การประชุมอภิปรายผู้ป่วยโรคติดเชื้อ ครั้งที่ 4/2557

Interhospital Case Conference on Infectious Diseases (ICCID)

จัดโดยสมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย

เพื่อหลักสูตรการฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์โรคติดเชื้อ

วันพฤหัสบดีที่ 23 ตุลาคม 2557 เวลา 13.30 – 17.00 น. ณ โรงแรมดุสิตธานี พัทยา จ.ชลบุรี

Case Summary Case 3

ผู้นำเสนอ : นายแพทย์เกรียงไกร ถวิลไพร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ปรึกษา : อาจารย์นายแพทย์กำพล สุวรรณพิมลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา : อาจารย์สุรภี เทียนกริม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Patient profile : ผู้ป่วยชายไทยอายุ 16 ปี อาชีพ นักเรียน ภูมิลำเนาที่อยู่ปัจจุบันจังหวัดกรุงเทพมหานคร ประวัติได้จากญาติเชื่อถือได้

รับไว้ในโรงพยาบาลวันที่ 27 ธันวาคม 2556

Chief complaint : เหนื่อยมากขึ้นมา 4 ชั่วโมงก่อนมาโรงพยาบาล

Status เดิมแข็งแรงดี เป็นนักกีฬาโรงเรียน

Present illness : 3 days PTA: หลังกลับจากโรงเรียน มีไข้ หนาวสั่น ไม่มีไอ ไม่มีน้ำมูก ไม่เจ็บคอ ไม่มีคลื่นไส้อาเจียน ไม่มีท้องเสีย ปัสสาวะปรกติ

2 days PTA : ยังมีไข้หนาวสั่น ผู้ปกครองซื้อยาลดไข้ให้รับประทาน เป็น Ibuprofen และ Paracetamol ไข้ลดลงหลังทานยา พอหมดฤทธิ์ยามีไข้ใหม่ รับประทานอาหารไม่ได้ ไม่ได้ไปโรงเรียน

1 day PTA : ยังมีไข้หนาวสั่น ตอนกลางคืนรู้สึกอึดอัดเวลานอน ต้องลุกขึ้นมานั่งเป็นพักๆ

4 hours PTA : ตอนเช้าผู้ป่วยรู้สึกเหนื่อยมาก เดินไม่ไหว ญาติจึงพามาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ปฏิเสธประวัติเที่ยวป่า ลุยน้ำ เดินทางไปต่างจังหวัดในช่วง 3 เดือน ไม่มีประวัติฉีดยาเข้าเส้น

Past history : ปฏิเสธโรคประจำตัว

Personal & social history : ปฏิเสธดื่มเหล้าและบุหรี่

Physical examination :

BT : 38.5 ^{o}C RR : 30/min

BP : 126/66 mmHg HR : 120/min, regular

GA : A young Thai male patient, tachypnea, restless

HEENT : Engorged neck vein 5 cm from sternal of angle, not pale conjunctiva, no icteric sclera, no subconjunctival hemorrhage

Oral cavity : No dental caries, tonsil no exudates.

Heart : PMI at 5th ICS, MCL, normal S1 S2 sound, S3 gallop positive, no murmur

Lungs : Tachypnea, normal breath sound, fine crepitation both lower lungs

Abdomen : Soft, not tender, no hepatosplenomegaly

Musculoskeletal : Pitting edema 1+, no evidence of arthritis, spine and paraspinal area not tender

Lymph node : Can't be palpated

Skin : No rash, No skin lesion

Neuro : Grossly intact

Laboratory investigation

1. CBC: Hb 13.6, Hct 42.5%, MCV 89, RDW 13.1, WBC 18,160 (PMN 92.9%, L 3.3%, Mono 2.2%, Eo 0.1, Ba 0.1%) Platelet 76,000
2. Coagulogram: PTT 29.3/28.9, PT 14.2/11.2, INR 1.23
3. BUN: 46, Cr 2.6, Na 131, K 3.4, Cl 97, HCO3 18
4. LFT: TB 1.56, DB 0.6, AST 45, ALT 30, ALP 116, Alb 3.4, Glo 3.6
5. UA: yellow, cloudy, Sp.gr.: 1.016, pH: 5.5, protein: 1+, glucose: negative, ketone: negative, RBC: 1-2, WBC: 10-20
6. Chest x-ray: bilateral alveolar infiltration
7. Echocardiography : Thickening of anterior mitral valve leaflet, oscillating mass diameter 8 mm was seen Severe MR LVEF 49%
8. H/C : C*orynebacterium diphtheriae* for 2/2 specimens
9. ELEK test : negative

Final diagnosis : nontoxigenic C*orynebacterium diphtheriae* infective endocarditis with congestive heart failure

Management:

1. Consult CVT for MVR
2. PGS 24 mU for 8 weeks

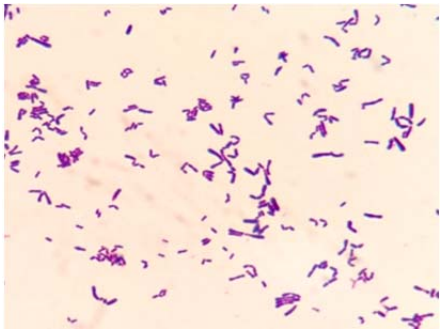
Result : improve

Practical point: ผู้ป่วย acute infective endocarditis อาจมีอาการเร็วมาก โดยอาจมีอาการเพียงไข้ร่วมกับเหนื่อย ซึ่งในกรณีที่มาเร็วมากอาจตรวจไม่พบว่ามี cardiac murmur ได้ ดังนั้นในผู้ป่วยที่มาด้วยไข้ร่วมกับภาวะหัวใจวายจึงควรมี acute infective endocarditis เป็น differential diagnosis ด้วย

Microbiology : *Corynebacterium diphtheriae*

- อยู่ใน order *Actinomycetales,* family *Corynebacteriaceae*
- เป็น aerobic, non-motile, Gram-positive bacilli, มีลักษณะรูปร่างเป็น club-shaped มีการเรียงตัวเป็นรูปตัว V, L

หรือเรียงขนานกัน เหมือนรั้ว ซึ่งดูคล้ายอักษรจีน (Chinese letter) (รูปที่ 1) มี 4 biotypes คือ var *gravis,* var *mitis*, var *intermedius* และ var *belfanti*



รูปที่ 1 Gram stain ของเชื้อ *Corynebacterium* (club-shaped, Gram-positive rod, with Chinese letter arrangement)

- คนเป็นรังโรค (reservoir) โดยเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในทางเดินหายใจส่วนบน ช่องปาก และบนผิวหนัง
- **การเพาะเชื้อ** เชื้อ *C.diphtheriae* เจริญได้ดีบน blood agar แต่ไม่สามารถเจริญบน Mac Conkey agar การเพาะเชื้อจาก throat swab, nasopharyngeal swab หรือ skin lesion จำเป็นต้องใช้ selective medium เช่น Hoyle's Tellurite, Tellurite blood agar หรือ Tinsdale's medium เพื่อยับยั้งเชื้อประจำถิ่นอื่นๆที่ปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจ โดยมี serum หรือเลือด ช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้น sodium thiosulfate ทำให้เกิด H_2S แล้วให้โคโลนีสีดำ และ potassium tellurite เป็นตัวยับยั้งเชื้อ Gram-negative และ Gram-positive normal flora สำหรับ Tinsdale's medium ซึ่งมี cystine ทำให้มี halo สีน้ำตาล-ดำรอบโคโลนี *C.diphtheriae* (รูปที่ 2) ส่วนเชื้ออื่นๆหากขึ้นได้จะเป็นโคโลนีไม่มีสี ขนาดเล็ก และไม่มี halo เมื่อใช้ selective medium ไม่ต้องอบเพาะใน candle jar (5% CO_2) เพราะจะทำให้การยับยั้งเชื้ออื่นลดลง

Tellurite blood agar Hoyle's tellurite Tinsdale's medium

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของ *C.diphtheriae* บน Tellurite blood agar, Hoyle's tellurite และ Tinsdale's medium

- การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจแนะนำให้ใช้ทั้ง blood agar และ tellurite blood agar เป็น primary culture plate ส่วน Tinsdale's medium เป็น high selective medium จึงมักให้ผล false negative โดยเฉพาะสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณเชื้อน้อย จะทำให้เชื้อไม่ขึ้นได้

- การเพาะแยกเชื้อจากคนที่เป็นพาหะ (carrier) แนะนำให้เพาะเชื้อจาก throat swab ลงบน Loffler หรือ Pai slant นำไปอบเพาะเชื้อนาน 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำเชื้อที่ขึ้นมาเพาะแยกบน tellurite blood agar หรือ Tinsdale's medium
- **การวินิจฉัยแยกเชื้อ** โคโลนีที่ขึ้นบน tellurite blood agar หรือ Tinsdale's medium จำเป็นต้องวินิจฉัยโดยใช้ biochemical tests (ตารางที่ 1) *C.diphtheriae* มีผล biochemical test ที่สำคัญ คือ

  - catalase: positive

  - nitrate: positive (ยกเว้น *C.diphtheriae* var *belfanti*)

  - cystinase: positive

  - urease: negative

ตารางที่ 1 การวินิจฉัยแยกเชื้อ *C.diphtheriae* ด้วย biochemical tests

Species	CYS	PYZ	Nitrate	Urease	Glucose	Maltose	Sucrose	Glycogen
C.diphtheriae								
var *gravis*	+	-	+	-	+	+	-	+
var *mitis*	+	-	+	-	+	+	-	-
var *intermedius**	+	-	+	-	+	+	-	-
var *belfanti*	+	-	-	-	+	+	-	-
C. ulcerans	+	-	-	+	+	+	-	+
C. pseudotuberculosis	+	-	-	+	+	+	-	-
C. amycolatum	-	+	v	v	+	v	v	-
C. imitans	-	w	-	-	+	+	w	-
C. pseudodiphtheriticum	-	v	+	+	-	-	-	-
C. striatum	-	+	+	-	+	-	v	-

w: weak reaction, v: variable reaction

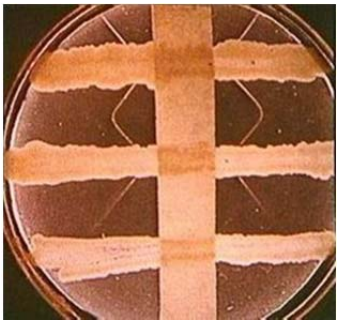
CYS: การสร้าง cystinase เห็นเป็น halo สีน้ำตาล-ดำ รอบโคโลนีบน Tinsdale's medium

PYZ: parazinamidase

*เป็นเชื้อที่ต้องการไขมันในการเจริญ จึงทำให้มีโคโลนีขนาดเล็กมาก ซึ่งต่างจาก var อื่นๆ

- การตรวจหา toxin เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อก่อโรค ซึ่งอาจใช้วิธี Elek test, Enzyme immunoassay (EIA) หรือ PCR โดยมีวิธี in vitro Vero cell assay เพื่อดู cytotoxic effect ของ diphtheria toxin เป็น gold standard
- Elek test เป็นวิธีที่ใช้หลักการ diffusion ระหว่าง toxin ที่เชื้อสร้าง และ specific anti-toxin ทำให้เกิดเส้นตะกอน

(precipitate) ซึ่งคือ antigen-antibody complex ใช้เวลาทดสอบ 24-48 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดง Elek test

- วิธี EIA ใช้เวลาทดสอบ 3-24 ชั่วโมง
- วิธี PCR เป็นการตรวจหา 'A' portion ของ toxin gene ซึ่งใช้เวลาสั้นที่สุด (4 ชั่วโมง) ทำให้มีประโยชน์ต่อการรักษา
- เนื่องจากเชื้อ *Corynebacterium* อาจพบเป็นเชื้อประจำถิ่น การให้ความสำคัญของเชื้อ *Corynebacterium* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจว่าควรทำการวินิจฉัยแยกเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ให้พิจารณา ดังนี้
  - เพาะแยกเชื้อได้จาก throat swab, nose swab, skin swab หรือ wound swab ใน suspected case
  - เพาะแยกเชื้อได้เป็นปริมาณมาก (predominant organism) จากสิ่งส่งตรวจบริเวณที่มีเชื้อประจำถิ่น
  - เพาะแยกเชื้อจากเลือด (hemoculture) 2 ขวด
  - เพาะแยกเชื้อได้จากปัสสาวะ พบเป็นเชื้อชนิดเดียว (pure culture) และมีปริมาณ $\geq 10^4$ CFU/mL
  - เพาะแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจหลายชนิด (multiple specimens)
  - เพาะแยกเชื้อได้เป็นปริมาณมากจากสิ่งส่งตรวจที่มีเม็ดเลือดขาวจาก direct examination เช่น original Gram stain
- การสร้าง toxin ของ *C.diphtheriae* เกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียนี้ติดเชื้อไวรัส (bacteriophage) ที่มี *tox* gene (CDC, May 2012) เชื้อที่สร้าง toxin จะก่อโรครุนแรง และทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่สำคัญตามมา คือ myocarditis และ neuritis นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) และพบโปรตีนในปัสสาวะ (proteinuria)
- เชื้อที่ไม่สร้าง toxin ก็ก่อโรคได้ โดยพบว่ามักมีความรุนแรงน้อยกว่า แต่ปัจจุบันในพื้นที่ที่มีการฉีดวัคซีนได้อย่างทั่วถึง พบเชื้อที่ไม่สร้าง toxin ก่อโรคมากขึ้นเรื่อยๆ และมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นด้วย (Zasada AA, International Journal of Infectious Disease 2010: e907-12)
- Antitoxin จะ neutralize circulating (unbound) toxin ทำให้ป้องกันการดำเนินต่อของโรคได้ แต่ไม่สามารถ neutralize toxin ที่อยู่ในเนื้อเยื่อแล้ว
- การตรวจหาภูมิคุ้มกัน antitoxin อาจใช้เป็นการยืนยันการติดเชื้อ ศึกษาภูมิคุ้มกันของประชาการ หรือประเมินการ

ให้วัคซีน สามารถใช้วิธี ELISA, passive hemagglutination test โดยมี in vivo toxin neutralization test เป็น gold standard การตรวจหาระดับ antitoxin ก่อนให้การรักษาจะช่วยยืนยันการวินิจฉัยแยกโรค โดยเฉพาะในรายที่ผลเพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ antitoxin ใน convalescent serum

นอกจากนี้พบว่าถ้า antitoxin มีระดับต่ำ การวินิจฉัยแยกโรคจะต้องคำนึงถึง *C.diphtheriae* ด้วย

ถ้า antitoxin มีระดับสูง พบว่า toxigenic *C.diphtheriae* จะไม่ก่อให้เกิด systemic disease

การแปลผลระดับ antitoxin โดย in vivo toxin neutralization test แสดงใน ตารางที่ 2

- ELISA อาจใช้เป็น screening test แต่ไม่นิยมเนื่องจาก พบว่า antitoxin < 0.1 IU/mL ให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธี in vivo toxin neutralization test ดังนั้นในรายที่มี antitoxin < 0.1 IU/mL จึงต้องทดสอบยืนยันด้วย in vivo toxin neutralization test นอกจากนี้ยังอาจให้ผล false positive และพบว่า antitoxin > 0.1 IU/mL ก็ไม่สามารถพยากรณ์โรคได้
- Passive haemagglutination test มีความไวต่ำ ไม่สามารถตรวจหา antitoxin < 0.1 IU/mL ทำให้เกิด false negative

ตารางที่ 2 การแปลผลระดับ antitoxin โดย in vivo toxin neutralization test

ระดับ antitoxin (IU/mL)	การแปลผล
< 0.01	ไวต่อการติดเชื้อ
0.01	ระดับต่ำสุดที่อาจป้องกันการติดเชื้อได้
0.01-0.09	ระดับที่พบว่าอาจป้องกันการติดเชื้อได้
0.1	ระดับที่พบว่าป้องกันการติดเชื้อได้
>1.0	ระดับที่ป้องกันการติดเชื้อได้เป็นเวลานาน

- **การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ** วิธีมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M45-A2, 2011) ให้หาค่า MIC (ไม่ใช้การทดสอบด้วยวิธี disc diffusion) โดยใช้ cation-adjusted Mueller-Hinton broth ที่เติม 2.5-5% (v/v) lysed horse blood (การทดสอบความไวกับยา datomycin จะต้องมี calcium 50 µg/mL) การเตรียมเชื้อ inoculumใช้วิธี direct colony suspension ให้ได้ความเข้มข้น = 0.5 McFarland standard อบเพาะเชื้อที่ 35 °C, ambient air นาน 24-48 ชั่วโมง เชื้อที่ใช้เป็น QC strains คือ *S.pneumoniae* ATCC 49619 และ *E.coli* ATCC 25922 สำหรับยา gentamicin ยาที่ควรทดสอบเป็น primary testing คือ penicillin, vancomycin, gentamicin และ erythromycin การแปลผล MIC แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแปลผลทดสอบความไวของ *Corynebacterium* spp. (รวมถึง *C.diphtheriae*)

ยาต้านจุลชีพ	MIC interpretive criteria (µg/mL)			หมายเหตุ
	S	I	R	
Penicillin	≤ 1	2	≥ 4	interpretive criteria may not apply to meningitis
Vancomycin	≤ 2	-	-	
Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16	
erythromycin	≤ 0.5	1	≥ 2	

- ข้อมูลผลความไวยาต้านจุลชีพต่อ *C.diphtheriae* (ส่วนใหญ่ใช้ Mueller-Hinton base ที่เติม 5% sheep blood) มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และระยะเวลาที่ศึกษา ดังนี้

  - การศึกษาในฝรั่งเศส โดยใช้เชื้อ 46 ตัวที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 1993-2010 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ยังไวต่อยาได้ดี ยกเว้นเชื้อ 1 ตัวที่ดื้อยา trimethoprim และ sulfamethoxazole โดยมี MIC > 32 และ >1024 µg/mL ตามลำดับ (Barraud O, Emerging Infectious Disease 2011; 17: 2078-80.)
  - การศึกษาในโปแลนด์ โดยใช้เชื้อ 19 ตัวที่ในช่วงปี ค.ศ. 1990-2000 และ 2004-2008 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ยังไวต่อยาดี นอกจากเชื้อร้อยละ 47 (9/19) มีผล cefotaxime อยู่ในช่วง intermediate โดยมี range MICs = 0.047-3 µg/mL (Zasada AA, International Journal of Infectious Disease 2010: e907-12.)
  - การศึกษาในบราซิล โดยใช้เชื้อ 47 ตัวที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 1981-2002 พบเชื้อดื้อยา penicillin, erythromycin, clindamycin และ tetracycline เป็นร้อยละ 14.8, 4.2, 17 และ 12.8 ตามลำดับ (Pereira GA, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2008; 103: 507-10.)
  - การศึกษาในอังกฤษโดยใช้เชื้อ *C.diphtheriae* var *gravis* 24 ตัวที่เก็บในช่วงปี ค.ศ. 1995-1996 พบเชื้อร้อยละ 71 (17/24) tolerant ต่อยา penicillin โดยมี MIC ไม่ต่างจากเชื้อที่ไว (Hunolstein CV, J Antimicrob Chemother 2002; 50: 125-8.)