะที่เทคนิค

เรียลไทม์พีซีอาร์ให้ค่าความไว ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบที่สูงกว่า รายละเอียดดังแสดงใน Table 7

Table 7 Evaluation of methods for *Streptococcus suis* detection in clinical blood samples

Comparison of method for *Streptococcus suis* detection in clinical blood samples	Real time PCR method (%)	Bacteria culture method (%)
Sensitivity	80	50
Specificity	100	100
Positive predictive value	100	100
Negative predictive value	96.61	91.94
Accuracy of test	97.01	92.54

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ ระหว่างเดือนสิงหาคม 2012 ถึงเดือนตุลาคม 2013 รวม 67 ราย เมื่อใช้ข้อมูลประวัติผู้ป่วย ปัจจัยเสี่ยง อาการทางคลินิก และข้อมูลผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ทั้งการเพาะเลี้ยงเชื้อและการตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ผลการวินิจฉัยพบผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *S. suis* รวม 10 ราย

เมื่อพิจารณาผลตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง ขณะที่วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลตรวจพบเชื้อ *S. suis* เพียง 5 ตัวอย่าง เมื่อประเมินประสิทธิภาพการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีพบว่า การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ให้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบเท่ากับ 80, 100, 100, 96.61 และ 97.01% ตามลำดับ ส่วนการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้องของวิธีทดสอบ เท่ากับ 50, 100, 100, 91.94 และ 92.54% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าค่าความไว หรือความสามารถของวิธีการทดสอบในการแยกบุคคลที่เป็นโรคได้ถูกต้องจากกลุ่มที่ทราบแน่นอนว่าเป็นโรค โดยวิธีทดสอบด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ให้ค่าความไว สูงกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ 30%

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* โดยการใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลตรวจที่มีส่วนสอดคล้องกัน คือทั้งสองวิธีให้ผลบวกกับผู้ป่วยติดเชื้อ 4 ราย แต่มีส่วนที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน 6 ราย แยกเป็นให้ผลบวกด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ 4 ราย และให้ผลลบด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ แต่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ราย โดย 2 รายที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นการพบเชื้อ *S. suis* 1 ราย และอีก 1 รายพบเชื้อ *Sreptococcus* (alpha-hemolytic) ร่วมกับเชื้อ *Acinetobacter lwoffii* โดยรายนี้แพทย์ได้รายงานว่าพบภาวะแทรกซ้อนของการติดเชื้อ *S. suis* ในกระแสเลือด เมื่อพิจารณากรณีให้ผลบวกด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

เป็นไปได้ว่าการตรวจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งเป็นการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อ กรณีที่เชื้อมีปริมาณน้อย หรือเชื้อไม่มีชีวิตแต่ยังคงมีปริมาณสารพันธุกรรมอยู่มากพอก็สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อได้ ขณะที่การเพาะเชื้ออาจไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากเชื้ออาจตายจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วย เป็นต้น

ส่วนกรณีที่เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ให้ผลลบแต่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ อาจเกิดจากความแตกต่างในกระบวนการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อมีการเก็บตัวอย่างส่งตรวจมากกว่า 1 ครั้ง และคนละตำแหน่ง ตามแนวทางการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อในผู้ป่วย acute sepsis หรือ meningitis และในผู้ป่วยที่เป็น subacute endocarditis หรือ continuous bacteremia หรือตามคำแนะนำของแพทย์ผู้รักษา ขณะที่การเจาะเลือดเพื่อส่งตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในการศึกษาครั้งนี้มีการเจาะเก็บเลือดเพียงครั้งเดียว ซึ่งทำให้การตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ มีโอกาสพบเชื้อได้มากกว่าการตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

ข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือ ตัวอย่างผู้ป่วยมีจำนวนน้อย จึงควรเพิ่มขนาดกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งต่อไปให้มากขึ้น รวมทั้งยังขาดข้อมูลวันที่เวลา และจำนวนครั้งของการเก็บตัวอย่างเลือดใส่ในขวด hemoculture เพื่อนำไปเพาะเชื้อ ทำให้ไม่ทราบแน่ชัดว่าขวดที่ตรวจพบเชื้อ *S. suis* ด้วยวิธีการเพาะเชื้อมีความสอดคล้องกับตัวอย่างที่เก็บเพื่อส่งตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์อย่างไร สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* โดยตรงจากเลือดผู้ป่วยด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ควรตรวจเป็นระยะ ๆ มากกว่า 1 ครั้ง เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดได้มากขึ้น รวมทั้งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ เป็นผลบวกจริงโดยการหาลำดับเบสเพื่อยืนยันต่อไป นอกจากนี้ควรนำการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ไปประยุกต์ใช้ตรวจตัวอย่างจากแหล่งที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้ออื่น ๆ เช่น เลือดหมู เนื้อหมู เป็นต้น เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสในการป้องกัน และควบคุมโรคติดเชื้อ *S. suis* ได้มากยิ่งขึ้น

สรุป

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. suis* ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้งยังลดเวลาการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการให้เหลือเพียง 4 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นการตรวจจากเลือดผู้ป่วยโดยตรง ไม่ต้องรอระยะเวลาการเจริญของเชื้อที่อาจต้องใช้เวลาในการตรวจนานถึง 2-3 วัน ซึ่งจะมีประโยชน์ช่วยแพทย์ตัดสินใจในการรักษา อาจช่วยลดอัตราการเสียชีวิต และภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดจากการรักษาที่ล่าช้าได้ อีกทั้งยังมีประโยชน์ในการแจ้งข้อมูลให้หน่วยงานที่มีหน้าที่ป้องกันควบคุมโรคเข้าไปค้นหาแหล่งโรค เพื่อควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว ป้องกันไม่ให้เกิดการระบาดของโรคเป็นวงกว้าง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ที่อนุญาตให้มีการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และผู้ป่วยอาสาสมัครทุกท่านที่อนุญาตให้ใช้ตัวอย่างเลือด รวมทั้งให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัย ขอขอบพระคุณทีมแพทย์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ และบุคลากรทางการแพทย์ โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ที่เอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงาน การให้คำปรึกษา การเก็บตัวอย่าง การซักประวัติ การเก็บรักษาตัวอย่าง และการให้ข้อมูล

ผลตรวจวิเคราะห์ ขอขอบพระคุณนายสังคม วิทยนันทน์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่ให้คำปรึกษาทั้งด้านวิชาการและการบริหารจัดการงานวิจัย รวมทั้งอนุมัติงบประมาณ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่งานพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่ให้การสนับสนุนให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. *Streptococcus suis:* past and present. Vet Res Commun 1997; 21: 381-407.
2. Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. *Streptococcus suis:* an emerging zoonotic pathogen. Lancet Infect Dis 2007; 7: 201-9.
3. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K. Group R streptococci pathogenic for man: two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. APMIS 1968; 74: 69-76.
4. Arends JP, Hartwig N, Rudolphy M, Zanen HC. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. J Clin Microbiol 1984; 20: 945-7.
5. Kay R, Cheng AF, Tse CY. *Streptococcus suis* infection in hong kong. Q J Med 1995; 88: 39-47.
6. Teekakirikul P, Wiwanitkit V. *Streptococcus suis* infection: overview of case reports in Thailand. The Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34: 178-83.
7. Wangsomboonsiri W, Luksananun T, Saksornchai S, Ketwong K, Sungkanuparph S. *Streptococcus suis* infection and risk factors for mortality. J Infect 2008; 57: 392-6.
8. Wangkaew S, Chaiwarith R, Tharavichitkul P, Supparatpinyo K. *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. J Infect 2006; 52: 455-60.
9. Donsakul K, Dejthevaporn C, Witoonpanich R. *Streptococcus suis* infection: clinical features and diagnostic pitfalls. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 34: 154-8.
10. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus.* In: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of clinical microbiology. 10th ed. Washington DC: AMS Press; 2011. p. 331-49
11. Smith HE, Veenbergen V, Van der velde J, Damman M, Wisselink HJ, Smits MA. The cps genes of *Streptococcus suis* Serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. J Clin Microbiol 1999; 37: 3146-52.
12. Yang W, Ca X, Hao Y, Liu Y, Wang S, Xing R, *et al.* Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 blood infections using RT-qPCR to quantify glutamate dehydrogenase copy numbers. J Microbiol Methods 2010; 83: 326-9.