รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกแยะสายพันธุ์และการตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* ที่รวดเร็ว ทางอณูวิทยา

Molecular genotyping and rapid detection of *Clostridium difficile*

คณะนักวิจัย

ดร. กมนนัทธ์ ศิงฆมานันท์	ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
ผศ.พญ. ธีรนุช บุญพิพัฒนาพงศ์	ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
รศ.ดร.นพ. สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา	ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
นพ. บุรภัทร สังข์ทอง	ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558 – 2559 รหัสโครงการ SCI580246f

ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) **การศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากแหล่งต่างๆที่มีผลต่อสุขภาพ**

(ภาษาอังกฤษ) **Study of health affected pathogenic bacteria isolated from various sources**

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) **การแยกแยะสายพันธุ์และการตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* ที่รวดเร็ว ทางอณูวิทยา**

(ภาษาอังกฤษ) **Molecular genotyping and rapid detection of *Clostridium difficile***

ชื่อผู้วิจัย

ดร. กมนนันทธ์ ศิงฆมานันท์	ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผศ.พญ. ธีรนุช บุญพิพัฒนาพงศ์	ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ.ดร.นพ. สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา	ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
นพ. บุรภัทร สังข์ทอง	ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารบัญ

สารบัญรูปภาพ **หน้า**

รูปที่ 1 เชื้อ *Clostridium difficile* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดช่องกราด 5

รูปที่ 2 pseudomembranous colitis หลังจาก endoscope 6

รูปที่ 3 pathogenicity locus (PaLoc) ของเชื้อ *C. difficile* 6

รูปที่ 4 ขั้นตอนการศึกษา 9

รูปที่ 5 ผลการทำ Multiplex direct-PCR เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสม 15

รูปที่ 6 ผลการทำ LAMP ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยA 16

รูปที่ 7 Limit of detection ของชุดของ primer ในเทคนิค PCR 17

รูปที่ 8 Limit of detection ชุด primer ในเทคนิค LAMP 17

รูปที่ 9 ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ multiplex direct-PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ได้จากการทำ spike test 18

รูปที่ 10 ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ direct-LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ได้จากการทำ spike test 18

รูปที่ 11 mass spectra ของเชื้อ *C. difficile* จากโรงพยาบาล, *C. difficile* ATCC 43255 และ *E. coli* DH5-Alpha 23

รูปที่ 12 Dendrogram ของ mass spectral fingerprints ของเชื้อ *C. difficile* จำนวน 30 strains 25

สารบัญตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 Primer สำหรับการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ด้วยเทคนิค Multiplex direct-PCR 10

ตารางที่ 2 Primer สำหรับการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ด้วยเทคนิค Direct-LAMP 11

ตารางที่ 3 รายชื่อเชื้อที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* 11-12

ตารางที่ 4 ผลการยืนยันชนิดของเชื้อ ด้วยเทคนิค Toxigenic culture และ Multiplex PCR 14-15

ตารางที่ 5 ผลสรุปการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ก่อโรค โดยใช้วิธีการต่างๆ 20

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแต่ละวิธีในการวินิจฉัยเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ก่อโรคจากตัวอย่างอุจาระส่งตรวจ 21

ตารางที่ 7 คะแนนการวิเคราะห์ผลด้วย MALDI-TOF MS ของเชื้อ *C. difficile* จำนวน 31 ตัวอย่าง 23-24

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2558-2559 รหัสโครงการ SCI580246f งนส. ชลธิชา รมยสมิต ซึ่งเป็นนักศึกษาปริญญาโทภายใต้โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษาจากทุนบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สถานที่ทำวิจัยหลักคือ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สนับสนุนเครื่องมือวิจัยในบางส่วน สุดท้ายขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ภายใต้การดูแลของ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยในส่วนการวิเคราะห์เชื้อ *Clostridium difficile* ด้วยเทคนิค MALDI-TOF

บทคัดย่อ

Clostridium difficile เป็นสาเหตุสำคัญของโรคท้องร่วงที่เกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะและท้องเสียในโรงพยาบาลที่มีอัตราการเสียชีวิตเพิ่มขึ้น ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้การตรวจหาแอนติเจนแบบรวดเร็วเพื่อตรวจสอบเชื้อ *C. difficile* แต่การทดสอบดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะต่ำ ในปัจจุบันจึงใช้วิธีทางอณูวิทยาบนพื้นฐานของการทดสอบสารพันธุกรรมของเชื้อ ในการตรวจหาเชื้อ เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูง การแยกแยะสายพันธุ์เชื้อโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลได้พัฒนาขึ้นเพื่อติดตามและตรวจสอบการระบาดของโรคติดเชื้อ *C. difficile* หรือเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ใหม่ที่พบว่ามีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจุบัน เทคนิค MALDI-TOF MS ประสบความสำเร็จในการแยกแยะสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดมวลของเปปไทด์และโปรตีนขนาดเล็กจากเซลล์ มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล แต่อย่างไรก็ตามมีการใช้ MALDI-TOF MS ในการแยกแยะเชื้อ *C. difficile* ไม่มากนัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ คือ เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex direct-PCR และ direct loop mediated isothermal amplification (direct-LAMP) ในการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ก่อโรค โดยปราศจากการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอุจจาระ และเพื่อการดำเนินการแยกแยะสายพันธุ์ของเชื้อ *C. difficile* ภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS เทคนิค multiplex direct-PCR สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ในปริมาณน้อยที่สุดได้ 10^5 CFU/ml และ 10^6 CFU/ml เมื่อเตรียมตัวอย่างอุจจาระด้วยการ spike เทคนิค LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ในปริมาณน้อยที่สุดได้ 10^0 CFU/ml จากการเพิ่มปริมาณของยีน *16s rRNA* และยีน *tcdB* ของเชื้อ และเมื่อเตรียมตัวอย่างอุจจาระด้วยการ spike สามารถตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ปริมาณน้อยสุดได้ 10^0 และ 10^1 CFU/ml เมื่อเพิ่มปริมาณของยีน *16s rRNA* และยีน *tcdB* ของเชื้อตามลำดับ ทั้งสองเทคนิคสามารถทำซ้ำได้ และมีความจำเพาะสูง เมื่อทำการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* ก่อโรคโดยตรงจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ *C. difficile* จำนวน 393 ตัวอย่าง ด้วยทั้งสองเทคนิคเปรียบเทียบกับ toxigenic culture (TC) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก และค่าพยากรณ์ลบของแต่ละการทดสอบ พบว่าในแต่ละการทดสอบมีค่าต่างๆ ข้างต้นตามลำดับ ดังนี้ multiplex direct-PCR (88.2% 100%, 100% และ 99.4%) direct-LAMP (88.2%, 100%, 100% และ 99.4%) และ TC (94.1%, 100%, 100% และ 99.7%) นอกจากนี้ เชื้อ *C. difficile* ที่ตรวจพบภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์สามารถแยกแยะออกเป็น 4 กลุ่มย่อยด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยอิงตามความคล้ายคลึงกันของลายพิมพ์มวลเปปไทด์ พบการกระจายของสายพันธุ์ก่อโรคในกลุ่มย่อยที่แตกต่างกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโปรไฟล์โปรตีนของเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ที่ก่อโรคมีรูปแบบของสเปคตรัมที่กว้างจากเทคนิค MALDI-TOF MS โดยกลุ่มย่อย B เป็นกลุ่มหลักที่มีการกระจายมากในหอผู้ป่วยอายุรกรรมชาย นอกจากนี้ เทคนิคนี้ยังสามารถแยกเชื้อ *C. difficile* จากแบคทีเรียชนิดอื่นได้อย่างแม่นยำ

โดยสรุปการตรวจหาเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ก่อโรคโดยวิธี multiplex direct-PCR และ direct LAMP มีความรวดเร็ว ความไว และความจำเพาะสูง และทั้งสองวิธีมีแนวโน้มสูงในการประยุกต์ใช้ในงานประจำ นอกจากนี้วิธี MALDI-TOF MS เป็นวิธีที่เหมาะสมในการติดตามการระบาดของสายพันธุ์ *C. difficile*

Abstract

Clostridium difficile is a major cause of antibiotic-associated diarrhea with the increasing rate of mortality. Several laboratories use enzyme immunoassays for detection of *C. difficile* toxin. It is; however, showed poor sensitivity and specificity. Recently, the nucleic acid-based method has been performed due to its high sensitivity and specificity. In order to follow and investigate *C. difficile* infection outbreaks, identify the emergence of new strains with higher virulence and clarify possible bacterial strain transmission molecular typing has been performed. Recently, MALDI-TOF MS was successfully applied to identity bacteria matching the mass of peptides and small proteins from whole cells against a database. However, there are only a few reports suggesting that MALDI-TOF MS can be applied for typing *C. difficile*. The aim of the present study is therefore to develop the multiplex direct-PCR and direct loop mediated isothermal amplification (direct-LAMP) assays for the detection of toxigenic *C. difficile* without DNA extraction in stool sample and to perform molecular subtyping of *C. difficile* strains in Songklanagarind hospital using MALDI-TOF MS method. The multiplex direct-PCR demonstrated that the limit of detection for *C. difficile* was 10^5 CFU/ml in pure cultures and 10^6 CFU/ml in spiked stool test. The LAMP assay showed limits of detection of 10^0 CFU/mL for both *16s rRNA* and *tcdB* gene primer sets. Whereas the sensitivity of the *16s rRNA* and *tcdB* gene primer sets was 10^0 and 10^1 CFU/ml in the spiking test, respectively. Both assays showed remarkable reproducibility and a high degree of specificity. The 393 stool samples from suspected patients having *C. difficile* infection were tested by both multiplex direct-PCR assay and direct-LAMP assay comparing to the "gold standard" toxigenic culture assay (TC) to determine sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). The sensitivity, specificity, PPV and NPV for each test were as follows: multiplex direct-PCR assay (88.2%, 100%, 100%, and 99.4%), direct-LAMP (88.2%, 100%, 100%, and 99.4%) and TC (94.1%, 100%, 100%, and 99.7%). In addition, MALDI-TOF MS could separate clinical *C. difficile* isolates in Songklanagarind hospital into 4 subgroups based on peptide mass fingerprinting similarity. It revealed that the toxigenic *C. difficile* were distributed in different subgroups, which indicated the broad-spectrum patterns of protein profiles of toxigenic *C. difficile* isolates. Subgroup B was the major group, which highly distributed in male internal medicine ward. Moreover, the MALDI-TOF MS could discrete *C. difficile* strains from others bacteria species.

Indeed, the multiplex direct-PCR and direct LAMP assays are rapid, high sensitive and high specific for detection of toxigenic *C. difficile*. It is superior to all known traditional methods and showed high potency to apply for routine work. Furthermore, MALDI-TOF MS method is suitable for monitoring *C. difficile* strains