Thai Science and Technology Journal Vol. 33 No. 6 November-December 2025 ISSN 3027-6365 (Online)

Thai Science and Technology Journal
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
Journal Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผลการตรวจวิเคราะห์พิษของเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิไซล์ เอ/บี โดยวิธีเลทเธอรัลโฟลอิมมูโนโครมาโตกราฟฟี

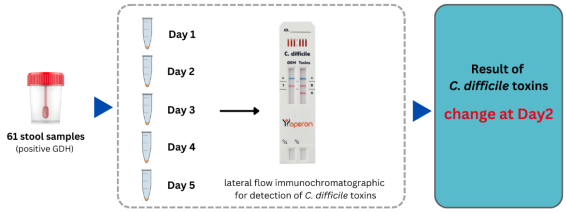
Changes in *Clostridium Difficile* Toxin A/B Detection Results Using Lateral Flow Immunochromatography

กฤษฎา ศิริสภาภรณ์,* สุภาพร พุ่มพา, พลากร พุทธรักษ์
งานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ปทุมธานี 12120

Kridsada Sirisabhabhorn,* Supaporn Pumpa, Palakorn Puttaruk
Department of Medical Technology Laboratory, Thammasat University, Pathum Thani 12120

Received 7 June 2024; Received in revised 8 March 2025; Accepted 1 July 2025

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Toxin types A (TcdA) and B (TcdB) of Clostridium or *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*) are responsible for causing severe diarrhea in patients with CDI (*Clostridioides difficile* infection), and can lead to fatal outcomes. Detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and TcdA/B using lateral flow immunochromatography (IC) is crucial for CDI diagnosis. However, when immediate testing is not possible, fecal samples are typically stored at 4°C until official analysis, sometimes for up to 5 days. This study aimed to determine the critical day—the first day on which IC test results for GDH and TcdA/B begin to deviate from Day $_1$ results, potentially affecting clinical decision-making. A total of 61 post-analysis fecal samples from patients at Thammasat University Hospital, Pathumtani, Thailand, were divided into five aliquots per sample, stored at 4°C, and tested for GDH and TcdA/B using the IC method from Day 1 to Day 5. The agreement of test results across the 5 days was evaluated using Cohen's Kappa coefficient. The results identified Day 2 as the critical day. Overall, IC test result patterns between Day$_1$ and Days$_{2\text{-}5}$ showed high agreement (almost perfect concordance). However, beginning on Day$_2$, a 4.90-6.60% increase in negative results was observed, which may lead to missed diagnoses and delayed treatment. In conclusion, GDH and TcdA/B detection using the IC method should be performed as soon as possible to reduce the lethal rate.

คำสำคัญ

อิมมูโนโครมาโตกราฟฟี;
C. difficile; พิษ;
อุจจาระ;
การเปลี่ยนแปลง

Keywords

TcdA; TcdB;
Glutamate dehydrogenase;
Critical day

บทคัดย่อ

พิษของเชื้อ *Clostridium* หรือ *Clostridiodes difficile* (*C. difficile*) ชนิด A(TcdA) และ B(TcdB) ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการท้องเสียรุนแรงขั้นเสียชีวิตได้ การตรวจ Glutamate dehydrogenase (GDH) TcdAและ TcdB ของเชื้อด้วยวิธี Lateral flow immunochromatography (IC) หากไม่สามารถตรวจได้ทันทีต้องเก็บอุจจาระที่ 4°C เพื่อรอตรวจบางครั้งอาจนานถึง 5 วัน (Day$_{1\text{-}5}$) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวันที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง (Critical day) ของผลตรวจ GDH, TcdA และ TcdB จากวันแรก (Day$_1$) โดยใช้อุจจาระหลังจากตรวจประจำวันจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จ.ปทุมธานี จำนวน 61 ตัวอย่าง โดยแบ่งอุจจาระเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการตรวจ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC ในวันที่ 2 ถึง 5 (Day$_{2\text{-}5}$) จากนั้นวิเคราะห์ความสอดคล้องของผลจากวิธี IC ระหว่างวัน (Day$_{1\text{-}5}$) ด้วย Cohen's Kappa coefficient ผลการทดลองพบว่า Critical day เท่ากับ 2 เนื่องจากเป็นวันที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของผล GDH, TcdA และ TcdB สำหรับรูปแบบการรายงานผลตรวจ (ประกอบด้วย GDH/TcdA/TcdB เรียงกัน) ของวิธี IC(Day$_1$ vs Day$_{2\text{-}5}$) ยังมีความสอดคล้องกันในระดับ Almost perfect แต่ใน Day$_{2\text{-}5}$ อาจปรากฏรูปแบบของผลตรวจที่ทำให้ผู้ป่วยพลาดการรักษาตั้งแต่ร้อยละ 4.90 ถึงร้อยละ 6.60 ได้ สรุปว่าการตรวจ GDH, TcdA/B ด้วยวิธี IC ควรตรวจทันทีภายใน 1 วันสามารถช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** ksirisabhabhorn@gmail.com

DOI: 10.14456/tstj.2025.48

1. บทนำ

โรค *Clostridioides difficile* infection (CDI) เกิดจากการติดเชื้อ *C. difficile* เป็นเชื้อแบคทีเรียแอนแอโรบ ชนิดแกรมบวก สร้างสปอร์ แพร่กระจายผ่านทาง Oral-Fecal route เชื้อ *C. difficile* ผลิต Enterotoxin ชนิด A (TcdA) และCytotoxin ชนิด B (TcdB) ซึ่งเป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (Virulence factor) โดยยีน *tcd*A และ *tcd*B ของเชื้อบนตำแหน่งยีน Pathogenicity locus (PaLoc) ตามลำดับ พิษทั้ง 2 ชนิดของเชื้อทำงานร่วมกับ Pili flagella และ Mono glycosyltransferases ทำให้มีคุณสมบัติเกาะติดผิวเซลล์ของเยื่อบุทางเดินอาหาร เจริญเติบโต (Colonization) และทำลายเยื่อบุทางเดินอาหาร (Gut) [1] สำหรับอาการทางคลินิกมีตั้งแต่ท้องเสียท้องร่วง (Diarrhea) ในขั้นเริ่มต้น (Mild) ถึงขั้นรุนแรง (Severe) ส่งผลให้เสียชีวิตได้ ปรากฏอุบัติการณ์อัตราการติดเชื้อซ้ำและการเสียชีวิตของโรค CDI สูงสำหรับในประเทศไทยเกิด Recurrence rate ร้อยละ 3 นอกจากนี้โรค CDI ยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ซึ่งใช้ในการรักษาด้วย สำหรับในประเทศไทยพบรายงานการดื้อต่อยา Clindamycin, Erythromycin และ Moxifloxacin [2, 3] เคยมีการรายงานความสัมพันธ์เกี่ยวกับความหลากหลายของสายพันธุ์ที่สามารถผลิตพิษของเชื้อกับความรุนแรงของโรคและการดื้อต่อยาต้านหลายฉบับ [4, 5, 6] ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ชนิดของพิษของเชื้ออย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญอาจช่วยบ่งบอกถึงสายพันธุ์ของเชื้อและเป็นประโยชน์ต่อการรักษาได้

แม้ว่าการตรวจหาเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase (GDH) ของเชื้อและการจำแนกชนิดพิษของเชื้อ *C. difficile* ด้วยวิธี IC (Lateral flow immunochromatography) สามารถทำได้ง่าย สะดวกและรายงานผลได้รวดเร็วแต่หากไม่สามารถทำได้ทันทีเนื่องจากข้อจำกัดบางประการของห้องปฏิบัติการจึงต้องทำการเก็บอุจจาระในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อรอตรวจวิเคราะห์ เคยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวกับการเก็บอุจจาระตามเงื่อนไขของอุณหภูมิ ระยะเวลาและวิธีการตรวจวิเคราะห์ทำให้ผลการตรวจพบ TcdA และ TcdB มีความแตกต่างกัน เช่น Becker, S.L. et al. รายงานว่าอุจจาระที่เก็บ 4 องศาเซลเซียส (°C) ภายใน 28 วัน ยังสามารถตรวจพบ GDH และ Toxin ได้ด้วยวิธี PCR [7] Schora, D.M. et al. รายงานว่าอุจจาระที่เก็บ 4°C ภายใน 120 วันยังสามารถตรวจพบ Toxin ของเชื้อด้วยวิธี EIA [8] เช่นเดียวกับ Nho, S.W. et al. รายงานว่าอุจจาระที่เก็บ 4°C ภายใน 60 วัน ยังคงตรวจพบ Toxin ของเชื้อด้วยวิธี Toxigenic culture ได้ [9] ในขณะที่ Borriello et al. รายงานว่าไม่สามารถตรวจพบ TcdA ได้หากเก็บอุจจาระที่เก็บ 4°C ถึง 52 วัน [10] Bowman, R.A. and Riley, T.V. รายงานการลดลงของปริมาณสารพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 2 วันโดยเก็บไว้ ณ อุณหภูมิที่ 5°C [11] แม้ว่าวิธี Cytotoxic culture เป็นวิธี Gold standard ของการตรวจวิเคราะห์เชื้อและพิษของเชื้อ *C. difficile* แต่ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ทักษะประสบการณ์ที่ชำนาญ ต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะราคาสูงและใช้ระยะเวลานานประมาณ 2-3 วัน ดังนั้นห้องปฏิบัติทางการแพทย์ส่วนใหญ่จึงนิยมใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassays (EIA) หรือ Immunochromatography (IC) แต่ยังมีการรายงานผลช่วงความแตกต่างของความไวและความจำเพาะมาก [12]

สำหรับงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ (รพธ.) จ.ปทุมธานี ได้กำหนดการตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC ในวันและเวลาราชการเนื่องด้วยข้อจำกัดบางประการของห้องปฏิบัติการบางครั้งหากมีวันหยุดราชการยาวนานประมาณ 5-7 วัน จึงจำเป็นต้องเก็บอุจจาระไว้ที่ 4°C เพื่อรอตรวจ จากการสังเกตพบว่าหลังช่วงวันหยุดยาวพบผลตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวส่วนใหญ่ให้ผลเป็นลบ (Negative) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีประเด็นข้อสงสัยเกี่ยวกับระยะเวลาของการเก็บอุจจาระเพื่อรอตรวจจะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA

และ TcdB ด้วยวิธี IC มีการเปลี่ยนแปลงจากวันแรก (Day_1) หรือไม่ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ค้นหาวันที่ผลตรวจ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง (Critical day) ไปจากวันแรกของการตรวจเมื่อเก็บอุจจาระที่อุณหภูมิ 4°C ภายในระยะเวลา 1 ถึง 5 วัน (Day_{1-5}) และศึกษาผลกระทบจากรูปแบบการรายงานผลตรวจที่มีการเปลี่ยนแปลง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างอุจจาระหลังการตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ (รพธ.) จ.ปทุมธานี จำนวน 61 ราย โดยคัดเลือกอุจจาระที่ให้ผล GDH positive จากวิธี IC (Day_1: reference) และไม่พบพบเชื้อในกลุ่ม Gastroenteroparasitic infection จากนั้นแบ่งอุจจาระแต่ละตัวอย่างใส่ Aliquot tube จำนวน 4 หลอด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC ในวันที่ 2 ถึง 5 (Day_{2-5}) ของการทดลองต่อไป

2.2 ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Lateral flow immunochromatography (IC)

ใช้ตัวอย่างอุจจาระปริมาณ 110 มิลลิกรัมหรือ 110 ไมโครลิตร ลงใน Sample tube ที่ภายในมี Buffer บรรจุอยู่ จากนั้นเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenous) หยดลงใน Sample wells (GDH และ TcdA/TcdB Wells) ของ Strip ตามลำดับ อ่านผลการทดสอบภายในเวลา 20 นาที หากในอุจจาระมี GDH, Toxin A หรือ B จะปรากฏเป็นเส้นสีแดงบริเวณ Test line อ่านผลเป็นบวก หมายถึง มีเอนไซม์ GDH และมีพิษชนิด A/B ของเชื้อ *C. difficile* ในอุจจาระตามลำดับ [13] (Figure 1)

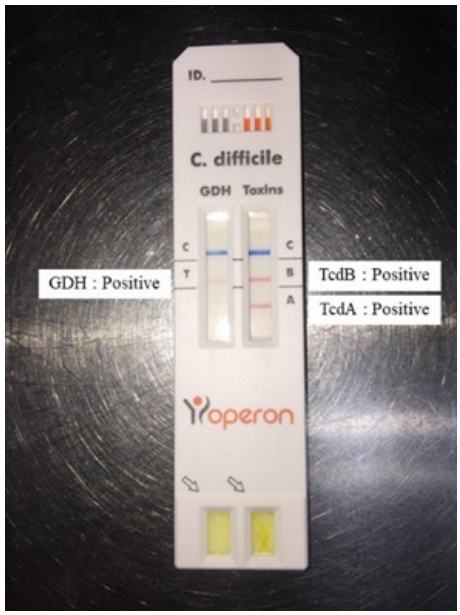


Figure 1 The positive results of GDH, TcdA, and TcdB by IC method.

2.3 จริยธรรมการวิจัยและความปลอดภัยทางชีวภาพ

งานวิจัยนี้ได้ขออนุญาตดำเนินการวิจัยและได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติหมายเลข 014/2565 และคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หมายเลข 078/2565

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค้นหาวันที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง (Critical day) ของผลการทดสอบ GDH, TcdA และ TcdB โดยสังเกตจากวันที่ผลการตรวจด้วยวิธี IC จากวันที่ 2 ถึง 5 เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปจากวันแรก (Day_1) คำนวณร้อยละของการเกิดผลบวก (Positive) และผลลบ (Negative)

$$\frac{\text{จำนวนตัวอย่างของการเกิดผลบวก (Positive) หรือผลลบ (Negative)}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (N=61)}} \times 100$$

จากนั้นวิเคราะห์และแปลผลค่าความสอดคล้องของผลตรวจแต่ละชนิดของ GDH, TcdA และ TcdB และความสอดคล้องของรูปแบบการรายงานผล (ประกอบด้วย GDH/TcdA/TcdB เรียงกัน) จากวิธี IC ภายใน 5 วัน (Day_1-Day_5) โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ Cohen's Kappa ด้วยโปรแกรม SPSS® (Table 1)

Table 1 The interpretation of agreement analysis by Cohen's Kappa coefficient [14]

Values of kappa	Levels of agreement	% Reliable
0.00-0.20	None	0-4%
0.21-0.39	Minimal	4-15%
0.40-0.59	Weak	15-35%
0.60-0.79	Moderate	35-63%
0.80-0.90	Strong	64-81%
> 0.90	Almost perfect	82-100%

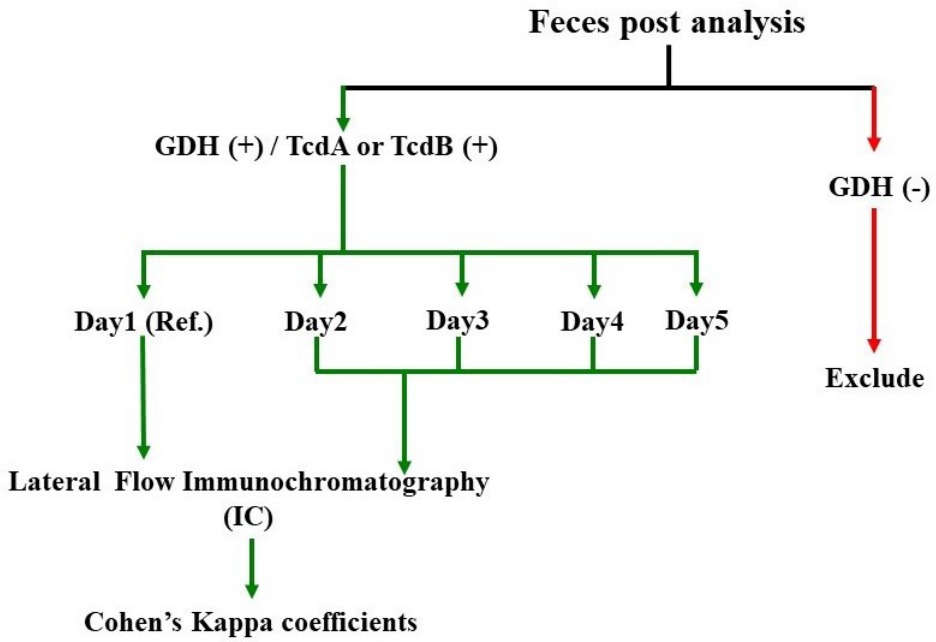


Figure 2 Flowchart of research method

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเปลี่ยนแปลงผลตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ของวิธี IC ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 5 ของการทดลอง (Day_{1-5})

จากการทดลองพบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 2 (Day_2) ซึ่งแสดงผลของการเปลี่ยนแปลงในแต่ละวันและแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงดัง Table 2 and Figure 3 ตามลำดับดังนี้

จากผลการทดลอง Table 2 and Figure 3 พบว่าผลบวก GDH เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลดลงจากผลบวกเป็นผลลบจำนวน 4 ราย (ตัวอย่าง No. 30, 36, 51, 52 (ไม่ได้แสดง)) คิดเป็นร้อยละ 6.56 และเปลี่ยนไปเป็นผลลบอีก 1 รายในวันที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 1.64 และปรากฏผล GDH บวกคงที่ 56 รายคิดเป็นร้อยละ 91.80 ในวันที่ 3-5 ของการทดลอง โดยรวมผล GDH มีการเปลี่ยนแปลงจากผลเริ่มต้น (Day_1) มากที่สุดร้อยละ 8.20 หรือจำนวน 5 ราย เคยมีรายงานการศึกษาผลของการ Freeze throw หลายครั้งพบว่าทำให้การตรวจจับ GDH

Table 2 The results of Immunochromatography (IC) from Day_1 to Day_5 of the experiment.

Days	Results N=61	GDH n (%)	TcdA n (%)	TcdB n (%)
1(ref.)	Negative	0(0.00)	53(86.89)	51(83.61)
	Positive	59(96.72)	8(13.11)	8(13.11)
	Weakly positive	2(3.28)	0(0.00)	2(3.28)
2	Negative	4(6.56)	52(85.25)	50(81.97)
	Positive	55(90.16)	8(13.11)	10(16.39)
	Weakly positive	2(3.28)	1(1.64)	1(1.64)
3	Negative	5(8.20)	53(86.89)	50(81.97)
	Positive	56(91.80)	8(13.11)	9(14.75)
	Weakly positive	0(0.00)	0(0.00)	2(3.28)
4	Negative	5(8.20)	53(86.89)	49(80.33)
	Positive	55(90.16)	7(11.48)	10(16.39)
	Weakly positive	1(1.64)	1(1.64)	2(3.28)
5	Negative	5(8.20)	53(86.89)	50(81.97)
	Positive	55(90.16)	8(13.11)	10(16.39)
	Weakly positive	1(1.64)	0(0.00)	1(1.64)

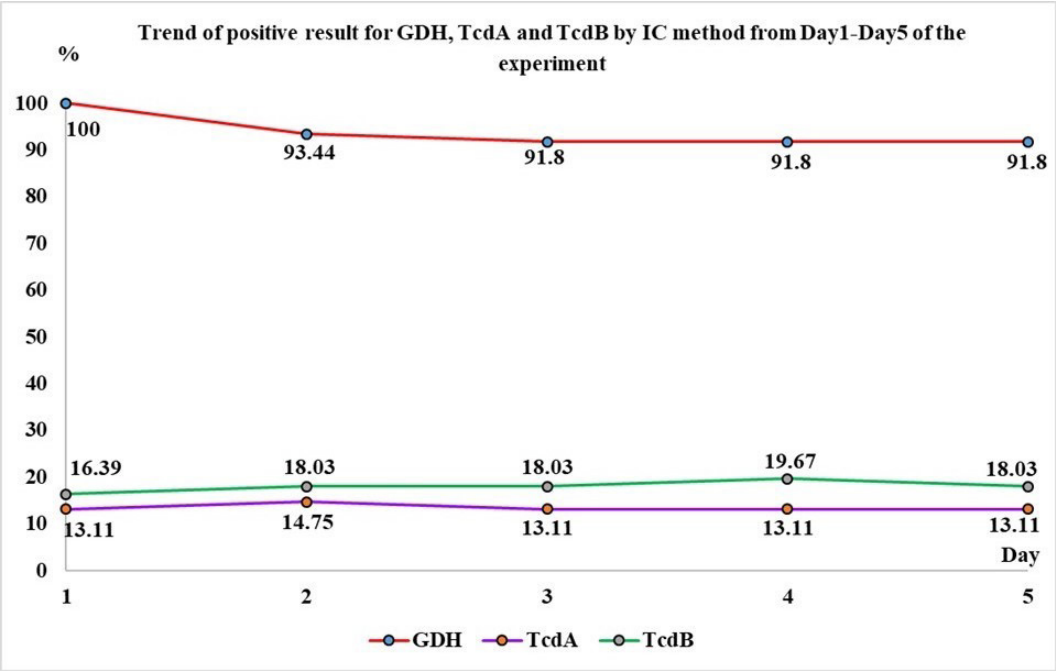


Figure 3 The trend of positive results for GDH, TcdA, and TcdB by IC method during Day_{1-5} of the experiment

ผลบวกลดลง [15, 16] และอาจลดลงได้มากถึงร้อยละ 3.70 ถึงร้อยละ 11.10 [17] บางครั้งความเย็นอาจมีผลต่อผลบวกของ GDH ที่ลดลงได้ ดังนั้นการเก็บอุจจาระเพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ที่ 4°C อาจทำให้ Activity ของเอนไซม์ GDH ลดลง จึงสังเกตการปรากฏผลลบของ GDH ในวันที่ 2 หรืออาจปรากฏผลเป็นผลบวกจาง (Weakly positive) ในวันถัดไปเพิ่มขึ้น ในขณะที่การอ่านผลของ TcdA และ TcdB มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเท่ากับร้อยละ 1.64 และร้อยละ 3.28 ตามลำดับ โดยผลการตรวจวิเคราะห์ TcdA พบเพิ่มขึ้น 1 ราย (ตัวอย่าง No. 26 (ไม่ได้แสดง)) คิดเป็นร้อยละ 1.64 ในวันที่ 2 และปรากฏผลบวกลดลง 1 รายทำให้ผล TcdA บวกคงที่ 8 รายคิดเป็นร้อยละ 13.11 ตั้งแต่วันที่ 3-5 ของการทดลอง ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของผลบวก TcdB มีการเปลี่ยนแปลงเป็นผลบวกจำนวน 1 ราย (ตัวอย่าง No. 27 (ไม่ได้แสดง)) คิดเป็นร้อยละ 1.64 และเปลี่ยนเป็นผลบวกอีก 1 รายคิดเป็นร้อยละ 1.64 ในวันที่ 2 และ 4 ของการทดลองและเปลี่ยนเป็นผลลบ 1 รายคิดเป็นร้อยละ 1.64 ในวันที่ 5 ของการทดลองตามลำดับ ทำให้ TcdB มีช่วงการเปลี่ยนแปลงมากกว่าอยู่ที่ร้อยละ 3.20 อาจเป็นเพราะความคงตัวของ Toxin A มีมากกว่า Toxin B จึงทำให้พบการเปลี่ยนแปลงของผล Toxin B มีมากกว่า [18] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ จากการศึกษาของ Grześkowiak et al. รายงานว่าการตรวจจับ TcdA ที่ 4°C ลดลงจากวันที่ 1, 2, 7, 14 และ 21 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อการตรวจจับ TcdB [19] Aichinger, E. et al. รายงานว่าจากการทดสอบซ้ำภายใน 7 วันของวิธีทาง Immunoassay (EIA) พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงจากลบเป็นบวกในอัตราที่ต่ำมากประมาณร้อยละ 1.90 [20] และพบการคงผลบวกของ Toxin A/B อยู่ที่ร้อยละ 10.60 ภายใน 7-10 วัน แต่ไม่แนะนำให้มีการทดสอบซ้ำในตัวอย่างอุจจาระที่ให้ผลลบเกิน 2 วันเนื่องจากพบว่าผลสามารถเปลี่ยนเป็นผลบวกได้ [21] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นหากทำการทดสอบด้วยวิธี IC ควรทำการทดสอบในวันแรก (Day_1) เนื่องจากหากเก็บอุจจาระเพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ผลอาจมีการ

เปลี่ยนแปลงได้ และ Barbut, F. et al. รายงานว่าควรตรวจ TcdA และ TcdB ทันทีภายในวันที่มีการเก็บอุจจาระจากผู้ป่วย [22] แต่หากไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ภายในวันนั้นให้เก็บที่อุณหภูมิ 4ºC ไม่เกิน 72 ชั่วโมงหรือเก็บที่อุณหภูมิ -80ºC แต่ไม่แนะนำให้เก็บที่อุณหภูมิ -20ºC เนื่องจากผลึกของน้ำแข็ง (Ice crystal) อาจไปทำลายโครงสร้างโปรตีนของสารพิษของเชื้อทำให้ตรวจพบได้ลดลง [23, 24] สำหรับการศึกษาครั้งนี้แสดงผล Critical day ของการตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ของการรายงานผลด้วยวิธี IC คือ Day_2

สำหรับการลดลงและเพิ่มขึ้นของการพบ Toxin A และ Toxin B ของวิธี IC ในช่วง Day_1-Day_5 นั้น อาจเกิดจากหลายปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่น เกิดจากความคลาดเคลื่อนในขั้นตอนการทดสอบ การอ่านผลและแปลผลด้วยด้วยสายตาหรือการปริมาณ Toxin ของเชื้อในอุจจาระที่น้อยในบางตัวอย่างตั้งแต่เริ่มต้น

3.2 การทดสอบความสอดคล้องของผลตรวจวิเคราะห์และรูปแบบการรายงานผลตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ของวิธี IC ในระหว่างวันที่ 1-5 ของการทดลอง (Day_{1-5}) ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ Cohen's Kappa

จากผลการทดลองเมื่อเก็บอุจจาระเพื่อรอตรวจในวันที่ 2 ถึง 5 ปรากฏว่าผลการตรวจ GDH, TcdA และ TcdB และ มีการเปลี่ยนแปลงไปจากวันที่ 1 หากนำผลตรวจมารวมกันเพื่อรายงานแพทย์จะทำให้เกิดรูปแบบการรายงานผล (Result pattern: GDH/TcdA/TcdB) ที่แตกต่างกันซึ่งอาจกลายเป็นรูปแบบผลตรวจที่ไม่บ่งบอกถึงความรุนแรงทางคลินิกได้และอาจทำให้ผู้ป่วยไม่ได้เข้ารับการรักษาได้ซึ่งหากผลตรวจด้วยวิธี IC ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงและส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยมากจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนบริหารจัดการสิ่งส่งตรวจและการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการต่อไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ศึกษาความสอดคล้องของผลการตรวจแต่ละชนิดของ GDH, TcdA และ TcdB และความสอดคล้องของรูปแบบการรายงานผลของวิธี IC ในวันที่ 1-5 (Day_{1-5}) จึงได้ทำการทดสอบหาค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง Cohen's Kappa ดังนี้

จาก Table 3 (3A-3C) แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าผลตรวจวิเคราะห์ GDH, TcdA และ TcdB ของวิธี IC มีการเปลี่ยนแปลงแต่ผลตรวจวิเคราะห์ในระหว่าง 5 วันของการทดลองยังคงมีความสอดคล้องกันในระดับสูงมาก Almost perfect (Kappa = 0.951-1.00) (Table 1) อย่างไรก็ตามการรายงานผลตรวจวิเคราะห์พิษของเชื้อ *C. difficile* ของงานห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ (รพธ.) ต้องรายงานผล GDH, TcdA และ TcdB ด้วยวิธี IC ประกอบกันเรียงตามลำดับเช่น GDH ผลบวก, TcdA ผลลบ และ TcdB ผลบวก รายงานเป็น GDH^+/$TcdA^-$/$TcdB^+$ เป็นต้น ซึ่งหากผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IC มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 5 วันของการทดสอบจะทำให้เกิดรูปแบบการรายงานผลที่แตกต่างกันในผู้ป่วยคนเดียวกัน ผู้วิจัยมีความประสงค์ศึกษารูปแบบการรายงานผลแก่แพทย์ที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการเข้ารับการรักษาของผู้ป่วยอย่างไร จึงได้ทำการออกแบบรูปแบบการรายงานผลโดยให้อักษร "P" แทนค่าเป็นผลบวก (Positive) และผลบวกจาง (Weakly positive) และอักษร "N" แทนค่าเป็นผลลบ (Negative) ใส่แทนค่าการรายงานผลเรียงตามลำดับ GDH, TcdA และ TcdB ซึ่งรูปแบบการรายงานผลแบบ NNN (GDH^-/$TcdA^-$/$TcdB^-$) อาจทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาเนื่องจากผลตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดเป็นผลลบ

จาก Figure 4 แสดงข้อมูลการกระจายตัวของรูปแบบการรายงานผลตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IC ทั้ง 7 รูปแบบของแต่ละวันที่ 1-5 (IC (Day_{1-5})) โดยแสดงเป็นค่า %(n) (4A) เมื่อพิจารณาจาก Graph (4B) ปรากฏว่ารูปแบบการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ GDH/TcdA/TcdB ด้วยวิธี IC ในแต่ละ Patterns ตั้งแต่วันที่ 1-5 (Day_{1-5}) ของการทดลองมีค่ามัธยฐาน (Median) ไม่ต่าง

Table 3 The Cohen's Kappa coefficient values in agreement analysis of IC method crossing Day_1 to Day_5 for GDH (3A), TcdA (3B), and TcdB (3C), respectively.

3A

IC method	GDH (day_1)	GDH (day_2)	GDH (day_3)	GDH (day_4)	GDH (day_5)
GDH (day_1)		0.961	0.951	0.951	0.951
GDH (day_2)			0.99	0.99	0.99
GDH (day_3)				1	1
GDH (day_4)					1
GDH (day_5)					

3B

IC method	TcdA(day_1)	TcdA(day_2)	TcdA(day_3)	TcdA(day_4)	TcdA(day_5)
TcdA(day_1)		0.99	0.981	1	0.981
TcdA(day_2)			0.99	0.99	0.99
TcdA(day_3)				0.981	1
TcdA(day_4)					0.981
TcdA(day_5)					

3C

IC method	TcdB(day_1)	TcdB(day_2)	TcdB(day_3)	TcdB(day_4)	TcdB(day_5)
TcdB(day_1)		0.99	0.99	0.981	0.99
TcdB(day_2)			1	0.99	0.981
TcdB(day_3)				0.99	0.981
TcdB(day_4)					0.971
TcdB(day_5)					

4A

Pattern/Method	IC (day_1) n(%)	IC (day_2) n(%)	IC (day_3) n(%)	IC (day_4) n(%)	IC (day_5) n(%)
NNN	0(0)	4.9(3)	6.6(4)	6.6(4)	6.6(4)
NNP	0(0)	0(0)	1.6(1)	0(0)	1.6(1)
NPP	0(0)	1.6(1)	0(0)	1.6(1)	0(0)
PNN	77(47)	72.1(44)	70.5(43)	70.5(43)	70.5(43)
PNP	9.8(6)	8.2(5)	8.2(5)	9.8(6)	8.2(5)
PPN	6.6(4)	4.9(3)	4.9(3)	3.3(2)	4.9(3)
PPP	6.6(4)	8.2(5)	8.2(5)	8.2(5)	8.2(5)

4B

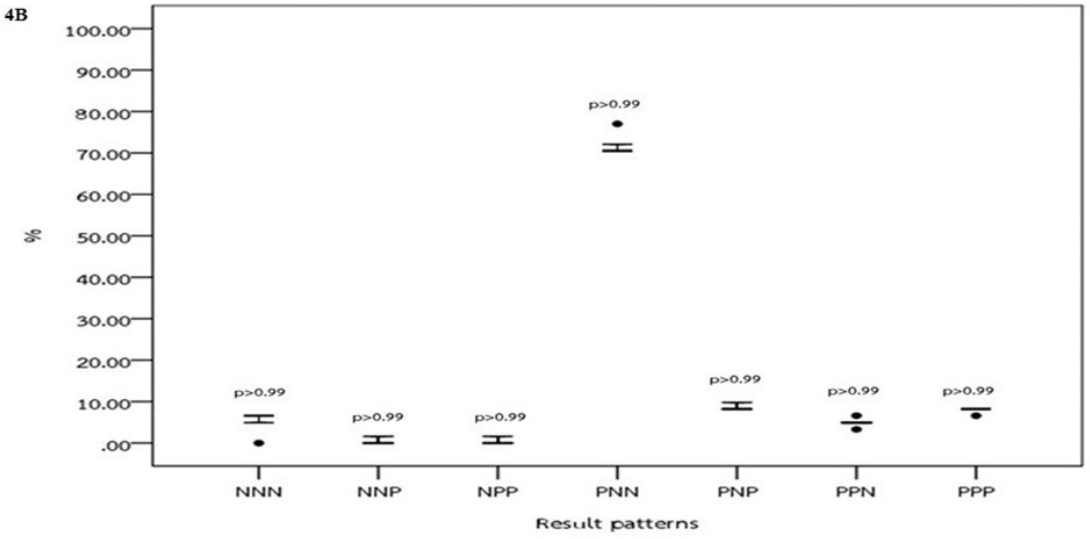


Figure 4 The frequency of distribution patterns for *C. difficile* toxin results by IC method (4A) and comparative median values during 5 days (Day_{1-5}) of 7 result patterns (NNN, NNP, NPP, PNN, PNP, PPN, and PPP) (4B) by Kruscal Wallis testing

กัน (p>0.05) จากการทดสอบ Kruscal Wallis โดยแสดงค่า % Median (95%CI) ของรูปแบบผล NNN, NNP, NPP, PNN, PNP, PPN และ PPP เท่ากับ 6.60 (1.39-8.49), 0.00 (-0.45-1.73), 0.00 (-0.45-1.73), 70.50 (68.63-75.61), 8.20 (7.75-9.93), 4.90 (3.47-6.37) และ 8.20 (6.99-8.77) ตามลำดับ แม้ว่าการกระจายตัวของรูปแบบการรายงานผลแต่ละชนิดในช่วง 1-5 วัน (Day_{1-5}) ของการทดลองไม่แตกต่างกันแต่ในวันที่ 2 (Day_2) พบการเปลี่ยนแปลงผล GDH^+ ไปเป็น GDH^- ทำให้เกิดรูปแบบผล NNN เป็นร้อยละ 4.90 และร้อยละ 6.60 ในวันที่ 5 (Day_5) ของการทดลอง (4A) ผู้วิจัยมีความประสงค์ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบการรายงานผลที่เกิดขึ้นช่วง 2-5 วัน (Day_{2-5}) ของการทดลองยังคงมีความสอดคล้องกับรูปแบบการรายงานผลของวันแรก (Day_1) ที่ได้รายงานแก่แพทย์หรือไม่ ผู้วิจัยจึงทดสอบหาค่าสัมประสิทธิ์ Cohen's Kappa และแสดงผลการวิเคราะห์ดังนี้

แม้ว่าผลการตรวจวิเคราะห์ GDH/TcdA/TcdB จะมีการเปลี่ยนแปลงภายในวันที่ 2-5 (IC(day_{2-5})) แต่รูปแบบการรายงานผลยังคงไม่แตกต่างจากวันแรก (Day_1) (Kappa = 0.934) ของการตรวจ โดยแสดงให้เห็นว่าค่าวิเคราะห์ความสอดคล้องกันของผลการตรวจด้วยวิธี IC

Table 4 The Cohen's Kappa coefficient of result patterns crossing within IC method from Day_1 to Day_5 in the experiment.

Pattern/IC method	IC (day_1)	IC (day_2)	IC(day_3)	IC (day_4)	IC(day_5)
IC (day_1)		0.943	0.934	0.934	0.934
IC (day_2)			0.981	0.972	0.962
IC (day_3)				0.972	0.981
IC (day_4)					0.953
IC (day_5)					

ภายในวันที่ 1 ถึง 5 ของการทดลอง (IC (day_{1-5})) (Table 5) อยู่ในระดับ Almost perfect (Kappa = 0.934-0.981) (Table 1) อย่างไรก็ตามหากเก็บอุจจาระเพื่อรอการตรวจด้วยวิธี IC ต่อไปจะส่งผลให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 4.90 ในวันที่ 2 (Day_2) และเพิ่มขึ้นอีกถึงร้อยละ 6.60 ในวันที่ 5 (Day_5) แสดงให้เห็นว่าหากเก็บอุจจาระไว้ที่ 4 °C เพื่อรอการตรวจในวันที่ 2 ถึง 5 ส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสอาจพลาดการได้รับการรักษาประมาณร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 6 อย่างไรก็ตามเคยมีการศึกษาในอดีตรายงานว่าวิธีการตรวจโดยวิธี EIA มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (Severe outcome) [25] แต่ยังมีข้อมูลน้อยสำหรับวิธี IC ซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจในการศึกษาประโยชน์ของการตรวจด้วยวิธี IC การรักษาและความรุนแรงทางคลินิกของโรค CDI ต่อไปในอนาคต

4. สรุป

จากการศึกษานี้พบว่า Critical day เท่ากับ 2 แนะนำควรตรวจอุจจาระด้วยวิธี IC ภายใน 1 วัน เนื่องจากการเก็บอุจจาระที่ 4ºC เพื่อรอตรวจวิเคราะห์นานเกิน 1 วันจะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี IC เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปจากวันแรก (Day_1) เพราะอาจมีหลายปัจจัยเช่นการสลายตัวของสารพิษ ปัจจัยทางชีวภาพของเชื้อในสภาวะอุณหภูมิที่ลดลงส่งผลให้เกิดรูปแบบของผลการตรวจวิเคราะห์ที่บ่งชี้ถึงความรุนแรงของโรคลดลงอาจทำให้ผู้ป่วยพลาดโอกาสเข้ารับการรักษา สำหรับการตรวจด้วยวิธี IC ทันทีภายในวันแรกอาจช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ด้านการจัดเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สามารถใช้เป็นแนวทางกำหนดนโยบายการปฏิบัติต่อสิ่งส่งตรวจเพื่อให้มีความเหมาะสมและยอมรับได้กับศักยภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีปัจจัยและเงื่อนไขจำกัด

5. กิตติกรรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.ทนพ.อนุรักษ์ เชื้อมั่ง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ที่ช่วยให้คำปรึกษาแนะนำด้านวิชาการและโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ปีงบประมาณ 2565

ขอยืนยันว่าการศึกษานี้ไม่มีผลประโยชน์หรือส่วนได้ส่วนเสียใดๆ

6. References

[1] Janoir, C., 2016, Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection, Anaerobe. 37: 13-24.

[2] Putsathit, P., Maneerattanaporn, M., Piewngam, P., Knight, D. R. and Riley, T. V., 2017, Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated in Thailand, Antimicrob. Resist. Infect. Control. 6: 1-6.

[3] Imwattana, K., Putsathit, P., Leepattarakit, T., Kiratisin, P. and Riley, T. V., 2020, Mild or malign: clinical characteristics and outcomes of *Clostridium difficile* infection in Thailand, J. Clin. Microbiol. 58(9): 1217-1220.

[4] Imwattana, K., Wangroongsarb, P. and Riley, T. V., 2019, High prevalence and diversity of *tcdA*-negative and *tcdB*-positive and non-toxigenic *Clostridium difficile* in Thailand, Anaerobe. 57: 4-10.

[5] Imwattana, K., Knight, D. R., Kullin, B., Collins, D. A., and Riley, T. V., 2019, *Clostridium difficile* ribotype 017 - characterization evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia, Emerg. Microbes. Infect. 8: 796-807.

[6] Sholeh, M., Kouhsari, E., Talebi, M., Hallajzadeh, M. and Amirmozafari, N., 2021, Toxin gene profiles and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* infection: a single tertiary care center study in Iran, Iran. J. Microbiol. 13(6): 793-800.

[7] Becker, S. L., Chatigre, J. K., Coulibaly, J. T., Mertens, P. and von Müller, L., 2015, Molecular and culture-based diagnosis of *Clostridium difficile* isolates from Côte d'Ivoire after prolonged storage at disrupted cold chain conditions, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 109(10): 660-668.

[8] Schora, D. M., Peterson, L. R. and Usacheva, E. A., 2018, Immunological stability of *Clostridium difficile* toxins in clinical specimens, Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 39(4): 434-438.

[9] Nho, S. W., Kim, M., Kim, S. J., Foley, S. L. and Cerniglia, C. E., 2021, Pragmatic strategy for fecal specimen storage and the corresponding test methods for *Clostridioides difficile* diagnosis, Pathogens. 10(8): 1-13.

[10] Borriello, S. P., Vale, T., Brazier, J. S., Hyde, S. and Chippeck, E., 1992, Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit for the detection of *Clostridium difficile* toxin A, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11(4): 360-363.

[11] Bowman, R. A. and Riley, T. V., 1986, Isolation of *Clostridium difficile* from stored specimens and comparative susceptibility of various tissue culture cell lines to cytotoxin, FEMS. Microbiol. Lett. 34: 31-35.

[12] Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P. and Krishna, S., 2008, Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: A systematic review, Lancet. Infect. Dis. 8(12): 777-784.

[13] Operon Immune and Molecular Diagnostics, 2025, Simple GDH-Toxins, Available Source: https://www.operondx.com/wp-content/uploads/pdf/instructions/0905144_GDH-Toxins_web.pdf, February 21, 2025.

[14] McHugh, M. L., 2012, Interrater reliability: The kappa statistic, Biochem. Med. 22(3): 276-282.

[15] Kvach, E. J., Ferguson, D., Riska, P. F. and Landry, M. L., 2010, Comparison of BD GeneOhm *C. diff* real-time pcr assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection, J. Clin. Microbiol. 48: 109-114.

[16] Novak-Weekley, S. M., Marlowe, E. M., Miller, J. M., Cumpio, J. and Weissfeld, A., 2010, *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms, J. Clin. Microbiol. 48(3): 889-893.

[17] Sharp, S. E., Ruden, L. O., Pohl, J. C., Hatcher, P. A. and Ivie, W. M., 2010, Evaluation of the *C.Diff* quik chek complete assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease, J. Clin. Microbiol. 48(6): 2082-2086.

[18] Alcalá L., 2013, Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: past, present, and future, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 31(2): 65-67.

[19] Grześkowiak, Ł., Riedmüller, J., Vahjen, W. and Zentek, J., 2020, Storage procedures and time influence the detectability of *Clostridium difficile* toxin A but not toxin B in porcine fecal specimens, J. Vet. Diagn. Invest. 32(2): 222-225. Top of Form

[20] Aichinger, E., Schleck, C. D., Harmsen, W. S., Nyre, L. M. and Patel, R., 2008, Nonutility of repeat laboratory testing for detection of *Clostridium difficile* by use of pcr or enzyme immunoassay, J. clin. Microbiol. 46(11): 3795-3797.

[21] Cardona, D. M. and Rand, K. H., 2008, Evaluation of repeat *Clostridium difficile* enzyme immunoassay testing, J. Clin. Microbiol. 46(11): 3686-3689.

[22] Barbut, F., Surgers, L., Eckert, C., Visseaux, B. and Lalande, V., 2014, Does a rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection impact on quality of patient management?, Clin. Microbiol. Infect. 20(2): 136-144.

[23] Freeman, J. and Wilcox, M. H., 2003, The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces, J. Clin. Pathol. 56(2): 126-128.

[24] Barbut, F., Beaugerie, L., Delas, N., Fossati-Marchal, S. and Petit, J. C., 1999, Comparative value of colonic biopsy and intraluminal fluid culture for diagnosis of bacterial acute colitis in immunocompetent patients. infectious colitis study group, Clin. Microbiol. Infect. 29(2): 356-360.

[25] Planche, T. D., Davies, K. A., Coen, P. G., Finney, J. M. and Wilcox, M. H., 2013, Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection, Lancet. Infect. Dis. 13(11): 936-945.