Modified pre-PCR protocol for detection of bacteria in blood samples of patients with sepsis.

Miss Phanni Wanthong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences
Common Course
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

การปรับปรุงขั้นตอนก่อนการทำพีซีอาร์ เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

น.ส.พรรณี วรรณทอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Modified pre-PCR protocol for detection of bacteria in blood samples of patients with sepsis.
By	Miss Phanni Wanthong
Field of Study	Medical Sciences
Thesis Advisor	Professor SHANOP SHUANGSHOTI, M.D.
Thesis Co Advisor	Professor THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D. Assistant Professor Abhinbhen Saraya Wasontiwong, M.D.

Accepted by the FACULTY OF MEDICINE, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master of Science

..... Dean of the FACULTY OF MEDICINE
(Associate Professor CHANCHAI SITTIPUNT, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor PADET SIRIYASATIEN, M.D., PH.D.)

..... Thesis Advisor
(Professor SHANOP SHUANGSHOTI, M.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Professor THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Abhinbhen Saraya Wasontiwong, M.D.)

..... Examiner
(Associate Professor ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D.)

..... External Examiner
(Major General Jariyanart Gaywee, Ph.D.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พรรณี วรรณทอง : การปรับปรุงขั้นตอนก่อนการทำพีซีอาร์ เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด. (Modified pre-PCR protocol for detection of bacteria in blood samples of patients with sepsis.) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. นพ.ชนพ ช่วงโชติ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา,ผศ. พญ.อภิญญ์เพ็ญ สาระยา วสันติวงศ์

ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด และ ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ มีการดำเนินโรคอย่างรวดเร็วและ รุนแรง เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด ที่มีความรวดเร็ว และ มีความจำเพาะ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงขั้นตอนก่อนการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ และ ประเมินประสิทธิภาพ วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ เทียบกับ วิธีพีซีอาร์ปกติ และ วิธีเพาะเชื้อจากเลือด โดยศึกษาในตัวอย่างเลือดผู้ป่วย 16 ราย ที่มีอาการทางคลินิกของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด โดยการแยกส่วนประกอบของเลือด เป็นเลือดครบส่วน น้ำเลือด บัฟฟีโคท และ เซลล์เม็ดเลือดขาว รวมทั้งหมด 64 ตัวอย่าง ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม และตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ และ พีซีอาร์ปกติ ผลการศึกษาพบว่า วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ได้อย่างจำเพาะ และ มีความไวกว่าวิธีพีซีอาร์ปกติ โดยที่สามารถพบเชื้อแบคทีเรียที่ปริมาณ 1,000 copies/µl และเปรียบเทียบผล ของวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ กับ วิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือด พบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ในตัวอย่างน้ำเลือด และ เลือดครบส่วน 2 ตัวอย่าง แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากเลือด และ พีซีอาร์ปกติ และ 62 ตัวอย่างไม่พบเชื้อด้วยวิธีทั้งหมด ทั้งนี้ตรงตามลักษณะอาการของผู้ป่วย และ วิธีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะทุกประการ ดังนั้น วิธีแยกส่วนประกอบของเลือดเพื่อปรับปรุงขั้นตอนก่อนพีซีอาร์ ร่วมกับ วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ จึงเป็นอีกทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดทางห้องปฏิบัติการ ด้วยความรวดเร็วขึ้น มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ช่วยในการเลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ให้มีการพยากรณ์โรคที่ดีขึ้น และ ลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

6074072030 : MAJOR MEDICAL SCIENCES
KEYWORD: sepsis septic shock bacteria real-time PCR

Phanni Wanthong : Modified pre-PCR protocol for detection of bacteria in blood samples of patients with sepsis.. Advisor: Prof. SHANOP SHUANGSHOTI, M.D. Co-advisor: Prof. THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D.,Asst. Prof. Abhinbhen Saraya Wasontiwong, M.D.

Sepsis and septic shock are leading causes of deaths in hospitals. The most common cause of blood stream infection is bacteria. To reduce mortality, a rapid and accurate bacterial detection in sepsis patients is essential. It is necessary to identify pathogens based on their species for appropriate choice of antibiotics. In this study, we aimed to improve the pre-PCR procedure for detection of bacteria in blood samples and to compare the performance between real-time PCR, conventional PCR and blood culture. Blood samples from 16 sepsis patients were separated into whole blood, plasma, buffy coat and white blood cell. Bacterial nucleic acid was extracted and used to identify whether it is gram-positive or gram-negative bacteria using conventional PCR and real-time PCR with TaqMan probes. Two samples, whole blood and plasma components, were positive by real-time PCR using this protocol but negative by blood culture and conventional PCR. Results were in record with clinical data and therapeutic response. The limit of detection of real-time PCR with probe is 1,000 copies/µl of plasmid DNA. Therefore, blood separation is necessary to improve sensitivity of real-time PCR and TaqMan probe in identifying gram-positive and gram-negative bacteria this may be beneficial for early detection and proper antibiotic selection and may be useful to treat patients with sepsis.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Medical Sciences
Academic Year: 2021

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-advisor's Signature .....
Co-advisor's Signature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ศ.นพ.ชนพ ช่วงโชติ ท่านอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษาแนะนำ และ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการแก้ไขข้อบกพร่อง อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา และ ผศ.พญ.อภิญญ์เพ็ญ สาระยา วสันติวงศ์ เป็นอย่างสูง ที่ให้โอกาส และ กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะในการแก้ไขปัญหาตลอดจนเป็นกำลังใจ และ เป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยมีแรงบันดาลใจในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความถูกต้อง สำเร็จตามวัตถุประสงค์

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ ศ.ดร.นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร รศ.ดร.อริยา จินดามพร และ พล.ต.ดร.จริยานาฏ (โกมลมิศร์) เกวี ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ และ ให้ความรู้ คำแนะนำ และ ชี้แนะแนวทางในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ภาสิน เหมะจุฑา และ นายแพทย์ภูษณุ ธนาพรสังสุทธิ์ สำหรับความช่วยเหลือในการคัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วย ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิจัยได้ภายใต้สถานการณ์แพร่ระบาดของโรคโควิด-19

ขอขอบคุณ น.ส.ชนิดา รุจิศรีสาโรช น.ส.สินินาถ เพชราช น.ส.ธีรดา พลพินิจ และ นายธีระวัฒน์ ศุภรัฐปริยกรณ์ สำหรับคำแนะนำ และ ความช่วยเหลือ ในระหว่างการทำวิจัย และ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวก สนับสนุน ทั้งในด้านการใช้เครื่องมือเพื่อทำวิจัย และ เป็นกำลังใจ กระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่สนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ และ ทุนในการศึกษาวิจัย ตลอดจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี

คุณค่า และ ประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบให้แทนกตญัญูกตเวทิตาแด่ บุพการี คณาจารย์ และ ผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีต และ ปัจจุบัน ที่ช่วยให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษา และ สามารถนำความรู้มาใช้ให้เกิดประโยชน์แก่ส่วนรวม

Phanni Wanthong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

TABLE OF CONTENTS

Page

..... iii

ABSTRACT (THAI)..... iii

..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... iv

ACKNOWLEDGEMENTS.....v

TABLE OF CONTENTS..... vi

สารบัญตาราง..... viii

สารบัญรูปภาพ..... ix

บทที่ 1 บทนำ.....1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale).....1

คำถามงานวิจัย (Research question).....4

สมมติฐานการวิจัย (Research hypothesis).....4

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objective).....4

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation).....5

ผลของการวิจัยต่อการพัฒนาองค์ความรู้และการนำไปใช้ (Implication).....5

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....6

คำสำคัญ (Key words).....6

กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....7

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....8

แบคทีเรีย (Bacteria).....8

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด.....14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) 22
การตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ 25
วิธี real-time PCR 28
การเพาะเชื้อจากเลือด (Blood culture) 34
Human blood component 36
ชุดแยกเซลล์ EasySep™ Direct cell separation kit 38
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 39
ประชากรตัวอย่าง 39
วิธีการวิจัย (Experimental method) 39
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ 55
REFERENCES 64
ภาคผนวก 69
ภาคผนวก ก 69
ภาคผนวก ข 70
ภาคผนวก ค 71
ภาคผนวก ง 75
ภาคผนวก จ 77
ภาคผนวก ฉ 79
VITA 82

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

Page

ตาราง 1 แบคทีเรียชนิด Intracellular pathogens การก่อโรค และ กลไกการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของ host cell 21

ตาราง 2 แสดงประสิทธิภาพของการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี real-time PCR 34

ตาราง 3 Some properties of human blood component. 36

ตาราง 4 แสดงรายละเอียดของ primers และ probes ที่ใช้ในการศึกษา 41

ตาราง 5 Bacteria PCR master mix 42

ตาราง 6 Condition for real-time PCR 42

ตาราง 7 ผลการทดสอบความจำเพาะของชุด primers /probes ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ 47

ตาราง 8 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด 52

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

Page

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย 7

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของแบคทีเรีย 8

ภาพประกอบ 3 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ 9

ภาพประกอบ 4 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ 12

ภาพประกอบ 5 The schema of ribosome complex and 16S rRNA gene 13

ภาพประกอบ 6 Sequential [Sepsis- related] Organ Failure Assessment: SOFA score 23

ภาพประกอบ 7 Pathophysiology of sepsis 25

ภาพประกอบ 8 Hydrolysis probes (TaqMan® assay) 30

ภาพประกอบ 9 Amplification plot 31

ภาพประกอบ 10 Typical EasySep™ Direct Protocol 40

ภาพประกอบ 11 แสดงความจำเพาะของชุด primers / probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยโปรแกรม BioEdit 46

ภาพประกอบ 12 แสดงผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของชุด primers /probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 49

ภาพประกอบ 13 แสดงผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของชุด primers /probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 49

ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธี Conventional PCR (V1-V3 = ~ 528 bp)..... 71

ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธี Conventional PCR (V1-V9 = ~ 1384 bp)..... 72

ภาพประกอบ 16 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Conventional PCR (V1-V3 = ~ 528 bp) 73

ภาพประกอบ 17 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Conventional PCR (V1-V9 = ~ 1384 bp) 74

ภาพประกอบ 18 EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation KIT Protocol..... 75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพประกอบ 19 EasySep™ Direct Human Pan-Granulocyte Isolation KIT Protocol 76

ภาพประกอบ 20 EasySep™ Direct Human Total lymphocyte Isolation KIT Protocol 77

ภาพประกอบ 21 Conserve alignment 16S rRNA Forward primer. 77

ภาพประกอบ 22 Conserve alignment 16S rRNA Reverse primer. 78

ภาพประกอบ 23 Conserve alignment 16S rRNA gram-negative probe. 78

ภาพประกอบ 24 Conserve alignment 16S rRNA gram-positive probe. 78

ภาพประกอบ 25 Specificity results of gram-positive probes. 79

ภาพประกอบ 26 Specificity results of gram-negative probes. 79

ภาพประกอบ 27 Sensitivity results of gram-negative probes. 80

ภาพประกอบ 28 Sensitivity results of gram-positive probes. 80

ภาพประกอบ 29 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR 81

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

โรคติดเชื้อ (Infectious disease) หมายถึง โรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก โดยเรียกสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ก่อโรคเหล่านี้ว่า pathogen หรือ infectious agent ได้แก่ ไวรัส (Viruses), แบคทีเรีย (Bacteria), เชื้อรา (Fungus), โพรโตซัว (Protozoa), แคลมมีเดีย (Chlamydia), ริกเกตเซีย (Rickettsia) และ ไมโคพลาสมา (Mycoplasmas) การติดเชื้อจุลชีพ บริเวณอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย สามารถนำไปสู่ภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) คือ ภาวะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อ หรือ สารพิษของเชื้อโรค ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นทั่วบริเวณของร่างกาย ส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย หากมีความรุนแรงมากอาจพัฒนาไปสู่สภาวะช็อก และ การทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ล้มเหลวมีอันตรายถึงชีวิต (1-3) ส่วนใหญ่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

อุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดทั่วโลกในปี พ.ศ. 2560 รายงานพบผู้ติดเชื้อในกระแสเลือดทั่วโลก 48.9 ล้านคน และ มีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อ 11 ล้านคนคิดเป็นร้อยละ 20 ของผู้เสียชีวิตจาสาเหตุ ทั้งหมดทั่วโลก ในจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมด 48.9 ล้านคน พบว่า 33.1 ล้านคน เป็นผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อจากการที่ร่างกายมีภูมิต้านทานลดลง และ 15.8 ล้านคน เกิดขึ้นในผู้ที่มีภาวะแทรกซ้อนจากการบาดเจ็บ และ โรคไม่ติดต่อ และ ในปี พ.ศ. 2560 มีการติดเชื้อจำนวน 20 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 41 ของผู้ติดเชื้อทั่วโลกเกิดในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี นอกจากนี้ในประเทศที่มีดัชนีทางสังคมเศรษฐกิจในระดับต่ำ และ ปานกลาง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศในแถบภูมิภาคแอฟริกาใต้ และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบผู้ติดเชื้อร้อยละ 85 และ มีผู้เสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 84.8 (4-6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

อุบัติการณ์ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดในประเทศไทยมีการรายงานสถานการณ์จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุข และ สำนักหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ พบว่าภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของผู้ป่วยในโรงพยาบาล และ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดประมาณ 175,000 คนต่อปี และมีผู้ป่วยเสียชีวิต ประมาณ 45,000 คนต่อปี จากข้อมูลพบว่าในทุก ๆ 3 นาที จะมีผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด 1 คน และ มีผู้ป่วยเสียชีวิต 5 คนทุก 1 ชั่วโมง โดยอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดในประเทศไทยรอบปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 อยู่ที่ร้อยละ 32.03

อัตราการป่วย และ การเสียชีวิตของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเกี่ยวข้องกับความเร็วในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไม่ทราบสาเหตุ โดยทั่วไปจะวินิจฉัยจากอาการของผู้ป่วย ทำการเจาะเลือด สารคัดหลั่ง หรือ เก็บชิ้นเนื้อจากบริเวณอวัยวะที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อเพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ตรวจหาชนิดของเชื้อก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันนั้นยังมีข้อจำกัด วิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือด(7) เมื่อเลี้ยงได้โคโลนีเดี่ยวจึงนำไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยกชนิดของเชื้อซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อนานประมาณ 3-5 วัน โดยผู้เชี่ยวชาญ และทำในห้องห้องปฏิบัติการเฉพาะ และ กรณีมีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดแพทย์ต้องวินิจฉัยเบื้องต้น และ เลือกให้ยาปฏิชีวนะที่ครอบคลุมเชื้อไว้ก่อน ซึ่งหากผู้ป่วยได้รับยาที่ตรงกับเชื้อผู้ป่วยจะมีโอกาสรอดชีวิตสูง แต่หากได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับเชื้อช้าเกินไปผู้ป่วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการดื้อยา และ เสียชีวิตมากขึ้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการให้สามารถตรวจหาชนิดของเชื้อก่อโรคได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และ รวดเร็ว เพื่อช่วยแพทย์ในการวินิจฉัย และ รักษาผู้ป่วย

เทคโนโลยีระดับอณูชีวโมเลกุล ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในหลายสาขาเช่น ห้องปฏิบัติการชีววิทยาภูมิคุ้มกัน โรคมะเร็ง โรคทางพันธุกรรม และโรคติดเชื้อ วิธี real-time PCR เป็นเทคโนโลยีทางอณูชีวโมเลกุลที่มีการพัฒนามาใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ถูกพัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม ให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมพร้อมกับการตรวจวัด โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมา ซึ่งการตรวจวัดแบบ real-time detection ให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการตรวจวัดแบบ end-point detection และสามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งในเชิงคุณภาพ และ เชิงปริมาณ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเชื้อแต่ละชนิด และ เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาเชื้อที่ต้องการได้แม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย (8-11) ตรวจหาสารพันธุกรรมได้หลายตำแหน่งในครั้งเดียว และ ติดตามผลการตรวจได้ขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการตรวจสอบปฏิกิริยาหลังพีซีอาร์ ทำให้ลดโอกาสในการปนเปื้อนซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม และ ลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากได้สารพันธุกรรม อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี real-time PCR อาจมีประสิทธิภาพลดลงได้ จากการรบกวนปฏิกิริยาจากสารต่าง ๆ ในส่วนประกอบของเลือด เช่น hemoglobin, immunoglobulin G และ anticoagulant (12) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหานี้ และ เพื่อเพิ่มคุณภาพของสารพันธุกรรม การลดปริมาณสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่อยู่ในส่วนประกอบของเลือดจึงมีความจำเป็น และ สมควรจะถูกรวมไว้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ก่อนที่จะดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี real-time PCR เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือด โดยจะเริ่มจากกระบวนการแยกส่วนประกอบของเลือดก่อนนำมาสกัดสารพันธุกรรม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาส่วนประกอบของเลือดที่เหมาะสมทั้งในด้านปริมาณ และ คุณภาพ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งชนิดที่อยู่ในเซลล์ และ นอกเซลล์ และเพื่อลดสารยับยั้งในปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้

สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพ และ ปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อที่เหมาะสมในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR ชนิด TaqMan Probes

เนื่องจากการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นการติดเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งอื่น ๆ และ ลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดไปยังทั่วร่างกาย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอาจมาจากระบบหรืออวัยวะใดก็ได้ และเป็นเชื้อชนิดใดก็ได้ เมื่อเชื้อแบคทีเรียแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด เชื้ออาจเข้าไปอาศัยอยู่ในเลือด หรือ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเท่านั้น หรือเชื้อบางชนิดสามารถมีชีวิต และ เพิ่มจำนวนได้ทั้งในเลือด และในเซลล์เม็ดเลือดขาว เชื้อก่อโรคชนิด Extracellular bacteria เช่น เชื้อในกลุ่ม *streptococcus* และ *Klebsiella* สามารถพบได้ในเลือดเท่านั้น หรือ เชื้อก่อโรคชนิด Intracellular bacteria ที่สามารถเจริญ และ อาศัยอยู่ได้ทั้งในเลือด และ ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Mycobacterium tuberculosis* ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเชื้อแต่ละชนิด หากเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดขึ้นซึ่งถือเป็นภาวะรุนแรงฉุกเฉินที่อาจทำให้ผู้ป่วยช็อก และเสียชีวิตได้ กระบวนการแยกส่วนประกอบของเลือดก่อนนำมาตรวจหาเชื้อ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ส่วนของเลือดที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างจำเพาะ และครอบคลุมเชื้อที่อาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทั้งหมด รวมทั้งเป็นการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเชื้อในกรณีการติดเชื้อที่มีปริมาณเชื้อแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดในปริมาณยังไม่มากนัก และ แพทย์สงสัยมีการติดเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ การแยกส่วนประกอบของเลือดโดยการแยกเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาว หรือ บัฟฟีโคท ช่วยให้ได้ปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อที่เข้มข้นมากขึ้นกระบวนการแยกส่วนประกอบของเลือดก่อนการตรวจหาเชื้อในงานวิจัยนี้อาจนำมาสู่การเลือกชนิดของส่วนประกอบของเลือดที่จำเพาะ และ ครอบคลุมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

กระบวนการแยกส่วนประกอบของเลือด Whole blood ที่บรรจุใน EDTA tube จะแยกเลือดออกเป็น 4 ส่วน คือ 1) เลือดครบส่วน 2) น้ำเลือด 3) บัฟฟีโคท ด้วยวิธีการปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge และ 4) เซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งในงานวิจัยนี้ หมายถึง ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด total lymphocyte, monocyte และ total granulocyte ที่ได้จากการแยก และ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด EasySep™ Cell Separation kit (STEMCELL™ Technologies) แล้วนำเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิดมารวมกันก่อนนำไปสกัดสารพันธุกรรม นำส่วนประกอบของเลือดที่แยกได้ทั้ง 4 ส่วน ไปสกัดสารพันธุกรรม และ ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี real-time PCR ในการจำแนกแบคทีเรียจะใช้ยีนเป้าหมายบริเวณ 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนเจ้าบ้านในเซลล์แบคทีเรีย มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ความแปรผันทางวิวัฒนาการต่ำ และ มีขนาดประมาณ 1.5 kb (13-15) ซึ่งเพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลเพื่อนำมาจำแนกแบคทีเรีย

ตามคุณสมบัติของวิธี real-time PCR ร่วมกับวิธีแยกส่วนประกอบของเลือด เพื่อให้ได้สารพันธุกรรมตั้งต้นที่เหมาะสม และ มีคุณภาพสูงขึ้น จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิด Intracellular และ extracellular ด้วยวิธี real-time PCR วิธีการดังกล่าวจึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษา และ พัฒนา เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด ให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และ รวดเร็วกว่าวิธีการที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการ เช่น วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR

คำถามงานวิจัย (Research question)

4.1 วิธี real-time PCR บนยีนเป้าหมาย 16S rRNA สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด มีค่าความไว และ มีความจำเพาะ เทียบเท่ากับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR หรือไม่

4.2 วิธีแยกส่วนประกอบของเลือด (white blood cell, plasma, buffy coat) ก่อนนำมาสกัดสารพันธุกรรม สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อทั้งที่อยู่ในเซลล์ และ นอกเซลล์ด้วยวิธี real-time PCR หรือไม่

สมมติฐานการวิจัย (Research hypothesis)

6.1 วิธี real-time PCR บนยีนเป้าหมาย 16S rRNA ของแบคทีเรีย สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด มีค่าความไว และ มีความจำเพาะเทียบเท่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR

6.2 สารพันธุกรรมที่ได้จากเลือดแยกส่วน น้ำเลือด และ เซลล์เม็ดเลือดขาวจากการแยกด้วยชุด EasySep™ Cell Separation kit (STEMCELL™ Technologies) มีปริมาณ และ คุณภาพที่เหมาะสม สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ทั้งที่อยู่ในเซลล์ และ นอกเซลล์ ด้วยวิธี real-time PCR

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objective)

5.1 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี real-time PCR บนยีนเป้าหมาย 16S rRNA กับวิธีเพาะเชื้อจากเลือด และ conventional PCR ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

5.2 เพื่อหาส่วนประกอบของเลือดที่เหมาะสม (white blood cell, plasma, buffy coat) และ ปรับปรุงคุณภาพของสารพันธุกรรม เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี real-time PCR

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

ข้อจำกัดของการคัดเลือกตัวอย่างในการศึกษา จำนวนตัวอย่างไม่ได้ตามที่กำหนด มีการส่งตรวจตัวอย่างน้อยลง เนื่องจากช่วงเวลาการทำวิจัยในสถานการณ์แพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 โรงพยาบาลเปิดรับผู้ป่วยน้อยลง

ผลของการวิจัยต่อการพัฒนาองค์ความรู้และการนำไปใช้ (Implication)

1. มีวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ที่สามารถระบุชนิดของเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และ รวดเร็ว เทียบเท่า หรือ มากกว่าวิธีการที่ใช้อยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เพื่อช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัย และ เลือกแนวทางรักษาผู้ป่วย เพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อที่มีอาการรุนแรง และ ต้องการได้รับการรักษาอย่างรวดเร็ว

2. สามารถนำความรู้ที่ได้จากกระบวนการวิจัยมาใช้พัฒนาชุดตรวจอื่นต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

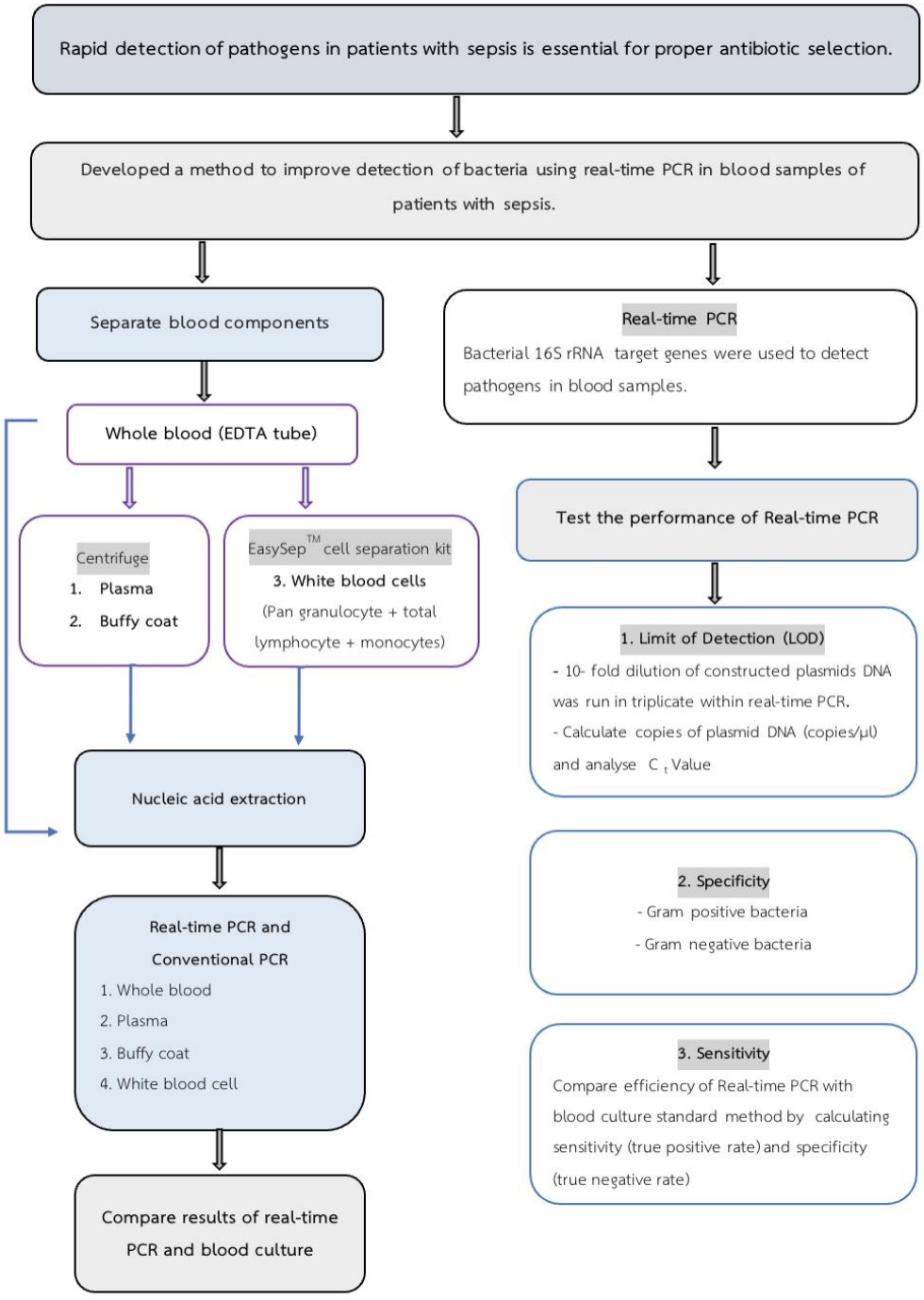
real-time PCR	=	real-time polymerase chain reaction
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
rRNA	=	ribosomal Ribonucleic Acid
Ct	=	Cycle threshold
WBC	=	White blood cell
SIRS	=	Systemic inflammatory response syndrome
SOFA	=	Sequential organ failure assessment
qSOFA	=	quick sequential organ failure assessment
LOD	=	Limit of detection
bp	=	base pair
ml	=	Milliliter
µl	=	Microliter
µM	=	Micromolar
ng	=	Nanogram

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำสำคัญ (Key words)

Real-time PCR, Bacteria, Sepsis, Septic shock, White blood cell, Blood culture

กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



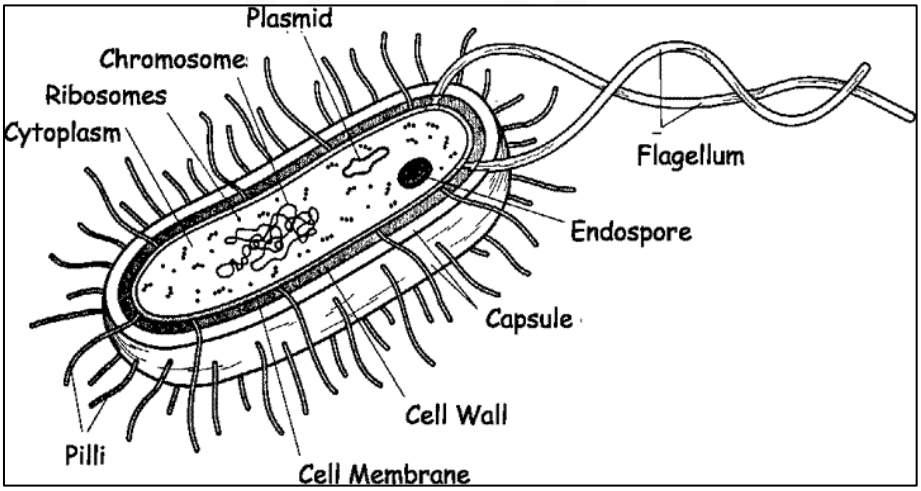
ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรีย (Bacteria)

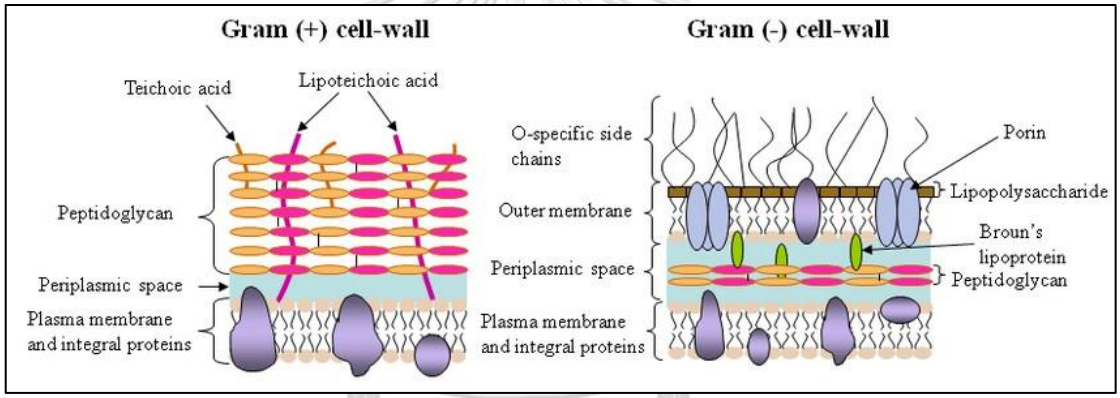
รูปร่าง ลักษณะ และ โครงสร้างของแบคทีเรีย

แบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก โดยทั่วไปมีขนาดความกว้างประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 2-5 ไมโครเมตร รูปร่างของแบคทีเรียมี 3 แบบ คือ ทรงกลม (sphere) เรียกว่าค็อกคัส (coccus) หรือ ค็อกไค (cocci) ทรงกระบอก (rod) เรียกว่าบาซิลลัส (bacillus) หรือบาซิลไล (bacilli) และรูปเกลียว (spiral) เรียกว่า สไปริลลัม (spirillum) หรือ สไปริลไล (spirilli) แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งไม่มีโครงสร้างที่สำคัญหลายชนิด เช่น ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) และ endoplasmic reticulum โดยมีโครงสร้างห่อหุ้มเซลล์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และ ผนังเซลล์ (cell wall) ทำหน้าที่ห่อหุ้มไซโตพลาซึม สารพันธุกรรม และ ออร์กาเนลล์ เพื่อให้แบคทีเรียคงรูปร่างอยู่ได้ ป้องกันเซลล์แตกจากความแตกต่างของความดันออสโมซีสระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ และ ทำให้แบคทีเรียเกิดการแบ่งเซลล์ และ มีการเจริญเติบโต ลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียดังแสดง [ภาพประกอบ 2] สามารถแบ่งชนิดของแบคทีเรียตามลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ และ เยื่อหุ้มเซลล์ได้เป็น 2 ชนิดคือ แบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) และ แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของแบคทีเรีย

โดยแบคทีเรียแกรมบวก ผนังหุ้มเซลล์จะประกอบด้วยชั้นของ peptidoglycan และ teichoic acids เมื่อย้อม gram stain จะติดสีน้ำเงิน แบคทีเรียแกรมลบมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่า มีชั้นของ peptidoglycan ที่บางกว่าในแบคทีเรียแกรมบวก มีส่วนประกอบของ phospholipid สองชั้นประกบกับชั้น peptidoglycan อยู่ตรงกลางโดยมีชั้นของ lipopolysaccharide (LPS) เป็นส่วนของเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) เมื่อทำการย้อม gram stain จะติดสีแดง ลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก และ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ดังแสดงใน [ภาพประกอบ 3] แบคทีเรียชนิดแกรมบวกมักทำให้เกิดโรคติดเชื้อเป็นหนองที่ผิวหนัง ทางเดินหายใจส่วนต้น (จมูก และลำคอ) และ ปอดบวม แบคทีเรียชนิดแกรมลบมักทำให้เกิดโรคที่ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ และถุงน้ำดี ซึ่งโครงสร้าง และ ลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียที่แตกต่างกัน มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ และ การดื้อยา



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ (17)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การติดเชื้อแบคทีเรีย และ กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรีย

การติดเชื้อแบคทีเรีย เกิดจากการรุกรานเข้าไปในเซลล์ของโฮสต์ มีการทำลายเนื้อเยื่อ และหลบหลีกกลไกภูมิคุ้มกันของร่างกายรวมถึงการผลิตสารพิษไปทำลายหรือทำให้เซลล์ทำหน้าที่ผิดปกติ กระตุ้นให้ร่างกายตอบสนองด้วยการอักเสบ มีการแบ่งตัว เพิ่มปริมาณ และ แพร่กระจายในร่างกายโดยผ่านทางระบบน้ำเหลือง และ หลอดเลือด เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นอันตรายต่อร่างกายของผู้ติดเชื้อ แบคทีเรียส่วนใหญ่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางบาดแผล การรับประทานอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน และ ทางการหายใจ หรือ ในสภาวะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในร่างกายอาจส่งผลให้เกิดโรค

ความรุนแรงของการติดเชื้อขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเชื้อ ถ้าเป็นแบคทีเรียชนิดที่สร้างสารพิษได้อาการของโรคจะรุนแรงมาก โดยแบคทีเรียชนิดแกรมบวกที่รูปร่างเป็นค็อกคัสมักทำให้เกิดการอักเสบเป็นหนองที่ผิวหนัง ต่อมทอนซิล ทางเดินหายใจ ปอด อาการมักจะไม่รุนแรง และรักษาได้ผลดีด้วยยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนิซิลลิน (penicillin) แบคทีเรียชนิดแกรมลบที่รูปร่างเป็นบาซิลลัสมักทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ไต ถุงน้ำดี ไส้ติ่ง (โรคไส้ติ่งอักเสบ) การรักษายากกว่าเพราะมักดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และ มีโอกาสที่เชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือด เกิดภาวะช็อกตามมาได้ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ถ้าผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น เป็นโรคติดเชื้อเอชไอวี โรคเบาหวาน หรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน จะทำให้ร่างกายต่อสู้กับเชื้อโรคได้ไม่ดี ทำให้มีความรุนแรงกว่าปกติ การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง และ ปฏิบัติตามคำสั่งแพทย์ โดยชนิดของยาควรจำเพาะกับชนิดของเชื้อเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อดื้อยา

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แพทย์จะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยจะติดตามสังเกตอาการของผู้ป่วย และ สืบค้นหาสาเหตุของโรค โดยการส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่จำเพาะ การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเบื้องต้นหากทราบกลุ่ม หรือ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียจะมีประโยชน์ต่อการรักษา โดยแพทย์จะอาศัยข้อมูลของ gram stain ในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะดังนี้ แบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม gram-positive bacteria ยากลุ่มที่ควรเลือกใช้ก่อนคือ vancomycin, daptomycin หรือ ampicillin กลุ่มยาที่อาจเลือกใช้รองลงมาคือ nafcillin, cefazolin หรือ ceftriaxone เป็นต้น แบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม gram-negative bacteria กลุ่มยาที่ควรเลือกใช้ก่อนเป็นอันดับแรกคือ cefepime + ciprofloxacin (or tobramycin) หรือ piperacillin/ tazobactam + ciprofloxacin (or tobramycin) กลุ่มยาที่อาจเลือกใช้คือ aztreonam + tobramycin (or ciprofloxacin หรือ imipenem + ciprofloxacin (or tobramycin) เป็นต้น

กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะจะมีผลรบกวนกระบวนการทำงาน และ ทำลายโครงสร้างของแบคทีเรีย โดยการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และ ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไป กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีเป้าหมายการออกฤทธิ์เฉพาะต่อเซลล์แบคทีเรีย และ สิ่งแวดล้อมรอบแบคทีเรียเท่านั้น โดยไม่มีผลต่อเซลล์มนุษย์ แบ่งเป็น 3 กลไกหลักคือ 1) ทำลายผนังเซลล์ และ เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย 2) ยับยั้ง หรือ รบกวนกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก 3) ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรีย (18)

ยาปฏิชีวนะแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

ยาปฏิชีวนะจะยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ โดยยาจับกับ penicillin binding proteins (PBPs) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด cross linking ของสาย peptidoglycan บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย(19) ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ penicillin, cephalosporins, carbapenems, monobactams และ glycol peptides

2. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย

เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนหรือสูญเสียหน้าที่ในการทำงาน สารน้ำต่าง ๆ จะไหลออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย (20) ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ polymyxins

3. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

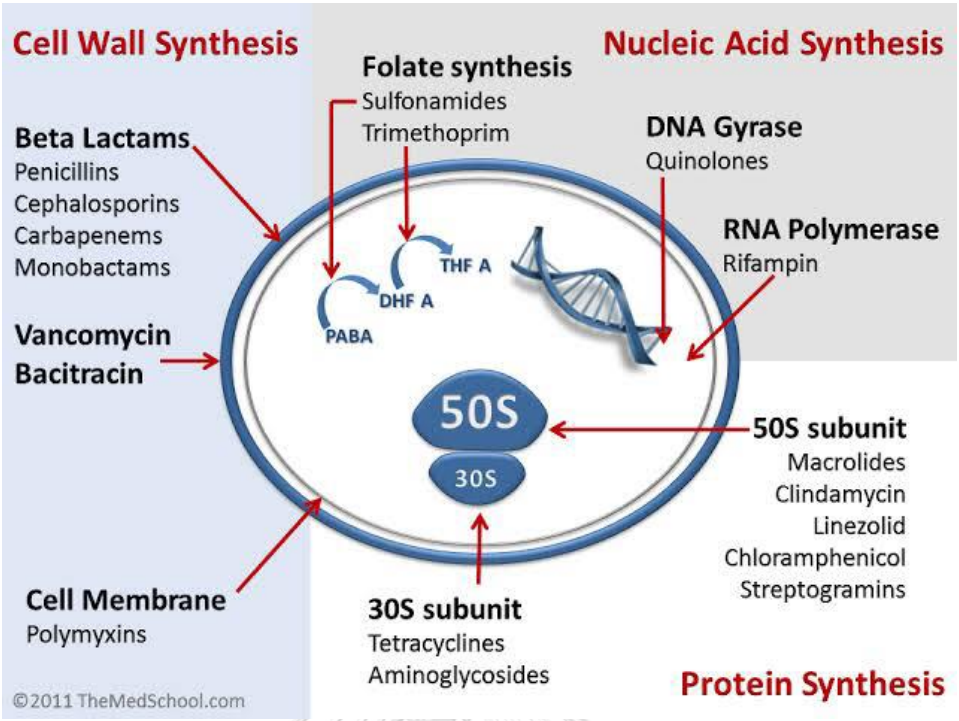
โดยในเซลล์แบคทีเรียจะมี ไรโบโซมซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนชนิด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ 30S และ 50S ซึ่งทั้ง 2 หน่วยย่อย เป็นเป้าหมายหลักของยา(20) ยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งไรโบโซมหน่วยย่อยชนิด 30S ได้แก่ amino-glycosides และ tetracyclines ยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งไรโบโซมหน่วยย่อยชนิด 50S ได้แก่ macrolide, clindamycin, linezolid, streptogramins และ chloramphenicol

4. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA จะไปยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการคลายเกลียวของ DNA ระหว่างที่มีการจำลองตัวของ DNA เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้ง ทำให้เกิดภาวะเครียดในเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ quinolone(20) ส่วนของยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA จะไปรบกวนกระบวนการ transcription ส่งผลให้ไม่เกิดการสร้าง mRNA ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ rifampin

5. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งกรดโฟลิก

กรดโฟลิกทำหน้าที่เป็น cofactor ในกระบวนการสังเคราะห์ DNA เมื่อยาไปยับยั้งจะส่งผลให้การสร้างสารพันธุกรรมของแบคทีเรียถูกรบกวนเซลล์หยุดการเจริญเติบโต (21) ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ sulfonamides และ trimethoprim กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียดังแสดงใน [ภาพประกอบ 4]



ภาพประกอบ 4 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

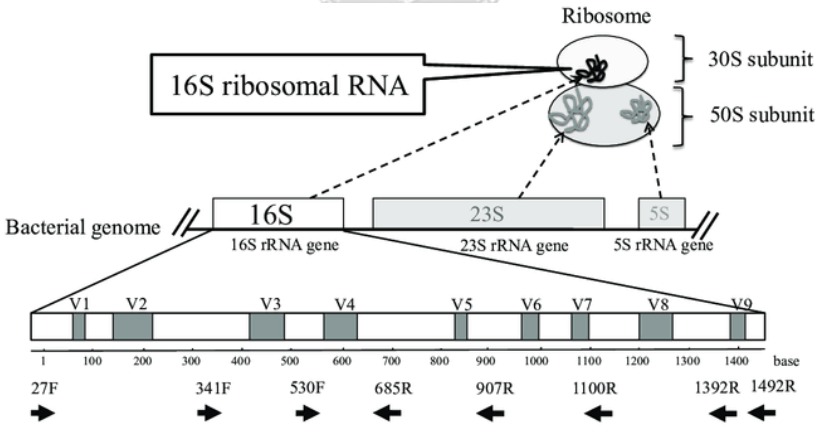
(19)

ในกรณีผู้ป่วยติดเชื้อรุนแรง แพทย์มีความจำเป็นที่จะต้องให้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุของภาวะดังกล่าวให้เร็วที่สุด โดยที่อาจจะยังไม่ทราบชนิด หรือ กลุ่มของเชื้อก่อโรค เช่นภาวะ severe sepsis แพทย์จะให้ยาทันทีหลังเจาะเลือดส่งตรวจหาเชื้อ ด้วยการให้ยาปฏิชีวนะแบบครอบคลุมเชื้อไปก่อน เนื่องจากต้องรอผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน การได้รับรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ตรงกับเชื้อก่อโรคโดยเร็วที่สุดเป็นสิ่งที่สำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อ นำไปสู่การรอดชีวิตของผู้ป่วย ลดการเกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้น การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อระบุชนิดของเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็วจึงมีความจำเป็น

ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย มีไรโบโซมขนาด 70S ประกอบด้วย 30S และ 50S โดยในส่วนของ 50S large subunit ประกอบด้วย 5S RNA (มีนิวคลีโอไทด์ 120 เบส) 23S RNA (มีนิวคลีโอไทด์ 2900 เบส) จับอยู่กับโปรตีน 34 ตัว และ 30S small subunit ประกอบด้วยไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอขนาด 16S (มีนิวคลีโอไทด์ 1540เบส) หรือ 16S rRNA จับอยู่กับโปรตีน 21 ตัว ในการ

จำแนกแบคทีเรียด้วยยีนเป้าหมายบน rRNA Operon ที่พบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้าง RNA ชนิด 5S, 16S และ 23S โดยยีน 16S rRNA ได้รับการยอมรับนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ จีนัส และ แฟมมิลี่ เนื่องจากมีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ความแปรผันทางพันธุกรรมน้อย มีขนาดเหมาะสมประมาณ 1.5 kb มีฐานข้อมูลที่เพียงพอ และ แม่นยำ เพื่อการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการ มีรายงานความแตกต่างของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียประมาณ 2500 สปีชีส์ (13, 14, 22) สำหรับยีน 23S ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยกว่ายีน 16S rRNA เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ ประมาณ 3 kb และฐานข้อมูลการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการยังไม่สมบูรณ์ ไม่เพียงพอในการเปรียบเทียบ ในส่วนของยีน 5S rRNA มีขนาด 120 bp มีขนาดเล็ก ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อย และ ไม่สามารถจำแนกแบคที่เรียในระดับสปีชีส์ได้ (13) รูปแบบโครงสร้างของไรโบโซม และ 16S rRNA gene ซึ่งนิยมใช้เป็นยีนเป้าหมายในการจำแนกแบคทีเรียดังแสดงใน [ภาพประกอบ 5] โดยบริเวณกล่องสีขาวเป็น conserved regions ของลำดับยีนที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียส่วนใหญ่ และ กล่องสีเทา (V1-V9)) เป็น hyper variable regions เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายและมีความแปรผันสูง ลูกศรสีดำแสดงตำแหน่งของ universal primers บนยีน 16S rRNA ของ *Escherichia coli*



ภาพประกอบ 5 The schema of ribosome complex and 16S rRNA gene (15)

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

1. เชื้อกลุ่ม *Staphylococcus spp.*

เป็นแบคทีเรียชนิด pyogenic gram-positive cocci แบ่งเป็นกลุ่ม *Staphylococcus aureus* และ Coagulase-negative staphylococci ซึ่งหลายสปีชีส์ก่อโรคในมนุษย์และทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

- *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก สามารถมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เชื้อแพร่กระจายอยู่ในเลือดครบส่วน น้ำเลือด ของเหลวในร่างกาย และ บางสายพันธุ์ของ *S. aureus* สามารถพบอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาว S. *aureus* สามารถอยู่รอดได้ภายในเซลล์หลายชนิดรวมทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดใหญ่ (23) การกระจายของเชื้อสามารถเกิดจากการสัมผัสเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุดของอาการอักเสบ มี หนอง (suppurative infection) บริเวณผิวหนัง สามารถกระจายทั้งทางกระแสเลือด หรือทางบาดแผลโดยตรง และ ทำให้มีการอักเสบ เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อเนื่องจากการผ่าตัด การบาดเจ็บ หรือ การใช้หลอดเลือดอุปกรณ์เช่นสายสวน เมื่อเชื้อแบคทีเรียได้เข้าสู่กระแสเลือดสามารถติดเชื้อบริเวณอวัยวะต่าง ๆทำให้เยื่อบุหัวใจอักเสบติดเชื้อ และ ภาวะปอดอักเสบซึ่งมักพบในการติดเชื้อจากโรงพยาบาล มีการทำลายเนื้อปอด เชื้อดังกล่าวมีการดื้อยาในกลุ่ม methicillin (methicillin resistance *S. aureus*: MRSA) หากไม่มีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ พบอัตราการเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อ *S. aureus* ประมาณร้อยละ 80 และ กรณีมีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอัตราการเสียชีวิตร้อยละ15 ถึง ร้อยละ 50 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุ และ สุขภาพของผู้ป่วย

Coagulase-negative Staphylococci เป็นเชื้อที่สามารถปนเปื้อนกับสิ่งแปลกปลอมที่ใส่เข้าสู่ร่างกาย หรือเชื้อยู่ใน intravascular surface เช่น ในสายสวนหลอดเลือด และ กระจายเข้าสู่กระแสเลือดได้ เป็นชนิด extracellular bacteria อาศัยอยู่ในเลือดครบส่วน น้ำเลือด และ ของเหลวในร่างกาย เชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่

- *Staphylococcus epidermidis* เจริญได้ดีในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถสร้างสารเมือก (slime) ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยให้เชื้อเกาะติดกับอุปกรณ์ที่ใส่เข้าไปในร่างกาย และ เยื่อบุร่างกายได้ พบเชื้อบริเวณผิวหนัง และ เยื่อเมือก (mucosa) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ใส่สายสวนปัสสาวะเป็นเวลานาน และ ติดเชื้อบริเวณลิ้นหัวใจในผู้ที่ใช้ลิ้นหัวใจเทียม โดยปกติเชื้ออาศัยอยู่บนผิวหนังของมนุษย์จัดเป็นเชื้อไม่ก่อโรคแต่อาจก่อโรคได้ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ติดเชื้อจากการผ่าตัด และ ติดเชื้อในโรงพยาบาล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- *Staphylococcus saprophyticus* สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะเจริญได้ช้า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้เกิดการติดเชื้อทางเดินปสสาวะ และ มีการแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดได้

- เชื้อ *Staphylococcus haemolyticus* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 18 ถึง 45 องศาเซลเซียส ทั้งในภาวะที่มี และ ไม่มีออกซิเจน เป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง และ เยื่อบุโพรงจมูก เกี่ยวข้องกับการเกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และ มีการแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดได้

2. เชื้อกลุ่ม *Streptococcus spp.*

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด pyogenic gram-positive cocci เป็น extracellular bacteria มีชีวิต และ เจริญเติบโตภายนอกเซลล์ เชื้อแพร่กระจายอยู่ในเลือดครบส่วน น้ำเลือด ของเหลวในร่างกาย บางชนิดมีแคปซูล (capsule) แต่บางชนิด ไม่มีแคปซูล แคปซูลสามารถป้องกันการทำลายของภูมิคุ้มกันผ่านทางกลไก complement แบบ alternative pathway เชื้อที่มีความสำคัญได้แก่ (24)

- *Streptococcus pneumoniae* เป็นสาเหตุสำคัญที่พบบ่อยของการติดเชื้อที่หูชั้นกลาง ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดในเด็ก ทำให้เกิดโรคปอดบวม และ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นชนิด extracellular bacteria มีการแพร่กระจายของเชื้อเมื่อพบเชื้อในเลือดครบส่วน น้ำเลือด และ น้ำไขสันหลัง หรือ บริเวณที่ปลอดเชื้ออื่น ๆ ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยรุนแรงในเด็ก ผู้สูงอายุ และ ผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

- *Streptococcus pyrogens* เป็นเชื้อกลุ่ม Beta-hemolytic streptococci แกรมบวก เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคได้หลายชนิด สามารถทำให้เกิดโรคทั้งแบบที่ไม่รุกราน ได้แก่ อาการเจ็บคอ พุพอง การอักเสบของหูชั้นกลาง และการติดเชื้อที่บาดแผล และ การเกิดโรคแบบรุกรานได้แก่ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด โรคข้ออักเสบติดเชื้อ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นชนิด extracellular bacteria

- *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* group B) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในสตรี และ เด็กทารกแรกเกิดหลังการคลอดบุตร เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ปอดอักเสบ และ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยเฉพาะในทารกคลอดก่อนกำหนด เนื่องจาก *S. agalactiae* เป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องคลอดสามารถแพร่เข้ากระแสเลือดระหว่างการคลอดได้ นอกจากนี้ยังพบเป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินหายใจส่วนบน ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ และผิวหนังของคน การติดเชื้อ *S. agalactiae* ในคนทั่วไปทำให้เกิดโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ

การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และ เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง และ มักพบในกลุ่มคนที่มีภูมิต้านทานโรคต่ำ เช่น ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน มะเร็ง เอดส์ ตับแข็ง ไตวาย โรคหัวใจ และ โรคทางสมอง การรักษาโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* แพทย์จะวินิจฉัยโรคจากการตรวจพบเชื้อในอวัยวะที่ติดเชื้อในเลือดครบส่วน น้ำเลือด และ น้ำไขสันหลังของคนไข้ สามารถรักษาได้ด้วยยาเพนนิซิลลิน

3. เชื้อกลุ่ม *Enterococcus*

เป็นเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) ขนาด 0.5-1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และ ระบบปัสสาวะของมนุษย์ และ สัตว์ แต่เป็นแบคทีเรียก่อโรคได้เช่นกัน เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในอัตราที่สูงรองจากเชื้อ *staphylococci* มักทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด และ การติดเชื้อของแผลผ่าตัด สปีชีส์ของเชื้อ *Enterococci* ที่มักพบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ คือ *E. faecalis* และ *E. faecium* โดยมีรายงานในอัตราร้อยละ 60-90 และ 5-35 ตามลำดับ โดยเชื้อจะมีการแพร่กระจายอยู่ในเลือด ปัสสาวะ หนอง และ ของเหลวในร่างกายบริเวณที่มีการติดเชื้อ (25)

4. *Escherichia coli (E. coli)*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ โคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะแห้ง เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารบางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้ เช่น enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohemorrhagic *E. coli (EHEC), enteropathogenic E. coli (EPEC)* และ *enteroaggregative E. coli (EAEC)* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง การติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหาร การติดเชื้อที่บาดแผล การติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และ ปอดอักเสบ โดยพบว่า *E. coli* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบในทางเดินปัสสาวะได้บ่อยที่สุด เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้พบในสิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะ แผลหนอง เสมหะ เลือดครบส่วน น้ำเลือด และ อื่น ๆ เชื้อมีการพัฒนาการดื้อยาที่เรียกว่า Extended-Spectrum Beta–Lactamase (ESBL) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม penicillin และ cephalosporins ได้

5. *Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae)*

เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ มีแคปซูลหนา โคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะเหนียวเยิ้ม (Mucoid colony) แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดปอดอักเสบ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ บางสายพันธุ์ที่สร้าง enterotoxin ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง อาการของผู้ป่วยติดเชื้อ *K. pneumoniae* จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการติดเชื้อ และ เชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ที่เป็นสาเหตุ เช่น การติดเชื้อในบริเวณปอด ส่งผลให้ผู้ป่วยมีไข้ ไอ เจ็บหน้าอก หายใจไม่สะดวก มีเสมหะ หรือ น้ำมูกที่อาจข้นและปนเลือด การติดเชื้อในกระแสเลือดส่งผลให้ผู้ป่วยมีไข้ หนาวสั่น เวียนศีรษะ มีผื่น และ ระดับความรู้สึกตัวเปลี่ยนแปลง ผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียจะมีไข้ ปวดศีรษะ คอแข็ง ก้มศีรษะได้ลดลง เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ พบในเสมหะ ปัสสาวะ แผลหนอง เลือดครบส่วน น้ำเลือด สารคัดหลั่ง และ น้ำไขสันหลัง

6. *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*

เป็นเชื้อก่อโรคนอกเซลล์ (extracellular bacteria) ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ สามารถสร้างรงควัตถุที่เรียกว่า “Pyocyanin pigment” โคโลนีแบคทีเรียจะสร้างกลิ่น คล้ายกลิ่นองุ่น “Grape-like odor” จัดเป็นพวกแซฟโพไฟ (saprophyte) พบได้ตามพื้นดิน แหล่งน้ำ จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาส แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญ และ แพร่กระจายไปยังอวัยวะของผู้ป่วยในส่วนต่าง ๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโดยสร้างสารพิษ และ เอนไซม์ต่าง ๆ (26) อุบัติการณ์โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* มักพบในการติดเชื้อที่บาดแผล ไฟไหม้น้ำร้อนลวก การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และ การติดเชื้อหลังการผ่าตัด

แม้จะพิจารณาว่าเป็นเพียงเชื้อโรคนอกเซลล์ แต่หลักฐานที่เพิ่มขึ้นบ่งชี้ว่า *P. aeruginosa* พบในสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดซึ่งรวมถึงมาโครฟาจ ข้อมูลล่าสุดได้เน้นย้ำว่าเชื้อโรคนอกเซลล์หลายชนิดสามารถเข้าสู่ในร่างกายเซลล์เจ้าบ้านได้ ส่งผลให้เกิดระยะของการอยู่อาศัยภายในเซลล์ ซึ่งอาจมีความสำคัญนอกเหนือจากการติดเชื้อนอกเซลล์ทั่วไป (24) เชื้อแพร่กระจายอยู่ในเลือดครบส่วน น้ำเลือด ของเหลวในร่างกาย และ บางสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* สามารถพบอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7. *Proteus spp.*

Proteus spp. ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถเคลื่อนที่ได้ จัดอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยเฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว และ พบตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยสปีชีส์ที่ก่อโรคในคนที่สำคัญคือ *Proteus vulgaris* และ *Proteus mirabilis* สามารถก่อโรคได้เกือบทุกระบบของร่างกาย ยกเว้นระบบทางเดินอาหาร มีความสามารถในการบุกรุกเข้าเซลล์ การมี bacteriocin และ pili ทำให้สามารถยึดเกาะเซลล์เยื่อบุของระบบทางเดินปัสสาวะได้ดี เชื้อนี้จึงเป็นสาเหตุที่พบบ่อยของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อบริเวณอื่น ๆ ได้แก่ การติดเชื้อที่บาดแผล ปอด และ ใน

กระแสเลือด รวมถึงการติดเชื้อในโรงพยาบาล การตรวจวินิจฉัย *Proteus spp.* โดยตัวอย่างในระบบทางเดินปัสสาวะ บาดแผล และ ตัวอย่างเลือด โดยเชื้อแพร่กระจายอยู่ในเลือดครบส่วน และ น้ำเลือด (27)

8. *Enterobacter*

Enterobacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แบบไม่ใช้ออกซิเจน รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ชนิดที่ก่อโรคที่สำคัญคือ *Enterobacter cloacae* และ *Enterobacter aerogenes* การก่อโรคในคนของเชื้อ *Enterobacter* เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง รวมถึงผู้ป่วยโรคเบาหวาน และ ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันบางชนิด *Enterobacter* เป็นเชื้อสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ผู้ป่วยมักได้รับเชื้อจากการสัมผัสอุปกรณ์การแพทย์ที่ปนเปื้อนเชื้อ จากอาหาร หรือ จากเชื้อที่อาศัยอยู่ในตัวผู้ป่วยเอง ทำให้เกิดโรคปอดบวม โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อของบาดแผล โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และ การติดเชื้อในกระแสเลือด ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดมักมีอัตราการเสียชีวิตสูง (28) ระบาดวิทยา และ การติดเชื้อของ *Enterobacter* แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกจากระบบทางเดินหายใจ ปัสสาวะ เลือด โดยเชื้อแพร่กระจายอยู่ในเลือดครบส่วน น้ำเลือด และ ระบบทางเดินอาหาร (29)

9. *Haemophilus (H. influenzae)*

เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งสั้น ๆ (coccobacilli) ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญเติบโตได้ดีใน chocolate agar แบ่งเป็นชนิดมีแคปซูล และ ไม่มีแคปซูล *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ (obligate human pathogen) และ เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อแบคทีเรียที่แพร่กระจาย ในเด็ก และ ผู้ใหญ่ โดยมีอุบัติการณ์สูงที่สุดในเด็กเล็ก เชื้ออยู่ในระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ และ แพร่เชื้อจากคนสู่คนทางละอองในอากาศ และการสัมผัสโดยตรงกับสารคัดหลั่งของทางเดินหายใจ โดยเชื้อจะจับกับเซลล์เยื่อบุผิวชนิด non ciliated columnar epithelium แล้วแทรกผ่านเนื้อเยื่อเข้าสู่เลือด กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ โรคที่เกิด จากการติดเชื้อที่พบบ่อยได้แก่ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด โดยเชื้อแพร่กระจายอยู่ในน้ำเลือด และ เลือดครบส่วน (30)

10. *Listeria (L. monocytogenes)*

Listeria monocytogenes เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก แบบแท่ง สามารถเติบโตและ สืบพันธุ์ภายในเซลล์ของโฮสต์ (facultative, intracellular, gram-positive rod) สามารถมีชีวิตได้ทั้งในที่มี หรือ ไม่มีออกซิเจน เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ listeriosis ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็ก (ทารกแรกเกิด) ผู้สูงอายุ และ ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง บุคคลที่มีสุขภาพดีที่พบว่ามีการติดเชื้อ *L. monocytogenes* มักมีการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร มีอาการไข้ และ ท้องเสีย

โดย *L. monocytogenes* สามารถแพร่เชื้อไปยังสมอง เยื่อหุ้มไขสันหลัง และ/หรือ ในกระแสเลือดของเจ้าบ้านได้ อาจมีการบุกรุกบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร เมื่อ *L. monocytogenes* เข้าสู่ monocytes, macrophages หรือ polymorphonuclear leukocytes ของเซลล์เจ้าบ้านจะทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด และ มีการเพิ่มจำนวนได้ในเลือดทั้งใน เลือดครบส่วน น้ำเลือด และเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยที่ *L. monocytogenes* ใน phagocytic cell สามารถแพร่กระจายไปยังสมอง และ อาจแพร่ไปยังทารกในครรภ์ในหญิงตั้งครรภ์ การเกิดโรคของ *L. monocytogenes* ขึ้นอยู่กับความสามารถในการอยู่รอด และ เพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน โดยอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ *L. monocytogenes* ในภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้อพบอัตราการเสียชีวิตโดยรวมสูงถึงร้อยละ 70 และ ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดพบอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 50 และ จากการติดเชื้อในช่องท้อง/ทารกแรกเกิดพบมากกว่าร้อยละ 80 โดยในการติดเชื้อระหว่างตั้งครรภ์มารดามักจะรอดชีวิต การรักษาโดยการให้ยาเพนนิซิลิน หรือ แอมพิซิลิน ทางหลอดเลือด และ การรักษาด้วย trimethoprim-sulfamethoxazole ในผู้ป่วยที่แพ้ยาเพนนิซิลิน (31)

11. *Mycobacterium (M. tuberculosis)*

Mycobacterium tuberculosis (MTB) เป็นแบคทีเรียก่อโรคในสกุล *Mycobacterium* และ เป็นสาเหตุของวัณโรค มีรูปร่างแท่ง เคลื่อนที่ไม่ได้ มีขนาดค่อนข้างใหญ่ และ ต้องพึ่งพาออกซิเจนในการดำรงชีวิต ด้วยเหตุนี้การติดเชื้อวัณโรคจะพบรอยโรคได้ที่ปอดกลีบบนเป็นส่วนใหญ่ เชื้อ *M. tuberculosis* จะเข้าไปอาศัย และ เจริญเติบโต เชื้อวัณโรคจัดอยู่ในกลุ่ม Acid-Fast bacteria เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่หนา และ มีส่วนประกอบสำคัญคือ mycolic acid ดังนั้นจำเป็นต้องอยู่ในสภาวะกรด ผู้ที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* อยู่ อาจจะมีอาการแสดงหรือไม่มีอาการของวัณโรคก็ได้ การแพร่กระจาย และ พยาธิสภาพของวัณโรคปอดเชื้อจะแพร่กระจายจากปอด หลอดลม หรือ กล่องเสียงของผู้ป่วย หากมีการไอ หรือ จาม เชื้อจะออกมาอยู่ในอากาศ และ รวมกลุ่มกันเป็นหยดละอองซึ่งสามารถฟุ้งกระจายเข้าสู่ทางเดินหายใจของผู้อื่น และ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ (32)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

TB hematogenous วัณโรคนอกปอด มักเกิดจากการแพร่กระจายของเลือด โดยทั่วไปเกิดขึ้นเมื่อแผลที่เป็นวัณโรคกัดเซาะเข้าไปในเส้นเลือด มีการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* เข้าสู่กระแสเลือด และ ทั่วร่างกาย บางครั้งการติดเชื้อแพร่กระจายโดยตรงจากอวัยวะที่อยู่ติดกัน การแพร่กระจายจำนวนมากที่ไม่สามารถควบคุมได้อาจเกิดขึ้นระหว่างการติดเชื้อขั้นต้น หรือ หลังการติดเชื้อซ้ำ พบบ่อยในเด็ก ผู้มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และ ผู้สูงอายุ อาการขึ้นอยู่กับอวัยวะที่ได้รับผลกระทบ แต่โดยทั่วไปแล้วจะมีไข้ และ น้ำหนักลด วินิจฉัยตามการระบุ

ชนิดของแบคทีเรียในของเหลว หรือ เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเลี้ยง และ/หรือ การทดสอบด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างของเหลว เช่น เลือด โดยเชื้อแพร่กระจายในเลือดครบส่วน ในน้ำเลือด และ ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และ น้ำไขสันหลัง หรือ ตรวจในตัวอย่างชิ้นเนื้อ ผลการเพาะเชื้อจากเลือดเป็นบวกในประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วยวัณโรคที่แพร่กระจาย ผู้ป่วยดังกล่าวมักมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง มักเกิดจากการติดเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ตามการเพาะเชื้อจากเลือด และ เนื้อเยื่อมักจะมีผลเป็นลบ ในกรณีเช่นนี้ การทดสอบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (PCR) อาจมีประโยชน์ รักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเป็นเวลาหลายเดือน และ บางครั้งอาจต้องทำการผ่าตัด (33)

12. *Neisseria (N. meningitidis)*

เชื้อ *Neisseria* เป็นเชื้อแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Neisseriaceae เป็นเชื้อที่พบได้ตามธรรมชาติ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ ส่วนที่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ มี 2 สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *Neisseria meningitidis* ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และ *Neisseria gonorrhoeae* ก่อโรคหนองใน เชื้อ *Neisseria* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม มักอยู่กันเป็นคู่ ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative diplococci) *N. meningitidis* สามารถกระจายเข้าสู่กระแสเลือด และ ไปสู่ระบบประสาท ส่วนสมอง และ ไขสันหลัง ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบมักทำให้เกิดผื่นที่เป็นหนอง มีอัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 50 ในช่วงไม่กี่ชั่วโมงนับจากเริ่มมีอาการ และภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงอื่น ๆ เช่นจะมีเลือดออกในต่อมหมวกไตที่เกิดจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเลือด (meningococcemia) เฉียบพลัน และ มีการแข็งตัวของเลือดในหลอดเลือด การวินิจฉัยอย่างรวดเร็วเป็นสิ่งสำคัญ โดยการซักประวัติ ตรวจร่างกายร่วมกับการเพาะเชื้อจากเลือด และ น้ำไขสันหลัง แม้ว่าการเพาะเชื้อในเลือดอาจเป็นผลบวกมากกว่าสองในสามของกรณีก่อนการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่ผลการเพาะเลี้ยงมักจะเป็นลบหากผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บตัวอย่าง การตรวจด้วยวิธี PCR สำหรับการตรวจหา meningococci ในเลือดครบส่วน น้ำเลือด บัฟฟีโคท หรือเซลล์เม็ดเลือดขาว และ น้ำไขสันหลัง ได้รับการพัฒนารวมทั้งการตรวจ multiplex PCR และ real-time PCR ที่ตรวจหาแบคทีเรียหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มสมองอักเสบถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการหลายแห่งเพื่อความรวดเร็วในการวินิจฉัย(34)

เชื้อแบคทีเรียที่เป็นชนิด Intracellular pathogens ประกอบไปด้วยกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตและแบ่งตัวได้เฉพาะใน host cell (Obligate Intracellular Bacteria) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องใช้เทคนิค cell culture และ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถแบ่งตัว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ได้ทั้งในและนอก host cell (Facultative Intracellular Bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียชนิด Intracellular pathogens การก่อโรค และ กลไกการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของ host cell แสดงใน [ตาราง 1]

ตาราง 1 แบคทีเรียชนิด Intracellular pathogens การก่อโรค และ กลไกการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของ host cell
(35)

Intracellular Pathogens	Mechanism	Disease	Remarks
Brucella spp.	Subversion of host defense	Brucellosis	Facultative Intracellular
Chlamydia spp.	Subversion of host defense	Trachoma, Pneumonia	Obligate Intracellular
Francisella tularensis	Subversion of host defense	Tularemia	Facultative Intracellular
Anaplasma phagocytophilum	Subversion of host defense	Anaplasmosis	Facultative Intracellular
Legionella pneumophila	Subversion of host defense	Legionellosis	Facultative Intracellular
Listeria monocytogenes	Subversion of host defense	Food poisoning, Meningitis, Septicemia	Facultative Intracellular
Mycobacterium tuberculosis	Subversion of host defense and Resistance to host effector mechanism	Tuberculosis (TB), TB hematogenous	Obligate Intracellular
Mycobacterium leprae	Induction of inappropriate immune responses / immunosuppression/Tregs	Leprosy (Hansen's Disease)	Obligate Intracellular
Rickettsia spp.	Subversion of host defense	Scrub typhus, Murine Typhus	Obligate Intracellular
Salmonella enterica Typhi	Subversion of host defense	Typhoid	Facultative Intracellular
Toxoplasma gondii	Subversion of host defense	Toxoplasmosis	Facultative Intracellular
Leptospira interorgan	Immunomodulation	Leptospirosis	Facultative Intracellular
Staphylococcus aureus	Immunomodulation	Septicemia	Facultative Intracellular
Neisseria spp.	Antigenic variation	Meningitis	Facultative Intracellular

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis)

มีการปรับเปลี่ยนคำจำกัดความของ sepsis ใหม่เป็นครั้งที่ 3 ในปี ค.ศ.2016 (The third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic shock) จากคำจำกัดความครั้งแรกของภาวะ sepsis ของ American college of Chest Physician (ACCP)/Society of Critical Care Medicine (SCCM) ในปี ค.ศ. 1991 และ มีการเปลี่ยนแปลงในปี ค.ศ. 2001 และ ค.ศ. 2004 ตามลำดับ โดยให้นิยาม ภาวะ Sepsis คือภาวะที่มีอาการหรือสงสัยว่ามีการติดเชื้อในร่างกายร่วมกับมีภาวะ Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) โดยมีอาการที่เกิดจากร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการติดเชื้อ ตั้งแต่ 2 ข้อขึ้นไป

1. อุณหภูมิร่างกายสูงกว่า 38 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า 36 องศาเซลเซียส
2. อัตราการเต้นของหัวใจเร็วกว่า 90 ครั้งต่อนาที
3. อัตราการหายใจเร็วกว่า 24 ครั้งต่อนาที หรือมี partial pressure of carbon dioxide (PaCO2) ในเลือดแดงต่ำกว่า 32 มิลลิเมตรปรอท
4. เม็ดเลือดขาวมากกว่า 12,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ ต่ำกว่า 4,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือมี band form มากกว่าร้อยละ 10

ในปี 2016 ได้มีการกำหนดนิยาม และ เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะติดเชื้อ ฉบับที่ 3 (The Third International Consensus Definition for Sepsis and Septic Shock; Sepsis-3) ระบุคำนิยามใหม่ของ sepsis โดยองค์ประกอบที่สำคัญคือ มีการติดเชื้อ (Infection) มีความผิดปกติของการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อ (dysregulated host response) และมีการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ผิดปกติ (organ dysfunction) เป็นผลจากการตอบสนองของร่างกาย ดังนั้นจึงมีการให้คำจำกัดความใหม่ของ Sepsis-3 ว่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

sepsis หมายถึง ภาวะที่มีการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายทำงานผิดปกติอย่างรุนแรงมีผลคุกคามต่อชีวิต ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อในกระแสเลือดที่เสียสมดุลไป โดยใช้เกณฑ์การประเมินอวัยวะล้มเหลว (Sequential [Sepsis- related] Organ Failure Assessment: SOFA score) ≥ 2 แสดงใน [ภาพประกอบ 6] หรือเกณฑ์การประเมินอวัยวะล้มเหลวแบบเร็ว (quick sequential organ failure assessment: qSOFA) ซึ่งเป็นฉบับย่อของ SOFA เนื่องจาก SOFA Score มีหัวข้อการประเมินค่อนข้างมาก และ ต้องใช้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วยจึงปรับให้เหลือเพียงเกณฑ์การประเมินอวัยวะล้มเหลวแบบเร็ว (qSOFA) ซึ่งประกอบด้วยอาการที่สงสัยว่าผู้ป่วยติดเชื้อ ร่วมกับเกณฑ์การประเมิน 2 ใน 3 ข้อ ต่อไปนี้

1. อัตราการหายใจ มากกว่าหรือเท่ากับ 22 ครั้งต่อนาที
2. ระดับการรู้สึกตัว (Glasgow coma score: GCS) ลดลง โดยมีคะแนน GCS น้อยกว่าหรือเท่ากับ 13 คะแนน

3. ความดันโลหิต systolic น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิเมตรปรอท

septic shock หมายถึง ผู้ป่วยภาวะ sepsis ที่มีความผิดปกติของระบบไหลเวียนโลหิต และเมตาบอลิซึมของเซลล์รุนแรงมากขึ้นจนเพียงพอที่อาจจะเพิ่มโอกาสในการเสียชีวิต โดยมีเกณฑ์การวินิจฉัยครบทั้ง 3 ข้อ (1, 2)

1. ภาวะความดันโลหิตต่ำอย่างรุนแรง ต้องให้ยา vasopressors เพื่อรักษาระดับความดันให้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 65 มิลลิเมตรปรอท
2. ระดับของแลคเตทใน serum มากกว่า 2 มิลลิโมลต่อลิตร
3. ผู้ป่วยได้รับสารน้ำในเบื้องต้นที่เพียงพอแล้ว

System or organ and measure	SOFA score				
	0	1	2	3	4
Respiratory:					
P_aO_2/FiO_2, mm Hg	≥400	300-399	200-299	100-199 with respiratory support	<100 with respiratory support
Coagulation:					
Platelets, × 10^3/μL	≥150	100-149	50-99	20-49	<20
Liver:					
Bilirubin, μmol/L (mg/dL)	<20 (1.2)	20-32 (1.2-1.9)	33-101 (2.0-5.9)	102-204 (6.0-11.9)	>204 (12.0)
Circulatory:					
Mean arterial pressure, mm Hg	≥70	<70	Low dose dopamine or any dose dobutamine	Low-medium dose noradrenalin or adrenalin; medium dose dopamine	High dose noradrenalin, adrenalin, or dopamine
Central nervous system:					
Glasgow Coma Scale score	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal:					
Creatinine, μmol/L (mg/dL)	<110 (1.2)	110-170 (1.2-1.9)	171-299 (2.0-3.4)	300-440 (3.5-4.9)	>440 (5.0)
Urine output, mL/day	–	–	–	<500	<200

*Our recommendation applies to patients with an infection and a SOFA score of ≥2.
P_aO_2 = partial pressure of oxygen (arterial). F_iO_2 = fraction of inspired oxygen.

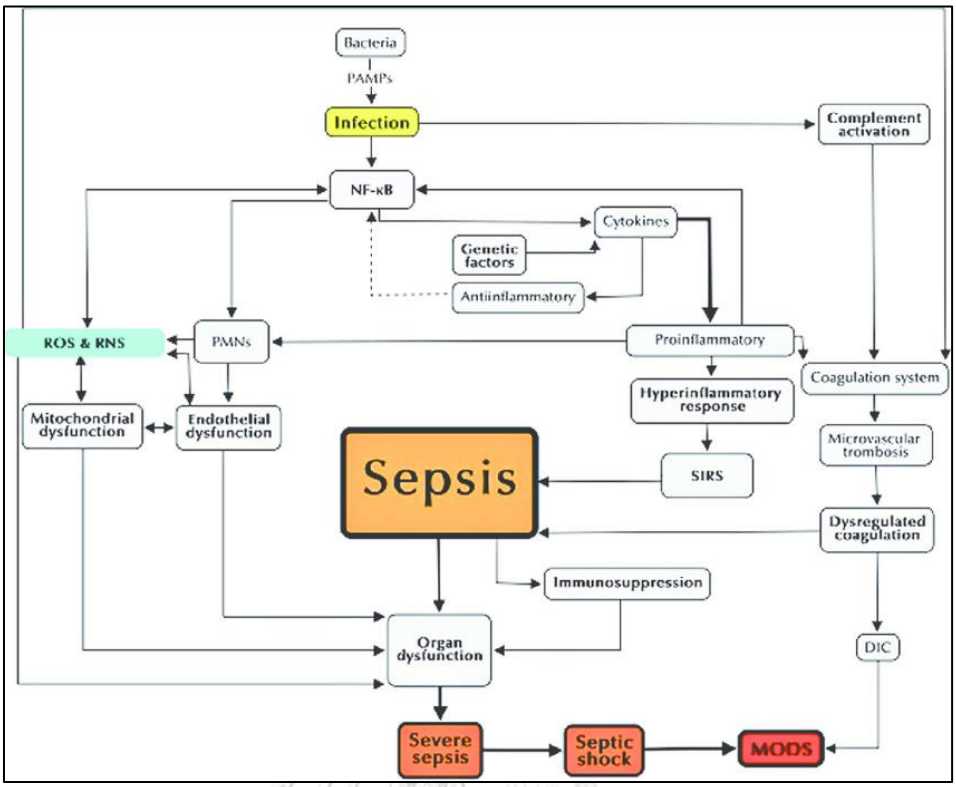
ภาพประกอบ 6 Sequential [Sepsis- related] Organ Failure Assessment: SOFA score (1)

พยาธิสรีรวิทยาของภาวะ sepsis และ septic shock

ภาวะ sepsis และ septic shock เป็นผลจากการติดเชื้อจากกระบวนการอักเสบอย่างรุนแรง และ ต่อเนื่อง โดยเมื่อเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ทำให้เกิดการติดเชื้อ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย เริ่มจากแบคทีเรียจะสร้าง toxin มากระตุ้น monocyte, neutrophil และ endothelial cell ให้หลั่ง proinflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor (TNF) Interleukin (IL)-1 ซึ่งจะไปกระตุ้นการหลั่งสาร cytokines ต่าง ๆ ร่วมกับการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ (complement

pathway), ระบบการแข็งตัวของเลือด (coagulation system), สารกระตุ้นการทำงานของเกร็ดเลือด (platelet activating factors) และ อื่น ๆ ส่งผลให้มีการกระตุ้นให้เกิด inflammatory response ทั่วร่างกาย ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ส่งผลกระทบต่อระบบหัวใจ และ หลอดเลือด ทำให้บริเวณหลอดเลือดมีการขยายตัว มีการลดลงของสารต้านการแข็งตัวของเลือด ส่งผลให้มีลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด (discriminate intravascular coagulation: DIC) ขัดขวางระบบไหลเวียนเลือด [ภาพประกอบ 7] (36) สำหรับระบบการหายใจ เซลล์จะมีความต้องการใช้ออกซิเจนมากขึ้นจากอัตราการเผาผลาญในร่างกายที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนที่รุนแรง ชีพจรเต้นเร็วขึ้น หากไม่ได้รับการแก้ไข ร่างกายจะมีการปรับตัว โดยเปลี่ยนไปใช้กระบวนการสร้างพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจนแทนจนเกิดภาวะกรดจากการเผาผลาญ ทำให้ระดับของสาร lactate ในเลือดสูงขึ้น ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะเนื้อเยื่อพร่องออกซิเจน (37) และ การที่หลอดเลือดมีความสามารถในการซึมผ่านเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการคั่งของสารน้ำที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ และ ปอด นำไปสู่ภาวะเลือดขาดออกซิเจน(38) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดกลุ่มอาการหายใจลำบากเฉียบพลัน โดยกระตุ้นให้ร่างกายหลั่งสารก่อการอักเสบผ่านไปยังกระแสเลือดทำให้หลอดเลือดแดงฝอยที่ปอดมีความสามารถในการซึมผ่านเพิ่มขึ้น เกิดการรั่วของของเหลวพวกโปรตีนจากหลอดเลือดเข้าสู่ถุงลม ส่งผลให้ระบบการหายใจล้มเหลวได้(39) การมีภาวะขาดออกซิเจนรุนแรงเป็นเวลานาน เซลล์เนื้อเยื่อจะค่อย ๆ เสื่อมสภาพ เมื่ออวัยวะสำคัญในร่างกายถูกทำลายพร้อมกันหลายระบบ อาจเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ sepsis และ septic shock เกิดจากการมีโรคประจำตัว เช่น โรคเบาหวาน โรคตับ โรคเกี่ยวกับเม็ดเลือดขาว และ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกาย เช่น โรคติดเชื้อ HIV การทำหัตถการต่าง ๆ ที่ต้องใส่เครื่องมือเข้าไปในร่างกาย เช่น การใส่ท่อช่วยหายใจ การใส่สายสวนปัสสาวะ การใส่ท่อเข้าหลอดเลือดเพื่อให้สารน้ำ และ จากการมีแผลบริเวณกว้างในร่างกาย ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย เช่น แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก



ภาพประกอบ 7 Pathophysiology of sepsis

(36)

การตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจวินิจฉัยโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ

เป็นการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างสารน้ำ เช่นการเตรียม smear และ ย้อมพิเศษต่าง ๆ จากตัวอย่างสารน้ำอาจใช้สีแกรม (gram stain), สีทนกรด (Acid Fast Stain) หรือย้อมพิเศษอื่น ๆตามที่สงสัยสาเหตุของโรค ซึ่งสามารถพบเชื้อก่อโรคได้ประมาณร้อยละ 30-50 โดยการทำ gram stain ของ bacteria effusion และ สามารถพบเชื้อได้ร้อยละ 10-30 โดยวิธี acid-fast stain ของ tuberculous effusion ข้อดีของวิธีนี้คือราคาถูกแต่อาจให้ผล false positive เนื่องจากมีเศษเซลล์ต่าง ๆ หรือ เส้นโปรตีนปะปนอยู่

2. การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีเพาะชื้อ และ จำแนกเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี

การเพาะเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เช่น การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น

และต้องคำนึงถึงการใช้หลัก Aseptic technique หรือเทคนิคที่ปราศจากเชื้อในการถ่ายเชื้อเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง และในการบ่มเชื้อต้องเลือกสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด ถ้าแยกเชื้อจาก clinical specimen มักจะบ่มที่อุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิร่างกายที่ 35-37 องศาเซลเซียส เชื้อบางชนิดอาจต้องบ่มในตู้ที่มี 5% CO_2 ถ้าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม anaerobic bacteria ต้องบ่มในสภาวะที่ไม่มี oxygen โดยใช้ anaerobic jar หรือ anaerobic incubator การนำเชื้อที่ได้มาทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสายพันธ์ของแบคทีเรีย อาศัยคุณสมบัติของแบคทีเรียทางชีวเคมีในการสร้างเอนไซม์บางชนิด การใช้สารอาหาร และ สร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้วินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคแต่ละกลุ่มได้แก่ การตรวจวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus spp.* ด้วยการทดสอบ Coagulase test, DNase test หรือ การใช้ Mannitol Salt agar ซึ่งเป็น selective media ใช้แยกเชื้อ *S. aureus,* การตรวจวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม *Streptococcus spp.* ด้วยการทดสอบ catalase การตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียด้วยวิธีเพาะเชื้อ มีหลายขั้นตอน ต้องใช้ระยะเวลานานในการตรวจพิสูจน์ และจะต้องมีห้องปฏิบัติการเฉพาะ เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความเชี่ยวชาญ เพื่อไม่ให้มีความเสี่ยงที่จะติดเชื้อหรือ มีการแพร่กระจายของเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม

3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาใช้ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิก หรือตรวจสอบการตอบสนองของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อของผู้ป่วย วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ใช้ในกาตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียได้แก่

- วิธี agglutination เป็นการทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของแบคทีเรียที่ได้จากการฉีดแอนติเจนในสัตว์ทดลอง โดยแอนติบอดีเมื่อผสมกับ suspension ของเชื้อแบคทีเรียจะเกิดการเกาะกลุ่ม หรือ clumping วิธีนี้ใช้ตรวจวินิจฉัย serotype ของเชื้อ Salmonella spp. และ Leptospira spp.
- วิธี Immunofluorescence ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจโดยใช้สารเรืองแสงช่วยตรวจการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีตรวจหาตำแหน่งแอนติเจน และ แอนติบอดีในเซลล์ เนื้อเยื่อ ตรวจหาชนิด และ ปริมาณของแอนติบอดีในตัวอย่าง ใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Helicobacter pylori* เชื้อในกลุ่ม *Rickettsia spp.*
- วิธี Enzyme immunoassay (EIA) ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีใน serum ของผู้ป่วย โดยการนำแอนติเจน หรือ แอนติบอดีเกาะติดกับผิวของ solid phase เช่น micro titer plate แล้วใช้แอนติเจน หรือ แอนติบอดีที่จำเพาะใน serum ผู้ป่วย มาจับ ล้าง และ เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น alkaline phosphatase ล้าง และ เติม substrate ซึ่งการย่อย substrate จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติบอดี หรือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ เช่น การใช้ตรวจเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคหนองในเทียม ริดสีดวงตา

- วิธี complement fixation test (CFT) ใช้หลักการของปฏิกิริยาการตรึง complement โดย complement สามารถจับantigen-antibody complex นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *mycoplasma pneumoniae*, *chlamydia psittaci, coxiella burnetii*
- วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ จึงต้องรอให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่เพียงพอจึงจะสามารถตรวจพบได้ ต้องใช้ระยะเวลาในขั้นตอนการตรวจติดตามรวมถึงการแปลผล ซึ่งอาจต้องมีการตรวจซ้ำหลังจากตรวจครั้งแรก และในบางวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันแม้จะมีความไวและความจำเพาะแต่ต้องอาศัยเครื่องมือซึ่งมีราคาแพง เช่น fluorescence microscope

4. การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอณูชีววิทยา

วิธีการทางอณูชีววิทยาที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการได้แก่วิธี Polymerase chain reaction (PCR) แบบต่าง ๆ ประกอบด้วย conventional PCR, multiplex PCR และ real-time PCR

วิธี conventional PCR หรือ End Point PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะในหลอดทดลองโดยอาศัยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) องค์ประกอบของการเกิดปฏิกิริยาที่สำคัญ คือ DNA template, primer ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ, dNTPs, Taq DNA polymerase, PCR buffer, Mg^{2+} โดยวิธี conventional PCR จะสามารถอ่านผลได้เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา เริ่มจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองโดยอาศัยเครื่อง thermal cycler และตรวจวิเคราะห์ PCR product ที่เพิ่มจำนวนขึ้นด้วยวิธี gel electrophoresis ข้อดีของวิธี end point PCR คือมีความไวและ ความจำเพาะสูง น้ำยาและอุปกรณ์ราคาไม่แพง ข้อด้อยคือ ใช้เวลาในการทดสอบหลายชั่วโมง มีโอกาสเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนของ amplified product และ เป็นการตรวจวิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างเชิงคุณภาพ

multiplex PCR เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธี PCR โดยการใช้ PCR primers หลายคู่ ซึ่งถูกออกแบบให้มีความยาวมากกว่า และ มีค่าอุณหภูมิ Tm ของ primer แต่ละคู่แตกต่างกัน เพื่อให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของกลุ่มแบคทีเรียเป้าหมายได้หลายชนิดพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ข้อด้อยของการทำ multiplex PCR คือมีความไวต่ำกว่าการทดสอบหาเชื้อเพียงหนึ่งชนิดในหลอดทดลองเดียว

real-time PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากเทคนิค conventional PCR ให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปพร้อมกับการตรวจวัด PCR products เทคนิค real-time PCR ถูกนำมาใช้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อย่างแพร่หลาย ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจทั้งในเชิงคุณภาพและ เชิงปริมาณ เนื่องจากมีความจำเพาะ และ ความไวมากกว่าปฏิกิริยา PCR แบบดั้งเดิม โดยบริเวณยีนที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธี PCR คือ 16S rRNA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสคงตัวสูง มีการกลายพันธุ์ต่ำ และ มีขนาดที่เหมาะสมสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับ genus และ species (13)

5. การพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยความแตกต่างของโปรตีนโดยใช้ Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF, MS)

หลักการของ MALDI-TOF, MS เป็นการใช้แสงเลเซอร์ยิงไปที่กลุ่มเชื้อ และ ทำให้เกิดการหลุดออกของเชื้อชิ้นส่วนต่าง ๆ รวมถึงโปรตีน และ ผนังเซลล์ที่เป็นไขมัน และ คาร์โบไฮเดรตของเชื้อผ่านเข้าสู่ flight tube ซึ่งเป็นระบบสุญญากาศ และ สนามไฟฟ้า ในความเร็วที่แตกต่างกันตามสัดส่วนของน้ำหนักต่อประจุ ซึ่งจะถูกตรวจพบด้วย mass/ ion detector จะทำการบันทึก spectrum แล้วนำไปเปรียบเทียบกับ spectrum ของโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อมาตรฐานโดยอัตโนมัติในฐานข้อมูลของเครื่องเพื่อแยก genus และ species ของเชื้อ ในปัจจุบันมีการใช้ MALDI-TOF,MS ในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อจุลชีพทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และ ไวรัส อย่างแพร่หลาย ในการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยตรงจากขวดเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด การประยุกต์ใช้เพื่อแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา การพิสูจน์ชนิดของเชื้อ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว ให้ผลถูกต้องแม่นยำ สามารถตรวจพิสูจน์เชื้อได้ในเวลารวดเร็ว แต่เครื่องมือ และ ชุดทดสอบยังมีราคาค่อนข้างสูง (40)

วิธี real-time PCR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธี real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาจากวิธี พีซีอาร์ปกติ (conventional PCR) ซึ่งจะตรวจวัดปริมาณ และ ขนาดของ product ที่ได้เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ด้วยการทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis ในขณะที่เทคนิค real-time PCR สามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายที่กำลังเกิดขึ้นได้ในทุก ๆ รอบของการเพิ่มจำนวนในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ โดยใช้ตัวติดตาม เช่น DNA probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ซึ่ง probe จะจับกับ amplicon ที่เกิดขึ้นทำให้สามารถตรวจจับสัญญานได้ทันทีด้วยกล้อง CCD หรืออาจใช้ตัวติดตามเป็นสารเรืองแสงเช่น SYBR green สามารถจับกับ DNA สายคู่แล้ววัดการเรืองแสงและ แปลงค่าสัญญาณออกมาเป็นปริมาณสารพันธุกรรม โดยไม่ต้องมีขั้นตอนหลัง PCR ลดโอกาสการปนเปื้อน และ เป็นวิธีที่มี ค่าความไว และ ความจำเพาะสูง ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 1-3 ชั่วโมง สามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งเชิงคุณภาพ และ เชิงปริมาณ เทคนิค real-time PCR สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท

1. DNA binding fluorescent dyes

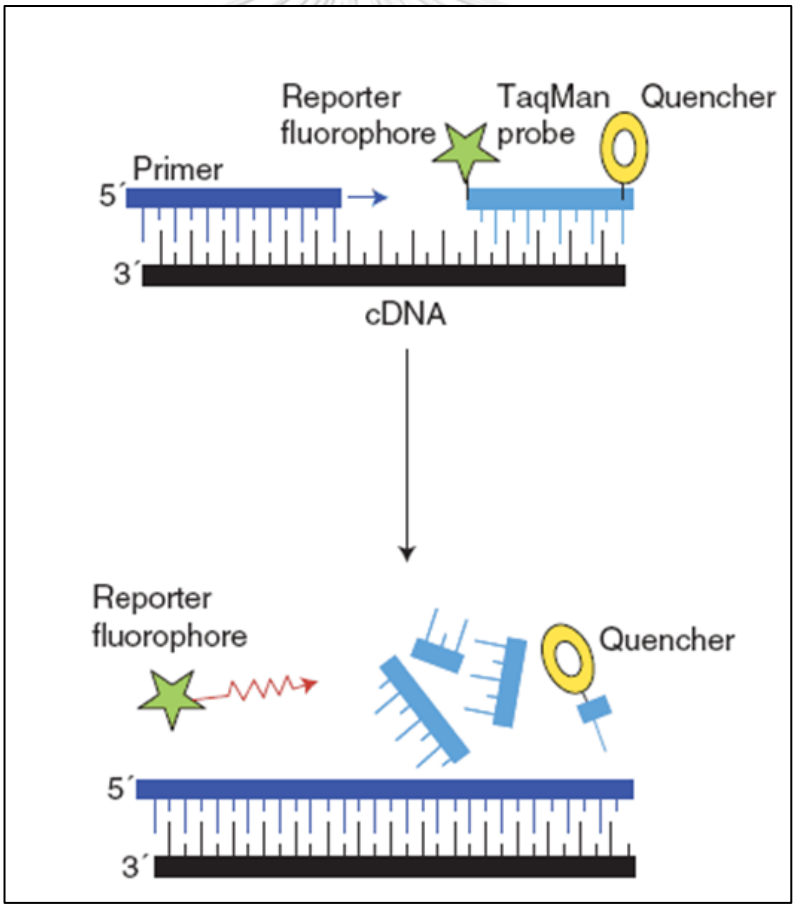
การตรวจวัดปริมาณ DNA ที่สร้างขึ้นโดยใช้สารฟูออเรสเซน ที่สามารถจับกับ double strand DNA ได้ โดยทั่วไปที่นิยมใช้ คือ SYBR Green I ซึ่งสามารถจับกับบริเวณ miner groove ของ double strand DNA แบบไม่จำเพาะ จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และ เปล่งแสงออกมา เมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย real-time PCR สัญญาณของสารเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก SYBR Green สามารถจับกับ double strand DNA ทุกชนิด ดังนั้นจึงมีการจับกันแบบไม่จำเพาะหรือการจับกันของ primer ในปฏิกิริยา PCR ทำให้ค่าของสารเรืองแสงที่ได้ไม่แม่นยำ และ ไม่บอกถึงค่าที่แท้จริงของปริมาณ DNA ที่ถูกสร้างขึ้น

2. Probes-based assay

การวัดปริมาณ DNA ที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้ probe ไปทำให้เกิดการไฮบริไดเซชันกับสาย DNA โดย probe จะเป็นนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสายสั้นๆ และ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่ได้กับบริเวณที่ต้องการศึกษา ที่นิยมใช้คือ TaqMan probe, Molecular Beacon, FRET Hybridization probes และ Scorpion probe ซึ่ง probe แต่ละชนิดมีหลักการทำงานแตกต่างกันไป probe ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ TaqMan probes ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวที่ประกอบด้วย reporter dye ที่จับอยู่ปลาย 5’ ของ probe สี fluorescein นี้ได้แก่ FAM, TET และ HEX ส่วน quencher dye จะจับที่ปลาย 3’ ของ probe เช่น TAMRA, BHQ1 เมื่อเกิดการไฮบริไดเซชัน โพรบเข้าจับกับ DNA ต้นแบบบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าคู่กันได้ สี fluorescein ของ reporter จะถูกกระตุ้น และปล่อยพลังงานออกมา ในการทำ real-time PCR เมื่อปฏิกิริยา extension เกิดขึ้น DNA polymerase ที่มี 5’ exonuclease activity จะตัด reporter dye ออกจาก probe ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และ สามารถคายพลังงานออกมาเกิดการเรืองแสงขึ้น [ดังภาพประกอบ 8] โดยปริมาณสารเรืองแสงจะแปรผันกับปริมาณของสาย DNA ที่เพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค real-time PCR รูปแบบ probe detection เนื่องจากมีความจำเพาะ (specificity) มากกว่าวิธี fluorescent dye สามารถประยุกต์ใช้แบบ multiplexing ได้ และ ไม่ต้องทำ melting curve analysis

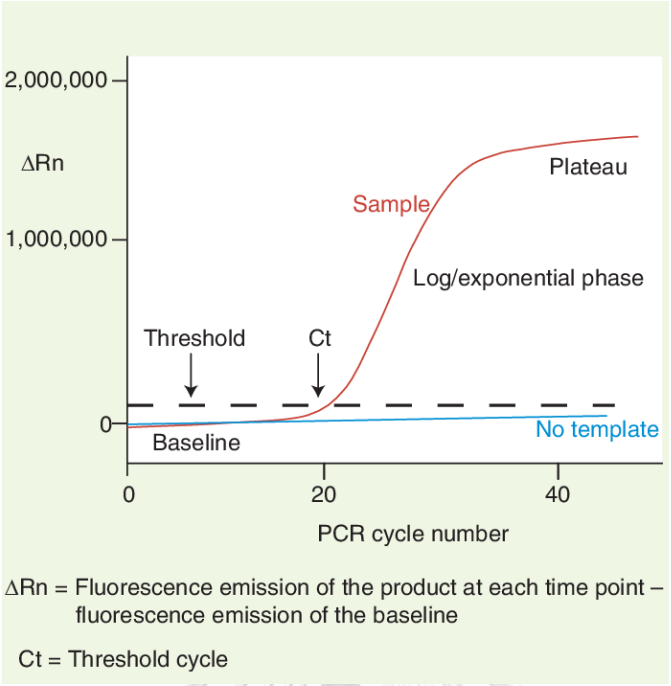
หลักการแปลผลการทดสอบด้วย real-time PCR ผล qPCR จะแสดงในรูปของกราฟ amplification plot (แกน x แสดงจำนวนรอบของ PCR แกน y แสดงค่า fluorescence intensity) ผลการวิเคราะห์ของเทคนิค real-time PCR ที่ได้จะมีลักษณะกราฟ S-shape [ภาพประกอบ 9] สามารถตรวจวัด PCR product ที่เกิดขึ้นจากการจับสัญญาณเรืองแสงของ fluorescence สำหรับตัวอย่างที่ไม่มียีนเป้าหมาย (no template) จะไม่มีการเพิ่มสัญญาณแสง เห็นเป็นเส้นตรงแนวระนาบ โดย amplification plot แบ่งเป็น 3 ช่วง (phase) ดังนี้

- Initial phase เป็นช่วงเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา และ สัญญาณเรืองแสงของ fluorescence ใน 15-20 รอบแรก เป็นช่วงแสงต่ำกว่าที่เครื่องจะตรวจวัดได้ ระยะนี้เครื่อง real-time PCR จะมีการคำนวณ baseline ของ สารเรืองแสง
- Log / exponential phase เป็นช่วงที่ระดับพลังงานของ fluorescence เพิ่มสูงขึ้นมากว่า background การเกิดสัญญาณเรืองแสง fluorescence ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา จะได้ค่า cycle threshold (Ct) ที่จะนำมาคำนวณ ซึ่งจะเป็นปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา เป็นช่วงที่มีการสร้าง PCR product เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ
- Plateau phase เป็นช่วงสุดท้ายของปฏิกิริยา PCR สารเคมี ต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเหลือน้อยลงจนไม่สามารถที่จะนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของสารพันธุกรรมได้ เป็นช่วงที่ fluorescence เริ่มคงที่



ภาพประกอบ 8 Hydrolysis probes (TaqMan® assay)

(41)



ภาพประกอบ 9 Amplification plot

(41)

Terminology ที่เกี่ยวข้องกับ real time PCR (41)

- Baseline: เป็น background ของสารเรืองแสงที่ตรวจวัดได้ในรอบแรกๆของการเพิ่มปริมาณ ก่อนที่จะมีการเพิ่มสัญญาณแบบ exponential จากการเกิด PCR product
- Delta Rn (ΔRn): สัญญาณเรืองแสงของ reporter ที่ตรวจวัดได้ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาหักลบกับค่าการเรืองแสงระยะเริ่มต้นก่อนมีการเพิ่มจำนวน (baseline)

  [ΔRn = Rn – baseline]
- Threshold line: เส้นระดับของสัญญาณเรืองแสงที่สูงกว่าระดับ baseline และอยู่ในช่วงการเพิ่มจำนวนแบบ exponential ของ DNA เป้าหมาย ค่า threshold ขึ้นกับสารเรืองแสงที่ใช้เป็น reporter และองค์ประกอบต่าง ๆ ในการทำ real time PCR สามารถให้เครื่องตั้งค่าอัตโนมัติ หรือ ปรับตั้งค่าเองโดยผู้ใช้
- C_T (Threshold cycle): จำนวนรอบที่สัญญาณแสงของตัวอย่างตัดกับเส้น threshold ค่า C_T แปรผกผันกับกับปริมาณ DNA เริ่มต้น ตัวอย่างที่มี DNA เป้าหมายเริ่มต้นมากจะมีค่า C_T ต่ำ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA น้อยกว่า จะมีค่า C_T สูง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

มีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้อย่างกว้างขวางในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น การวินิจฉัยโรคมะเร็ง วินิจฉัยความผิดปติทางพันธุกรรม การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต การวินิจฉัยการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว (8) และ การได้รับการรักษาที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็น

ในปี ค.ศ.2009 Yanan Zhao และ คณะ ได้ทำการศึกษาการใช้เทคนิค RNA-dependent nucleic acid sequence-based amplification and molecular beacon (NASBA- MB) ในรูปแบบ multiplex real-time PCR ในการพัฒนาชุดตรวจการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยออกแบบ Probe และ Primer ที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก เชื้อรา pan-*Candida* และ pan-*Aspergillus* โดยใช้ยีนเป้าหมายบริเวณ 16S rRNA และ 28S rRNA สำหรับแบคทีเรีย และ เชื้อราตามลำดับ ชุดทดสอบสามารถจำแนกการติดเชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อราได้ในระดับ subkingdom/genus มีการประเมินตัวอย่างทางคลินิก 570 ตัวอย่าง จากเลือดในขวดเพาะเลี้ยง สามารถวัด ค่าความไว ความจำเพาะ และ ค่าดัชนีของ Youden สำหรับการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม gram-positive และ gram-negative เท่ากับร้อยละ 99.7, 100, 0.997 และ 98.6, 95.9, 0.945 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มเชื้อรามีความไวร้อยละ 100 โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อ ในเลือด สามารถวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว และ เฉพาะเจาะจง ภายในเวลาไม่เกิน 3 ชั่วโมง (42)

ปี ค.ศ.2014 HUI HAN และ คณะ ได้ทำการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ในการตรวจระบุเชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ จากตัวอย่างน้ำไขสันหลัง (CSF) โดยผลการศึกษาการใช้ TaqMan probe real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด 11 ชนิด แบคทีเรียแกรมลบ 9 ชนิด และ เชื้อรา 7 ชนิด ระบุชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องด้วย primer และ probes ที่ออกแบบโดยใช้ยีนเป้าหมายบริเวณ 16S rRNA และ 18S rRNA ซึ่งเป็นบริเวณ conserve sequence ของเชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อรา ตามลำดับ ค่า limit of detection ของการทดสอบสามารถตรวจระบุชนิดของเชื้อได้น้อยที่สุดที่ 10^{2} copies ของ plasmid DNA เป็นค่า Ct < 35 ทำการศึกษาในตัวอย่างน้ำไขสันหลังจำนวน 137 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ พบว่า 23 ตัวอย่างมีผลบวก คิดเป็นร้อยละ 16.8 และ มีค่า sensitivity และ specificity สูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ (43)

ปี ค.ศ. 2014 Hye-young Wang และ คณะ ทำการศึกษาชุดทดสอบ real-time PCR โดยใช้ TaqMan probe ในการตรวจและแยกแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราสายพันธุ์ *Candida* ศึกษาบริเวณยีนเป้าหมาย 16S rRNA และ 18S rRNA จากตัวอย่างเลือดในขวดเพาะเลี้ยง ผลการศึกษาค่าความไว และ ความจำเพาะโดยรวมของชุดทดสอบ real-time PCR กับตัวอย่างการเพาะเชื้อจากเลือดเท่ากับร้อยละ 99.6 และ 89.5 ตามลำดับ (44)

ในปี ค.ศ.2018 Ngo Tat Trung และ คณะ ได้ทำการศึกษาการใช้วิธี multiplex real-time PCR ในการระบุชนิดของเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยชาวเวียดนาม โดยศึกษาในตัวอย่างเลือดที่เก็บรวบรวมจากผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด 110 ราย ที่โรงพยาบาล 108 Military Central เมืองฮานอยประเทศเวียดนาม ศึกษาโดยเปรียบเทียบ 3 การทดสอบจากตัวอย่างเลือดทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยวิธีที่ 1 นำเลือดปริมาณ 1.2 ไมโครลิตร มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยชุดน้ำยา *MCLB1*-based human DNA removal เพื่อลดปริมาณ DNA ของมนุษย์ และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย ก่อนทำการสกัด DNA และ ทดสอบด้วยวิธี Inhouse real-time PCR บริเวณ 16S rRNA และ species specific primer ของเชื้อแบคทีเรีย วิธีที่ 2 นำเลือดปริมาณ 2 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Light Cycler-based SeptiFast real-time PCR และ วิธีที่ 3 ใช้ตัวอย่างเลือดในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร จำนวน 2 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด ผลการศึกษาที่ได้สามารถระบุผลบวกจากการตรวจในตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากเลือด การทดสอบ Light Cycler-based SeptiFast และ multiplex real-time PCR เป็น 35 (32%), 31 (28%) และ 31 (28%) ตามลำดับ การใช้ทั้งสามวิธีร่วมกันเพื่อยืนยันการติดเชื้อในกระแสเลือด 50 (45.5%) ซึ่งเป็นอัตราที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง สำหรับวิธี multiplex real time PCR มีค่าความไว ความจำเพาะ และพื้นที่ภายใต้เส้นโค้ง (AUC) สูงกว่าเมื่อเทียบกับ วิธี Light Cycler-based SeptiFast (ร้อยละ 77.4, 86.1 และ 0.8 เทียบกับร้อยละ 67.7, 82.3 และ 0.73 ตามลำดับ) ผลของวิธีการเพาะลี้ยงเชื้อจากเลือดร่วมกับ multiplex real-time PCR มีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิดของเชื้อก่อโรค โดยมีค่าความไว ความจำเพาะ และ พื้นที่ภายใต้เส้นโค้ง (AUC) สูงถึงร้อยละ 83.3 ร้อยละ 100 และ 0.95 ตามลำดับ การใช้วิธีการเพาะเชื้อจากเลือดร่วมกับ multiplex real-time PCR ช่วยให้การวินิจฉัยประสบความสำเร็จอย่างดีเยี่ยม และสนับสนุนการระบุสาเหตุของเชื้อโรคในตัวอย่างทางคลินิกที่ได้รับจากผู้ป่วยที่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (9)

จากรายงานการวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของการใช้วิธี real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือด ดังแสดงใน [ตารางที่ 2]

ตาราง 2 แสดงประสิทธิภาพของการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี real-time PCR

NO.	Pathogen	Target Gene	Specimen type	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Gold Std.	Reference
1	Gram-Positive Bacteria	16S rRNA	blood culture	99.7	98.6	Blood culture	Zhao Y, et al.2009
	Gram-Negative Bacteria			100	95.9		
	Fungus	28S rRNA		100	100		
2	Gram-Positive Bacteria	16S rRNA	CSF	92.8	91.8	Blood culture	Han H, et al.2014
	Gram-Negative Bacteria						
	Fungus	18S rRNA					
3	Gram-Positive Bacteria	16S rRNA	blood culture	99.6	89.5	Blood culture	Wang HY, et al.2014
	Gram-Negative Bacteria						
	Candida	18S rRNA		100	100		
4	Bacteria	16S rRNA	Whole blood	83.3	100	Blood culture	Tat Trung N, et al.2018
		Species specific PCR					

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเพาะเชื้อจากเลือด (Blood culture)

การเพาะเชื้อจากเลือด จะทำในผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราในกระแสเลือด หลักทั่วไปสำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อ จำนวนตัวอย่าง ควรเก็บอย่างน้อย 2-3 ตัวอย่างตรวจ ภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอมเนื่องจากปริมาณเลือดที่ส่งตรวจน้อยเกินไป หรือป้องกันภาวะผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนของเชื้อ การเก็บตัวอย่างเลือดต้องทำโดยวิธีที่ปราศจากเชื้อ โดยเก็บเลือดจากตำแหน่งต่างกัน และแยกเจาะคนละครั้งสำหรับแต่ละตัวอย่างตรวจ ควรเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อก่อนให้ยาต้านจุลชีพ และทำทันทีเมื่อผู้ป่วยเริ่มมีไข้ ปริมาณของตัวอย่างเลือดที่เหมาะสม ในผู้ใหญ่ควรเก็บอย่างน้อย 8-10 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างตรวจ ในเด็กเล็กและทารกอาจเก็บเพียง 1-5 มิลลิลิตร หรือพิจารณาตามน้ำหนักตัว

วิธีการเพาะเชื้อจากเลือด (blood culture)

1. การเพาะเชื้อจากเลือดด้วยวิธีทั่วไป (Conventional method) เป็นการเพาะเชื้อจากเลือด ในแบบที่ห้องปฏิบัติการทำการตรวจการเจริญของเชื้อภายในขวดอาหารเหลว ด้วยตัวเอง ซึ่งความไวของการพบเชื้อขึ้นอยู่กับความชำนาญของเจ้าหน้าที่

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือดด้วยระบบกึ่งอัตโนมัติ (Continuously monitored automated blood culture system) เป็นระบบการเพาะเชื้อที่สามารถตรวจการเจริญของเชื้อตลอดเวลาอย่างต่อเนื่อง อาศัยการตรวจสอบระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น หรือ ระดับก๊าซออกซิเจนที่ลดลง ผ่านทางระบบตรวจสอบ หรือ sensor เช่นระบบ BacT/ALERT® มีแผ่น membrane ที่ก้นขวดซึ่งจะเปลี่ยนสีเมื่อระดับ pH ลดลง เนื่องจากมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูง การเปลี่ยนสีของ membrane ทำให้มีการสะท้อนของแสงที่เครื่องยิงมาที่ก้นขวดเปลี่ยนแปลงไป เครื่องจึงตรวจพบได้ หรือระบบ Bactec® ซึ่งอาศัยการตรวจปริมาณสารเรืองแสง (fluorescence) ที่จะเพิ่มมากขึ้นภายในขวดเมื่อปริมาณออกซิเจนในขวดลดลง การตรวจสอบการเจริญของเชื้อระบบอัตโนมัติ อาศัยหลักการ 3 ข้อที่จะทำให้เครื่องส่งสัญญาณเตือนว่าตรวจพบการเจริญของเชื้อ คือ

- เชื้อมีการเจริญมากเกินระดับที่เครื่องตั้งไว้ (growth threshold) จะมีการแจ้งเตือนเมื่อ sensor มีการส่งสัญญาณถึงในระดับที่เครื่องตั้งค่าไว้
- เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (growth slope) เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณจาก sensor อย่างรวดเร็ว (อัตราการเจริญของเชื้อเร็วมาก) ถึงแม้ว่าจะยังไม่ถึงระดับที่เครื่องตั้งค่าไว้ เครื่องก็จะทำการแจ้งเตือน
- เชื้อมีอัตราการเจริญอย่างต่อเนื่อง (continuous growth) เชื้อบางชนิดอาจมีการเจริญที่ไม่เร็วมาก แต่เครื่องสามารถตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องได้

การรายงานผล เมื่อระบบเพาะเชื้ออัตโนมัติแจ้งเตือนการตรวจพบเชื้อในขวดเพาะเลี้ยงผ่านทางจอ monitor ของเครื่อง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการควรทำการดูดตัวอย่างมาย้อมสีแกรม เมื่ออ่านสไลด์และตรวจพบเชื้อแล้ว เช่นเป็นเชื้อแกรมบวกหรือลบ มีลักษณะการเรียงตัวอย่างไร ทางห้องปฏิบัติการจะแจ้งผลเบื้องต้นแก่แพทย์ผู้รักษาทันที จากนั้นจึงทำการแยกชนิดเชื้อไปตามกระบวนการมาตรฐานต่อไป ตัวอย่างการรายงานผลที่เสร็จสมบูรณ์ รายงานผลทันทีเมื่อผลเสร็จ รายงานผลจาก ทุก ๆ ขวดที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งเดียวกัน ให้ชัดเจนและแปลผลได้ง่าย การรายงานผลที่เสร็จสมบูรณ์ควรมีข้อใดข้อหนึ่งต่อไปนี้

1. ยกเลิกการสั่งตรวจ (Test canceled)
2. ไม่มีเชื้อขึ้น (No growth) ระบุระยะเวลาที่เพาะเชื้อ

3. มีเชื้อขึ้น (positive blood culture) การรายงานผลสมบูรณ์ที่เป็นลายลักษณ์อักษรต้องประกอบด้วยผลต่อไปนี้ ผลจากการย้อมแกรม ผลการวินิจฉัยเชื้อ ผลความไวต่อสารต้านจุลชีพ
4. ข้อมูล อื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อการแปลผล เช่น ปริมาตรเลือดที่เจาะน้อยกว่ากำหนด

Human blood component

องค์ประกอบของเลือดแบ่งเป็น 2 ส่วน ประกอบด้วยส่วนของเม็ดเลือดรวมถึงเกร็ดเลือดและส่วนของ plasma โดยเม็ดเลือดประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง (red blood cells; erythrocytes) เม็ดเลือดขาว (white blood cells; leukocytes) และ เกร็ดเลือด (platelets) ถ้านำเลือดมาปั่นด้วยเครื่อง centrifuge จะสามารถแยกส่วนของเม็ดเลือดแดงอยู่ที่ส่วนล่างของหลอด และ ส่วนของ Plasma อยู่ด้านบน สัดส่วนปริมาตรของเม็ดเลือดแดงต่อปริมาตรเลือดทั้งหมดประมาณ 40-45 % โดยที่จะเห็นส่วนของเม็ดเลือดขาว (white blood cell) เป็นชั้นบาง ๆ สีขาว เรียกว่า Buffy coat มีปริมาตรประมาณ 1% อยู่ระหว่างชั้นของเม็ดเลือดแดง และ plasma (55-60 % ของปริมาตรทั้งหมด) การสกัดสารพันธุกรรมจาก Buffy coat ที่ปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge อาจได้สารพันธุกรรมปริมาณน้อย และ มีความบริสุทธิ์ต่ำ เนื่องจากสัดส่วนปริมาณ Buffy coat ที่น้อย และ อาจมีส่วนของเม็ดเลือดแดงปะปนในขั้นตอนการปั่นเก็บ องค์ประกอบและคุณสมบัติของส่วน ต่าง ๆ ของเลือดแสดงใน [ตารางที่ 3]

ตาราง 3 Some properties of human blood component.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Component	Concentration (#/ml)	Size (μm)	Density (g/ml)	Comment
Red blood cell	4.0-5.7 x 109	6.2-8.2	1.086-1.122	Usually enucleate; generally, no DNA; flexible biconcave discoid shape.
White blood cell	4-11 x 106	7-30	1.057-1.092	DNA in every cell; spherical with many different sizes; monocytes can be as large as 30 μm.
Platelets	1.3-4.0 x108	2.0-4.0	1.072-1.077	No DNA; easily activated to aggregate and adhere to surfaces; biconcave discoid when not activated.
Plasma	-	-	1.024	Contains high concentrations of proteins and other biomolecules.

เซลล์เม็ดเลือดขาวมีนิวเคลียส สามารถเคลื่อนที่ได้อิสระ มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ช่วยป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคในร่างกาย กำจัดสารพิษ และ เศษเซลล์ หรือเซลล์ที่ผิดปกติบางชนิด เม็ดเลือดขาวแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม granulocytes ประกอบด้วย neutrophils, eosinophil, basophil ในไซโทพลาสซึมของเม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้จะมี granule ซึ่งย้อมติดสี เป็นเม็ดเลือดขาวที่สร้างขึ้นจากไขกระดูก มีหน้าที่ต่อต้าน และ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายกำจัดสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย เม็ดเลือดขาวอีกกลุ่มเป็นชนิด agranulocytes ประกอบด้วยเม็ดเลือดขาวชนิด monocytes และ lymphocyte มีหน้าที่กลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย และ เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อระบุชนิดของเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างเลือด (whole blood) ในผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นวิธีที่มีความไว มีความจำเพาะ และรวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดโดยปฏิกิริยา PCR อาจจะถูกยับยั้งได้จากสารต่าง ๆ ในส่วนประกอบของเลือด เช่น hemoglobin, immunoglobulin G และ anticoagulant (12) ทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายลดลง มีการศึกษาการตรวจหาเชื้อก่อโรคด้วยวิธี PCR จากเลือดส่วนต่าง ๆ ซึ่งแสดงประสิทธิภาพของวิธี PCR ที่แตกต่างกันในแต่ละส่วนประกอบของเลือด

Demetrio L Valle Jr และ คณะ ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถการใช้ PCR 16S rRNA ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการศึกษา 3 วิธีคือ buffy coat PCR, whole blood PCR และ buffy coat culture เปรียบเทียบค่า sensitivity และ specificity กับวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด ได้ค่า sensitivity 97.1, 93.75, 100 ตามลำดับ และ ค่า specificity 100 ทุกการทดสอบ สรุปได้ว่า buffy coat PCR, buffy coat culture และ whole blood PCR สามารถใช้เป็นวิธีในการตรวจหาแบคทีเรียในเลือดได้ โดยวิธี buffy coat culture และ buffy coat PCR มีความไวสูง และ NPV มากกว่า PCR ในเลือด นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์โดยตรงของจำนวน WBC ที่ มากกว่า 12,000 ต่อลูกบาตรมิลลิเมตรกับการเกิดการติดเชื้อในเลือด (12)

Stella Mitka และ คณะ ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรค Brucellosis ด้วยวิธี PCR ทั้งหมด 4 แบบในตัวอย่าง buffy coat, whole blood และ serum เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับวิธีเพาะเชื้อจากเลือด การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR ทั้ง 4 แบบ มีความไว และ ความจำเพาะที่ดีเยี่ยม และ สามารถตรวจพบเชื้อทั้งในระยะเริ่มแรก และ การติดตามผลหลังการรักษา ค่าความไวของ PCR ทั้ง 4 แสดงดังนี้ 1) PCR-A (buffy coat, whole blood, serum) มีค่า sensitivity 100,100,97 ตามลำดับ 2) PCR-B (buffy coat, whole blood, serum) มีค่า 100, 98, 95.5 9 ตามลำดับ 3) PCR-C (buffy coat, whole blood, serum) มีค่า 100, 99, 97 ตามลำดับ 4) PCR- D (buffy coat, whole blood, serum) มีค่า 100, 98.5, 96.5 ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธี PCR เป็นวิธีที่มีประโยชน์มากสำหรับการวินิจฉัยโรค Brucellosis เฉียบพลัน ในการติดตามผลหลังการรักษา และ

การตรวจหาอาการกำเริบในระยะเริ่มแรก ตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดคือ buffy coat มีค่า sensitivity และ specificity คิดเป็นร้อยละ 100 ของ PCR ทั้ง 4 แบบ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน สำหรับในตัวอย่าง whole blood มีผล false negative 2-4 รายในการตรวจทั้งหมด 200 ราย และ ในตัวอย่าง serum พบ false negative 6-9 รายในทั้งหมด 200 ราย (45)

ชุดแยกเซลล์ EasySep™ Direct cell separation kit

EasySep™ Direct cell separation kit สามารถแยกเซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูงออกจากเลือดครบส่วนได้โดยตรง สามารถทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ร้อยละ 99.9 และ กำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการได้ภายในขั้นตอนเดียวด้วยการใช้ชุดน้ำยา และ immunomagnetic แบบไม่มีคอลัมน์ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ lysis หรือ การปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เซลล์ที่ถูกแยกออกมาไม่ต้องผ่านคอลัมน์ หรือ การล้าง และ สัมผัสกับเซลล์ มีขั้นตอนการแยกเซลล์ที่รวดเร็วทำให้ช่วยรักษาคุณภาพเซลล์ และเซลล์ที่ได้มีความสามารถในการคงสภาพเซลล์ได้สูง (Maintain high cell viability) และ สามารถปรับเวลาในการแยกเซลล์ให้เหมาะสมตามชนิดและประเภทของตัวอย่างได้ โดยการแยกเซลล์ในตัวอย่างเลือด สำหรับ 1 ตัวอย่างของเลือดปริมาตร 0.5 ถึง 30 มิลลิลิตร สามารถดำเนินการได้ภายในเวลา 20 นาที เซลล์เป้าหมายที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถใช้งานได้ทันที เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานทางด้าน gene expression analysis, functional assays หรือ flow cytometry มีวิธีการขั้นตอนสำหรับการแยกเซลล์ด้วยชุด EasySep™ มากกว่า 260 ชุด เพื่อแยกเซลล์ต่าง ๆ มากกว่า 80 ชนิด จากสปีชีส์ และ แหล่งตัวอย่างที่หลากหลาย ในงานวิจัยนี้ใช้ชุด EasySep™ Direct Human cell separation kit (STEMCELL™ Technologies) แยกส่วนประกอบของเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภท lymphocyte, monocyte และ granulocyte จากเลือด (EDTA whole blood) โดยขั้นตอนการแยกเซลล์แสดงใน ภาคผนวก ง [ภาพประกอบ 18-20]

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรตัวอย่าง

ตัวอย่างทางคลินิก (Clinical sample)

ตัวอย่างทางคลินิกที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยติดเชื้อไม่ทราบสาเหตุที่สงสัยมีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ส่งตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไม่ทราบสาเหตุที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ และ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มีการเลือกตัวอย่างแบบ convenient sampling อาศัยการตัดสินใจโดยแพทย์ผู้ตรวจรักษาในการเลือกตัวอย่างจากผลการวินิจฉัยทางคลินิกของผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์สงสัยมีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) เพื่อส่งตรวจหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ ปริมาณเลือดที่ใช้ 10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดเลือดชนิด EDTA และ ตัวอย่างควบคุมในผู้มีสุขภาพดี จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยจะขอเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครชาย/หญิง ที่ไม่มีไข้สูงเกินกว่า 38 องศาเซลเซียส และ ไม่พบภาวะที่บ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อในร่างกาย งานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการ จริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (COA No.950/2021, IRB No.442/64)

กลุ่มของแบคทีเรีย และ พลาสมิด

ตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ ตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ที่เหลือจากงานวิจัยที่ผ่านมาของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ ซึ่งมีการตรวจยืนยันชนิด และ สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย และตัวอย่าง plasmid DNA ของ *Streptococcus* spp. และ plasmid DNA ของ *Escherichia* coli เป็นตัวควบคุมผลบวกในปฏิกิริยาการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR ของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ

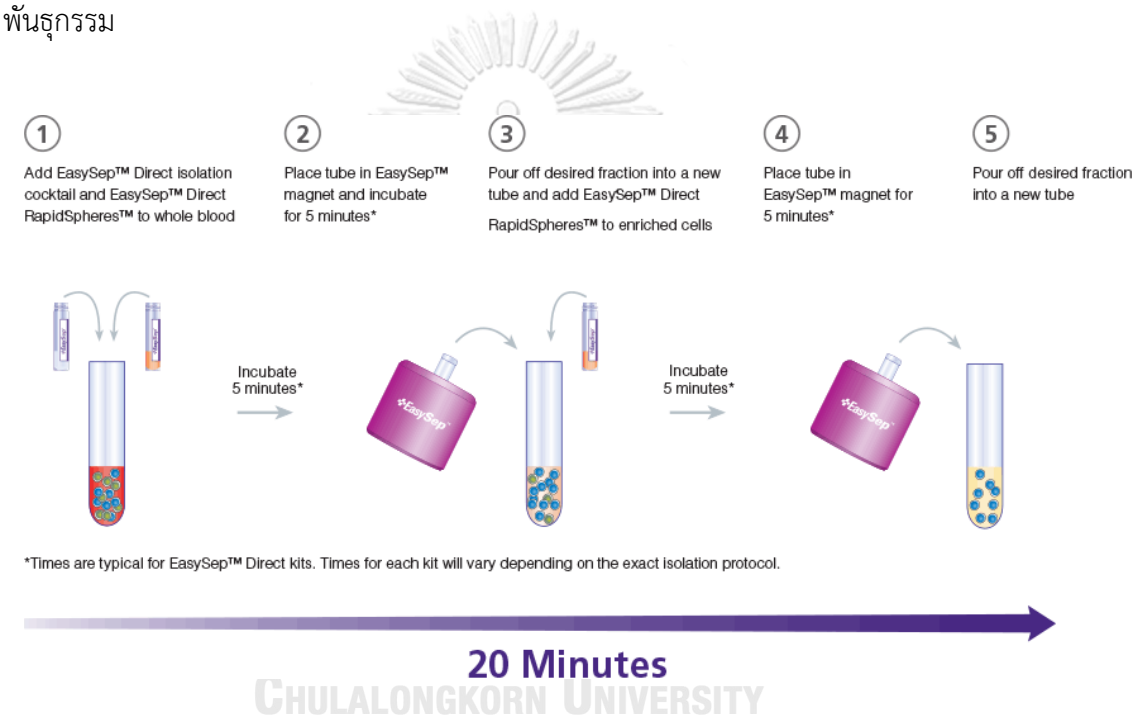
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีการวิจัย (Experimental method)

วิธีการแยกส่วนประกอบของเลือด (Separate blood component)

ทำการแยกส่วนประกอบของเลือดจากตัวอย่างเลือดที่บรรจุในหลอดเก็บเลือดชนิด EDTA โดยแยกส่วนประกอบของเลือดออกเป็น 4 ส่วนคือ1) whole blood 2) plasma 3) buffy coat และ 4) white blood cell (WBC) เตรียมตัวอย่าง plasma และ buffy coat โดยปั่นแยก

ส่วนประกอบของเลือดด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 1800 รอบ เป็นเวลา 10 นาที และ เตรียมตัวอย่าง white blood cell ด้วยชุดน้ำยา EasySep™ Direct Human cell separation kit (STEMCELL™ Technologies) แยกส่วนประกอบของเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภท lymphocyte, monocyte และ granulocyte จากเลือด (EDTA whole blood) ตามขั้นตอนที่ระบุในชุดน้ำยา EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit, EasySep™ Direct Human monocyte Isolation Kit และ EasySep™ Direct Human Pan-granulocyte Isolation Kit [ภาพประกอบ 10] นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้ทั้ง 3 ส่วน lymphocyte, monocyte และ granulocyte มาผสมรวมกัน ในงานวิจัยนี้เรียกว่า white blood cell (WBC) ก่อนนำไปสกัดสารพันธุกรรม



CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพประกอบ 10 Typical EasySep™ Direct Protocol

การสกัดสารพันธุกรรม (Nucleic acid extraction)

สกัดสารพันธุกรรมตัวอย่างส่วนประกอบของเลือดที่ทำการแยกส่วนประกอบทั้ง 4 ส่วน 1) whole blood 2) plasma 3) buffy coat และ 4) white blood cell (WBC) ด้วยชุดน้ำยา MagDEA®Dx SV ตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือการใช้งานเครื่อง magLEAD 12gC DNA/RNA extraction Analyzer ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 30 นาที นำสารพันธุกรรมที่ได้ไปวัดปริมาณ และคุณภาพด้วยเครื่อง Spectrophotometer เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ชุดตรวจสอบสารพันธุกรรม primers และ probes

ชุดตรวจสอบสารพันธุกรรม primers และ probes ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้จากการทบทวนวรรณกรรมของ [Hui Han et al. Simultaneous Detection and Identification of Bacteria and Fungi in Cerebrospinal Fluid by TaqMan Probe-Based Real-Time PCR. 2014:1286-1293] และ ทำการออกแบบส่วนของ reverse primers ใหม่เพื่อปรับปรุงให้มีลำดับเบสที่จำเพาะมากขึ้น รายละเอียดแสดงใน [ตารางที่ 4]

ตาราง 4 แสดงรายละเอียดของ primers และ probes ที่ใช้ในการศึกษา

Pathogens	Primer and Probe	Sequence (5'→3')	Position	Product size	Target
Bacteria	Forward primer	GCAACGCGAAGAACCTTACC	946 - 965	229 bp	16S rRNA
	Reverse primer	GTCATCCCCACCTTCCTCC	1156 - 1174		
	Gram-positive probe	FAM-ACGACAACCATGCACCACCTG-TAMRA	1029 - 1048		
	Gram-Negative probe	HEX-CTGACGACAGCCATGCAGCA-TAMRA	1056 - 1076		

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ real-time PCR

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของวิธี real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับความเข้มข้นของ primer และ probe ที่จำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ และ ปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา real-time PCR ให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว โดยใช้ plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นตัวควบคุมผลบวก และ DNase-RNase free water เป็นตัวควบคุมผลลบ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (PCR master mix) [ตาราง 5]

ตาราง 5 Bacteria PCR master mix

No.	Component	1X (µl)	Rx (µl)
1	DNase-RNase free water	6.4	
2	2X Premix Ex Taq (TAKARA)	10	
3	10 µM bacteria_ F primer	0.4	
4	10 µM bacteria_ R primer	0.4	
5	10 µM gram pos bacteria probe	0.4	
6	10 µM gram neg bacteria probe	0.4	
	Total volume	20	
7	DNA template (50 ng/ul)	2	

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง ABI 7500 FAST (Applied Biosystems USA) ด้วย PCR reaction condition [ตาราง 6] พิจารณาผลการตรวจวิเคราะห์จากกราฟที่แสดง S-CURVE และ ค่า cycle threshold (C_t)

ตาราง 6 Condition for real-time PCR

Step	Temperature (° C)	Time (sec)
Initial denaturation	95	30
Repeat step for 40 cycles, by followed.		
Denaturation	95	5
Annealing	60	34
Extension	72	15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี real-time PCR

ทดสอบความจำเพาะของวิธี real-time PCR โดยการทดสอบความสามารถของ primer และ probes ของชุด TaqMan probes real-time PCR ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ด้วยโปรแกรม BioEdit และ การทดสอบด้วยวิธี real-time PCR โดยการนำตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ จากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งมีการตรวจยืนยันชนิด และ สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแล้วด้วยวิธี whole genome sequencing มาทำการทดสอบความจำเพาะ

ทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี real time PCR

ทดสอบความไว (sensitivity) สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR หาปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุด (Limit of detection) ที่ชุด primerss และ probes สามารถตรวจจับได้ โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Streptococcus*) และ พลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*) ที่คำนวณค่า copies number แล้ว มาทำการเจือจางแบบ 10 fold serial dilution ด้วย DNase/RNase free distilled water ที่ความเข้มข้น $1x10^{10}$ ถึง $1x10^{1}$ copies/µl โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น ด้วยวิธี real-time PCR

การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (Recombinant plasmid construction)

1. ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการ (Insert DNA) ประกอบด้วย DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ที่มี PCR Product ขนาด 229 เบส ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี real- time PCR
2. Purified Insert DNA ด้วยชุดน้ำยา QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN)
3. ทำการเชื่อมต่อ Insert DNA เข้ากับ pGEM-T Easy vector (Promega, USA) ตาม ligation protocol (Thermo Fisher Scientific) ตามขั้นตอนดังนี้
    - เตรียม Insert DNA โดยคำนวณปริมาณ Insert DNA : Vector Molar Ratios ดังนี้

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{Insert: vector molar ratio} = \text{nanogram of insert}$$

    - เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย linear vector DNA 20-100 นาโนกรัมปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Insert DNA 5:1 molar ratio over vector, 10X T4 DNA ligase buffer 2 ไมโครลิตร, Thermo Scientific T4 DNA Ligase 1 U ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, water nuclease-free ปรับปริมาตรของ reaction mixer เป็น 20 ไมโครลิตร
    - Incubate ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ ligation product สำหรับ transformation ลงใน competent cells
4. นำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ โดยวิธี transformation เข้าสู่ competent cell (*E. coli*) ตามขั้นตอนดังนี้
    - ละลาย competent cell *E. coli* DH5 (100 ไมโครลิตร) บน Cool box ประมาณ 5 นาที โดยให้ส่วน cell ที่เป็นน้ำแข็งละลายเล็กน้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- เติม 5 ไมโครลิตร ของ ligation product ลงใน competent cell ผสมสารละลายโดยดีดที่หลอดด้วยปลายนิ้วเบาๆ incubate สารละลาย 30 นาที บนน้ำแข็ง
- heat shock บนเครื่อง thermomixer ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ นำสารละลายมาใส่ในน้ำแข็งทันที และ incubate เป็นเวลา 5 นาที
- เติม S.O.C medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำไปบ่มบน shaker incubator ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บตะกอนทิ้งส่วนใส โดยเหลือส่วนใสไว้ประมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน
- spread ตะกอนของเซลล์ที่ได้ลงบน selective plate ซึ่งประกอบด้วย 15 มิลลิลิตร LB-agar, ampicillin 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์
- บ่ม selective plate ในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. คัดเลือกโคลนของเชื้อ *E. Coli* DH5 ที่มี recombinant plasmid โดยวิธี blue/white screening และ ทำ colony PCR ด้วย Primer-Probes ชุดที่ทำการเพิ่มปริมาณของ Insert DNA แต่ละชนิด
    - คัดเลือก single colony ของโคลนที่มี recombinant plasmid ไปเลี้ยงต่อใน Selective media ซึ่งประกอบด้วย LB broth + ampicillin 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณ โดยเลี้ยงเซลล์ 1 colony ต่อ 100 ไมโครลิตรของ LB broth
    - นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง
6. ทำการยืนยัน recombinant plasmid ที่ได้ด้วยเทคนิค real-time PCR
    - สกัด plasmid DNA ด้วยชุดสกัด TIANprep Rapid Mini Plasmid kit วัดปริมาณและคุณภาพของ plasmid DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร พิจารณาคุณภาพของ plasmid DNA ที่ได้จากการวัดค่าอัตราส่วนของ OD260/OD280 plasmid DNA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่าอัตราส่วนของ OD260/OD280 เท่ากับ 1.6-1.8 เก็บ plasmid DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- นำ plasmid DNA ที่ได้ไปทำ real-time PCR ด้วยชุด primers-probes ชุดที่ทำการเพิ่มปริมาณของ Insert DNA แต่ละชนิด เพื่อยืนยันว่าสามารถทำการสังเคราะห์ recombinant plasmid ได้จริง

ทดสอบประสิทธิภาพวิธี TaqMan probes real- time PCR

ทดสอบประสิทธิภาพวิธี TaqMan probes real-time PCR ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดจำนวน 16 ราย (64 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) แยกส่วนประกอบของเลือดออกเป็น 4 ส่วน ประกอบด้วย 1) whole blood 2) plasma 3) buffy coat และ 4) white blood cell (WBC) นำมาสกัดสารพันธุกรรม และ ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR และ conventional PCR เปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลการตรวจวิเคราะห์ กับ วิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR

การเก็บรวบรวมข้อมูล

รวบรวมข้อมูลผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุด primers/ probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ข้อมูลผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี TaqMan probes real-time PCR และ รวบรวมข้อมูลผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยประกอบด้วย ผลการแยกส่วนประกอบของเลือด การสกัดสารพันธุกรรม และ ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี real-time PCR, conventional PCR และ ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด (blood culture) รวบรวมข้อมูลในแบบบันทึกข้อมูลการวิจัย (case report/record form: CRF)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดสอบความจำเพาะ(specificity) ของชุด primers / probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยการวิเคราะห์ผลจากค่า C_T value ที่แสดงบนกราฟ amplification plot ของวิธี TaqMan probes real-time PCR วิเคราะห์ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี TaqMan probes real-time PCR และ หาค่า limit of detection จากค่า C_T mean ของการทดสอบ 3 ซ้ำ จากการทำ 10 fold serial dilution ของ plasmid DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR กับ ผลของวิธี conventional PCR และ ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือด (blood culture) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธี TaqMan probes real-time PCR

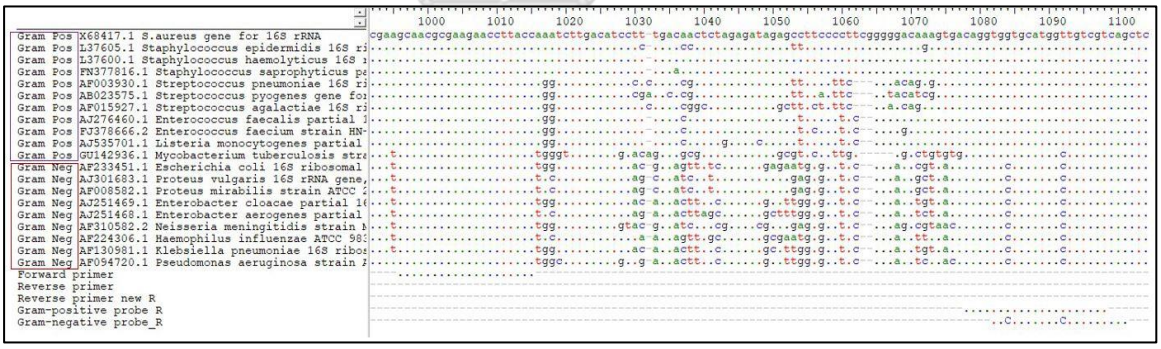
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุด primers และ probes

ผลการทดสอบความจำเพาะของชุด primers และ probes ในการตรวจจับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 11 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบ 9 สายพันธุ์ อ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้า (43) และ จากการตรวจสอบ primers และ probes ด้วยโปรแกรม BioEdit แสดงผลการทดสอบสอบใน [ภาพประกอบ 11]

ผลการทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR จากสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวกจำนวน 4 สายพันธุ์ และ แบคทีเรียแกรมลบจำนวน 6 สายพันธุ์ แสดงผลการทดสอบใน [ตาราง 7] และ [ภาพประกอบ 25-26] พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะแสดง fluorescence signal ด้วย gram-positive probe เท่านั้นจะไม่พบปฏิกิริยาข้ามในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกับเมื่อทดสอบด้วย gram-negative probe จะสามารถตรวจจับได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น



ภาพประกอบ 11 แสดงความจำเพาะของชุด primers / probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยโปรแกรม BioEdit

ตาราง 7 ผลการทดสอบความจำเพาะของชุด primers /probes ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ

No.	Colony No.	Bacteria strains	Concentration (ng/ul)	Gram positive Probe (C_T Value)	Gram negative Probe (C_T Value)
1	C9	*Staphylococcus (S. aureus)*	50.4	12.63	Not Detected
2	C585	*Streptococcus*	23.7	11.64	Not Detected
3	C617	*Enterococcus*	7.7	15.38	Not Detected
4	C429	*Enterococcus (E. faecium)*	5.8	21.28	Not Detected
5	C167	*Escherichia coli*	350.5	Not Detected	9.35
6	C440	*Proteus (P. vulgaris)*	- *	Not Detected	32.32
7	C442	*Proteus (P. mirabilis)*	- *	Not Detected	31.85
8	C416	*Enterobacter (E. cloacae)*	7.6	Not Detected	15.61
9	C494	*Klebsiella*	6.1	Not Detected	20.16
10	C457	*Klebsiella (K. pneumoniae)*	385.2	Not Detected	8.65

* รายละเอียดในคำอธิบาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี TaqMan probes real-time PCR ด้วยสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ พบว่าค่า C_T Value ของ Gram positive probe และ Gram negative probe ของเชื้อแต่ละชนิดมีค่าไม่ใกล้เคียงกันนั้น เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรมตั้งต้น (template DNA) ที่เติมลงในปฏิกิริยา PCR มีค่าแตกต่างกัน

จากการวัดค่าปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 ชนิด พบว่าค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. vulgaris* และ *P. mirabilis* อยู่นอกช่วงค่าน้อยที่สุดที่วัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer จึงไม่สามารถแสดงค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมได้ แต่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี real-time PCR แสดงค่า C_T Value ด้วย gram negative probe เท่านั้น ให้ผลที่ถูกต้องตรงกับชนิดของเชื้อ *P. vulgaris* และ *P. mirabilis* ซึ่งเป็น

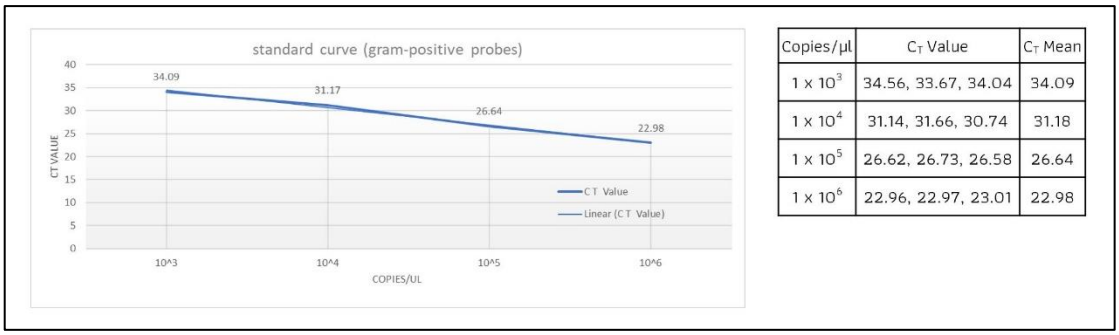
แบคทีเรียแกรมลบ จากการทดสอบความจำเพาะของวิธี 16S rRNA bacteria ด้วยวิธี conventional PCR ให้ผลการศึกษาดังแสดงในภาคผนวก ค [ภาพประกอบ 16-17] โดยผลการทดสอบวิธี conventional PCR สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 ชนิด แต่ไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบได้ และมี 2 ตัวอย่างของแบคทีเรียที่วิธี conventional PCR ไม่สามารถตรวจพบ คือ colony No. C440 (*P. vulgaris)* และ C442 (*P. mirabilis)* อาจเนื่องจากสารพันธุกรรมมีปริมาณความเข้มข้นน้อยเกินไป จากการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง spectrophotometer ไม่สามารถรายงานผลความเข้มข้นได้ในทั้ง 2 ตัวอย่างนี้เช่นกัน และ เป็นเครื่องแสดงให้เห็นว่าวิธี TaqMan probes real time PCR มีความไวกว่าวิธี conventional PCR

ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของวิธี TaqMan probes real-time PCR

ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของวิธี TaqMan probes real-time PCR ในการทำปฏิกิริยาตรวจจับ และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ การออกแบบ primer และ probe ที่จำเพาะ ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนประกอบในปฏิกิริยา real-time PCR [ตาราง 4] และ การปรับอุณหภูมิที่เหมาะสมของ annealing temperature และ extension temperature สำหรับ Forward/ Reverse primer, gram positive probe และ gram negative probe ในปฏิกิริยา real-time PCR [ตาราง 5] ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว

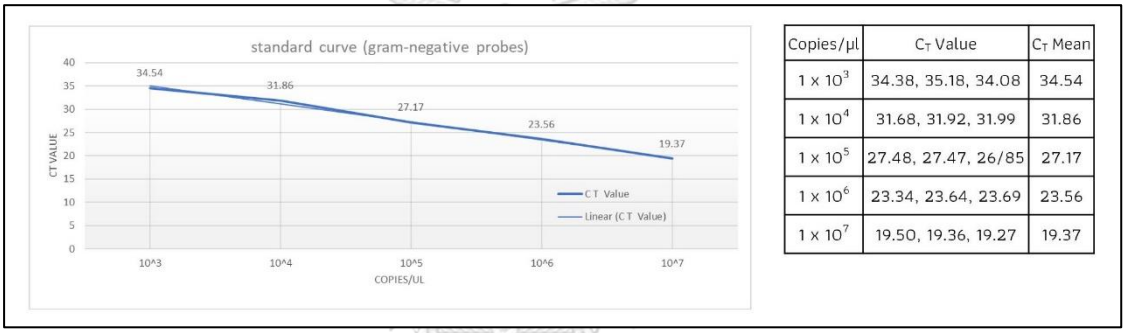
ผลการทดสอบความไว (Sensitivity) ของวิธี TaqMan probes real-time PCR

การทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR โดยการทดสอบความไวของชุด primers / probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่น้อยที่สุด (Limit of detection) ที่ชุด primers และ probe สามารถตรวจพบได้ ด้วยการเจือจาง plasmids DNA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10 fold serial dilution) ที่ความเข้มข้น $1x10^{10}$ ถึง $1x10^{1}$ copies/µl นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR โดยการทดสอบ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น ผลการทดสอบแสดงใน [ภาพประกอบ 12-13] และ [ภาพประกอบ 27-28] จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า C_T mean กับปริมาณ copies/µl ของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่า วิธี TaqMan probes real-time PCR มีความไว (Limit of detection) 1,000 copies/µl ($C_T < 35$) ปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่ชุด primers/probes สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 1000 copies/µl มีความไวเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในเลือด



Copies/µl	C_T Value	C_T Mean
1 x 10^3	34.56, 33.67, 34.04	34.09
1 x 10^4	31.14, 31.66, 30.74	31.18
1 x 10^5	26.62, 26.73, 26.58	26.64
1 x 10^6	22.96, 22.97, 23.01	22.98

ภาพประกอบ 12 แสดงผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของชุด primers /probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก



Copies/µl	C_T Value	C_T Mean
1 x 10^3	34.38, 35.18, 34.08	34.54
1 x 10^4	31.68, 31.92, 31.99	31.86
1 x 10^5	27.48, 27.47, 26/85	27.17
1 x 10^6	23.34, 23.64, 23.69	23.56
1 x 10^7	19.50, 19.36, 19.27	19.37

ภาพประกอบ 13 แสดงผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของชุด primers /probes ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการประเมินประสิทธิภาพสารพันธุกรรมของเลือดแยกส่วนด้วยวิธี Spectrophotometer

ผลการประเมินประสิทธิภาพของสารพันธุกรรมในเลือดแยกส่วนทั้ง 4 ชนิด จากการวัดปริมาณ และ คุณภาพของดีเอ็นเอ แสดงใน [ตาราง 8] การวัดคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถวัดจากค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค spectrophotometer เนื่องจากดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD260) ได้ การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ทำได้โดยเปรียบเทียบค่า OD260 และ OD280 (ค่าอัตรา OD260/OD280) ที่อยู่ในช่วง 1.6-1.8 ซึ่งจะบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จาก [ตาราง 8] พบว่า

- ดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดครบส่วน ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง มีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 ในช่วง 1.6-1.8 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ และ ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยส่วนใหญ่มีปริมาณมากกว่า 100 ng/ul

- ดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำเลือดมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 ng/ul และ โดยส่วนใหญ่ (13 ตัวอย่าง) มีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 มีค่าต่ำกว่า 1.6 บ่งบอกว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้อาจมีการปนเปื้อนของสารกลุ่มโปรตีน และ ฟีนอลบางส่วน
- ดีเอ็นเอที่ได้จาก บัฟฟีโคท มีปริมาณไม่ใกล้เคียงกัน และ มีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 ส่วนใหญ่ (12 ตัวอย่าง) อยู่ในช่วง 1.6-1.8 และ พบ 3 ตัวอย่าง มีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 ต่ำกว่า 1.6 และ 1 ตัวอย่างมีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 มากกว่า 1.8 สารละลายดีเอ็นเอที่ได้อาจมีปริมาณอาร์เอ็นเอเจือปนอยู่
- ดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิด (monocyte, granulocyte, total lymphocyte) แล้วนำมารวมกันก่อนสกัดสารพันธุกรรม พบว่าดีเอ็นเอ มีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 1.6-1.8 และ พบ 2 ตัวอย่างมีค่าอัตราส่วน OD260/OD280 ต่ำกว่า 1.6 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ส่วนใหญ่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับในเลือดครบส่วน เพียงพอในการตรวจวิเคราะห์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี TaqMan probes real time PCR

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี TaqMan probes real-time PCR ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมดจำนวน 16 ราย (64 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธี TaqMan probes real-time PCR กับ วิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบเชื้อ ในผู้ป่วย 15 ราย (60 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) สอดคล้องกันทั้ง 3 การทดสอบ และ ผลการตรวจวิเคราะห์พบเชื้อ 1 ราย (2 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR โดยผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR พบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในตัวอย่าง น้ำเลือด (plasma) และ เลือดครบส่วน (whole blood) ผลจาก amplification plot แสดงค่า C_T = 29.57 และ 28.78 ตามลำดับ ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงใน [ตาราง 8] และ [ภาพประกอบ 29]

ประวัติ และ ผลการรักษา ของผู้ป่วย 1 ราย ที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ในตัวอย่างน้ำเลือด และ เลือดครบส่วน เป็นผู้ป่วยเพศชาย อายุ 72 ปี สภาวะเดิมผู้ป่วย สมองเสื่อม และ มีภาวะขาดวิตามินบี 12 เป็นผู้ป่วยเบาหวาน ต่อมไทรอยด์ทำงานต่ำ ความดันโลหิตสูง มีไขมันในเลือดผิดปกติ และ เป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร T3N0M0 ซึ่งได้รับการผ่าตัดกระเพาะอาหาร และ ตัดต่อหลอดอาหารกับลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ตัดม้ามทิ้ง มีประวัติการติดเชื้อโควิด-19 โดยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระหว่างวันที่ 2-20 กรกฎาคม 2564 โดยผู้ป่วยรายนี้ได้เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ด้วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ระหว่าง

วันที่ 10-14 กันยายน 2564 โดยมีประวัติหอบเหนื่อย 4 ชั่วโมงก่อนมาโรงพยาบาล โดยผู้ป่วยได้รับอาหารทางสายยาง ทางจมูกมาตลอด และ ในการให้อาหารทางสายยาง ผู้ป่วยมีอาการไอ และ สำลักมากขึ้น พร้อมกับอาเจียน หอบเหนื่อย ผลการตรวจร่างกายแรกรับ มีไข้ที่อุณหภูมิ 38.6 องศาเซลเซียส อัตราการเต้นของชีพจร 154 ครั้งต่อนาที อัตราการหายใจ 28 ครั้งต่อนาที ความดันโลหิต 173/46 มิลลิเมตรปรอท ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในเม็ดเลือดแดง 86 เปอร์เซ็นต์ การประเมินความรู้สึกตัว (E4V1M4) ผู้ป่วยลืมตาได้เอง ไม่มีการออกเสียง และ ขยับร่างกายเมื่อเจ็บปวด และ เนื่องจากผู้ป่วยมีอาการเหนื่อยมาก มีภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory failure) ได้มีการสอดท่อเข้าหลอดลม และ ตรวจพบหลักฐานของภาวะปอดบวมทั้งจากการตรวจร่างกาย และ ยืนยันด้วยภาพรังสีเอกซเรย์ โดยมีความผิดปกติที่ปอดกลีบล่างทั้งสองข้าง (Reticular opacity infiltration both lower lobes) ผลการเพาะเชื้อในเลือด และ ผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะได้ผลเป็นลบ (Negative) ผลการเพาะเชื้อจากเสมหะ (A baum sens to ceftaz pip/tazo และ resist to meropenem) พบเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในหกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิด แต่ สรุปผลภายหลังว่าผลการพบเชื้อในเสมหะควรจะเป็น contamination เนื่องจากอาการไข้ และ อาการโดยรวมของผู้ป่วยตอบสนองดีต่อ Augmentin 1.2 gm IV ทุก 8 ชั่วโมง ซึ่งให้ยาด้วยการฉีดระหว่างวันที่ 10-14 กันยายน 2564 และ ให้ยาทางการกิน 1 กรัม วันละสองครั้งรวมทั้งหมดเป็นเวลา 14 วัน ผลการรักษาได้ผลดี จนกระทั่งสามารถถอดท่อสอดหลอดลมได้ตั้งแต่วันที่ 12 กันยายน 2564 และ ไม่ต้องให้ออกซิเจน ถึงแม้ว่าผลการเพาะเชื้อในเลือดจะได้ผลลบ แต่จากอาการที่รุนแรง และ มีปอดบวม และ การตอบสนองอย่างดีต่อ Augmentin เป็นเครื่องสนับสนุนว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบคทีเรียในเลือดจริง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 8 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

Case Record Form		Sample Information			DNA Information (Spectrophotometer)			Results		
		Collection Dated	Gender	Age (year)	DNA Concentration (ng/ul)	OD 260/280	OD 260/230	Real-time PCR	Conventional PCR	Blood culture
Case 1	Whole blood	31/05/2021	Male	64	176	1.76	1.68	Not Detected	Not Detected	No growth (31/05/2021)
	Plasma				20.6	1.27	0.39	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				310.6	1.78	1.37	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				86.5	1.76	1.06	Not Detected	Not Detected	
Case 2	Whole blood	6/6/2021	Male	84	100.7	1.70	1.97	Not Detected	Not Detected	No growth (06/06/2021)
	Plasma				24.9	1.32	1.87	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				127.4	1.85	4.31	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				41.3	1.77	-2.44	Not Detected	Not Detected	
Case 3	Whole blood	11/6/2021	Male	72	187.4	1.8	1.37	Not Detected	Not Detected	No growth (08/06/2021)
	Plasma				25.1	1.37	0.52	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				227	1.79	1.48	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				92	1.7	1.36	Not Detected	Not Detected	
Case 4	Whole blood	29/06/2021	Female	78	488.5	1.76	1.54	Not Detected	Not Detected	No growth (04/07/2021)
	Plasma				81.2	1.64	1.02	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				13.8	1.35	0.59	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				256.9	1.78	1.78	Not Detected	Not Detected	
Case 5	Whole blood	29/06/2021	Female	74	338.2	1.8	1.53	Not Detected	Not Detected	No growth (02/07/2021)
	Plasma				35.9	2.44	0.56	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				174	1.85	1.73	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				370.2	1.84	2.33	Not Detected	Not Detected	
Case 6	Whole blood	10/9/2021	Male	51	305.1	1.81	1.54	Not Detected	Not Detected	No growth (08/09/2021 11/09/2021)
	Plasma				38.7	1.7	0.55	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				288.5	1.8	1.56	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				388.4	1.8	1.91	Not Detected	Not Detected	
Case 7	Whole blood	11/9/2021	Male	72	148.3	1.86	1.47	C_T Value =28.78 Gram Positive Bacteria	Not Detected	No growth (10/09/2021)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

	Plasma				25.6	1.37	0.51	C_T Value =29.57 Gram Positive Bacteria	Not Detected	
	Buffy coat				57.2	1.63	0.67	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				86.7	1.68	1.16	Not Detected	Not Detected	
Case 8	Whole blood	12/9/2021	Male	71	340.6	1.82	1.76	Not Detected	Not Detected	No growth (17/09/2022)
	Plasma				37.4	1.55	0.53	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				23	1.67	1.88	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				24.6	1.39	0.6	Not Detected	Not Detected	
Case 9	Whole blood	12/9/2021	Female	52	569	1.82	1.89	Not Detected	Not Detected	No growth (11/09/2021 15/09/2021)
	Plasma				5.8	1.32	0.3	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				52.2	0.97	0.18	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				111.5	1.72	1.29	Not Detected	Not Detected	
Case 10	Whole blood	12/9/2021	Male	53	137	1.77	1.07	Not Detected	Not Detected	No growth (12/09/2021)
	Plasma				21.3	1.15	0.42	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				1.8	2.59	0.49	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				158	1.73	1.42	Not Detected	Not Detected	
Case 11	Whole blood	15/09/2021	Male	81	451.1	1.82	1.69	Not Detected	Not Detected	N/A
	Plasma				28.7	1.32	0.43	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				57.6	1.83	1.53	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				352.2	1.79	1.85	Not Detected	Not Detected	
Case 12	Whole blood	16/09/2021	Male	87	358	1.69	0.82	Not Detected	Not Detected	No growth (18/09/2021)
	Plasma				30.9	1.37	0.54	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				51	0.74	0.11	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				206.2	1.8	1.52	Not Detected	Not Detected	
Case 13	Whole blood	19/09/2021	Male	82	322.3	1.76	1.24	Not Detected	Not Detected	No growth 20/09/2021
	Plasma				4.1	1.22	0.27	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				191.7	1.76	1.46	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				241.4	1.84	1.77	Not Detected	Not Detected	
Case 14	Whole blood	19/09/2021	Male	71	219.9	1.79	1.48	Not Detected	Not Detected	No growth (17/09/2021)
	Plasma				4.7	1.33	0.31	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				255.8	1.78	1.43	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				13.2	1.32	0.37	Not Detected	Not Detected	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Case 15	Whole blood	19/09/2021	Male	79	151.8	1.43	0.39	Not Detected	Not Detected	No growth (17/09/2021)
	Plasma				34.9	1.58	0.51	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				680.4	1.65	0.72	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				299.2	1.78	1.28	Not Detected	Not Detected	
Case 16	Whole blood	8/11/2021	Male	97	213.5	1.87	3.32	Not Detected	Not Detected	No growth (7/11/2021)
	Plasma				20.8	1.05	0.88	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				55.3	1.69	-4.72	Not Detected	Not Detected	
	White Blood Cell				361.6	1.84	2.89	Not Detected	Not Detected	
Case 17	Whole blood	13/08/2020	Male	42	280.2	1.84	1.58	Not Detected	Not Detected	No growth (11/08/2020)
	Plasma				6.2	1.12	0.19	Not Detected	Not Detected	
	Buffy coat				N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
	White Blood Cell				N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ด้วยวิธีที่ถูกต้อง รวดเร็ว และ แม่นยำ มีความสำคัญ เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม และ รวดเร็ว ตั้งแต่ในระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งจะนำไปสู่อัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้น ลดโอกาสการเกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา จากการให้ยาปฏิชีวนะมากเกินความจำเป็น ส่งผลให้ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษานาน เสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อ ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อนการรักษา เนื่องจากยาปฏิชีวนะมีกลไกในการออกฤทธิ์ของยาต่อชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ทั้งจากลักษณะโครงสร้าง และ ส่วนประกอบของเซลล์ที่ต่างกันในแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ (19, 20) การวินิจฉัยทางจุลชีววิทยาของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากเลือดเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่รู้จัก และ เชื้อที่เจริญยาก รวมทั้งการใช้เลือดปริมาณมากในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้งแบบใช้ออกซิเจน และ ไม่ใช้ออกซิเจน (7, 10) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ผู้ป่วยอาจได้รับการรักษาที่ล่าช้า

งานวิจัยนี้ศึกษาการปรับปรุงขั้นตอนก่อนการทำพีซีอาร์ (pre-PCR) โดยการแยกส่วนประกอบของเลือดเป็น 4 ส่วน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ส่วนของเลือดที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างจำเพาะ และครอบคลุมเชื้อที่อาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทั้งหมดทั้งชนิด extracellular และ intracellular bacteria เนื่องจากธรรมชาติของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะสามารถอาศัยและมีชีวิตอยู่ในส่วนประกอบของเลือดที่แตกต่างกัน และ เป็นการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยและ คาดเดาชนิดของเชื้อจากผลการวินิจฉัยเบื้องต้นทางคลินิก การได้สารพันธุกรรมของเชื้อที่มีปริมาณมากขึ้นจะช่วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี real-time PCR ชนิด TaqMan probes บริเวณ 16S rRNA ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยชุด primers และ probes ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ ตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียได้ทั้งชนิด extracellular และ intracellular bacteria แต่ไม่สามารถระบุเชื้อในระดับสปีชีส์ ด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR โดยหากต้องการระบุชนิดของเชื้ออาจต้องทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยวิธี direct sequencing

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หรือ next generation sequencing ซึ่งมีโอกาสที่จะทำการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อให้สามารถระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะมากขึ้น

จากผลการศึกษาการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดครบส่วนที่บรรจุในหลอดเก็บเลือดชนิด EDTA tube โดยใช้ EasySep™ Magnet ด้วยน้ำยา EasySep™ Direct Human cell separation Kit (STEMCELL™ Technologies) มีขั้นตอนการแยกเซลล์ที่รวดเร็วทำให้ช่วยรักษาคุณภาพเซลล์ สามารถปรับเวลาในการแยกเซลล์ให้เหมาะสมตามชนิด และ ประเภทของตัวอย่างได้ โดยการแยกเซลล์โดยตรงจากตัวอย่างเลือดครบส่วน สำหรับ 1 ตัวอย่างของเลือดสามารถดำเนินการได้ภายในเวลา 20 นาที ได้เซลล์เป้าหมายที่มีความบริสุทธิ์สูง สามารถใช้งานได้ทันที ซึ่งในงานวิจัยนี้นำมาสกัดสารพันธุกรรมต่อด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม MagDEA® Dx SV บนเครื่อง magLEAD 12g C DNA/RNA extraction Analyzer ข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษาการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดของผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมด 16 ราย พบว่าเมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกส่วนประกอบแล้ว มาสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย และ ตรวจสอบคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธี spectrophotometer ได้สารพันธุกรรมที่มีปริมาณ และ คุณภาพเหมาะสม เพียงพอในการนำไปตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิดที่อาศัยอยู่ในเซลล์ ด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารพันธุกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากวิธีการปั่นแยก บัฟฟีโคท ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ซึ่งยังมีข้อจำกัดในวิธีการเก็บตัวอย่าง การควบคุมคุณภาพของวิธีเตรียมตัวอย่าง (30) พบว่าวิธีแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยชุด EasySep™ Direct cell separation kit ได้สารพันธุกรรมที่มีปริมาณ และ คุณภาพที่ดี และ คงที่กว่าสารพันธุกรรมที่สกัดได้จาก บัฟฟีโคท มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR และ ในส่วนของสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากเลือดครบส่วน และ น้ำเลือด (plasma) เมื่อนำมาตรวจวัดประสิทธิภาพจากค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค spectrophotometer ตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบ ค่าอัตราส่วนของ OD260/OD280 ที่อยู่ในช่วง 1.6-1.8 พบว่าสารพันธุกรรมจากเลือดครบส่วนทั้ง 16 ตัวอย่าง มีปริมาณ และ คุณภาพอยู่ในช่วงค่า OD260/OD280 ที่เหมาะสมตามเกณฑ์การทดสอบ และ ในส่วนของสารพันธุกรรมจากน้ำเลือด (plasma) พบว่ามี 3 ตัวอย่าง ได้ปริมาณสารพันธุกรรมน้อยกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่งผลให้ค่าความบริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 1.6 สารพันธุกรรมที่ได้อาจมีการปนเปื้อนของสารกลุ่มโปรตีน และ ฟีนอล

ถึงแม้ว่าจากผลการศึกษาการตรวจหาแบคทีเรียด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 16 ตัวอย่าง จะยังตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวให้ผลการตรวจวิเคราะห์ตรงกับวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือดที่ให้ผลเป็นลบเช่นเดียวกัน จึงไม่ได้หมายความว่าวิธีแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยชุด EasySep™ Direct cell separation kit นี้จะไม่มี

ประโยชน์ เนื่องจากเป้าหมายหลักสำคัญในงานวิจัยนี้คาดหวังที่จะแยกส่วนประกอบของเลือดเพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของ บัฟฟีโคท และ เซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเป็นงานที่ต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อใช้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้ด้วยวิธีดังกล่าว มาใช้ทดแทนตัวอย่างบัฟฟีโคท ซึ่งมีข้อจำกัดในวิธีการเก็บ และ ควบคุมคุณภาพของวิธีเตรียมตัวอย่างซึ่งพิสูจน์ได้จากผลการทดสอบที่แสดงไว้ในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากการแยกด้วยชุดน้ำยา EasySep™ Direct Human cell separation kit (STEMCELL™ Technologies) ยังสามารถช่วยเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดที่อาศัยอยู่ในเซลล์ การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาว ร่วมกับ ตัวอย่างเลือดครบส่วน และ พลาสมาด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR จึงมีประโยชน์สมควรที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติม

ผลการทดสอบความจำเพาะ และ ความไว ของวิธี TaqMan probes real-time PCR พบว่า มีความจำเพาะต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ จากผลการศึกษาในตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ที่ทราบชนิดของเชื้อแล้วจากงานวิจัยก่อนหน้าของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ พบว่าชุด primers /probes ของวิธี TaqMan probes real-time PCR ที่ออกแบบให้สามารถแยกแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบได้จากงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาทดสอบจะแสดง fluorescence signal ด้วย gram-positive probe เท่านั้น และ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะแสดง fluorescence signal ด้วย gram-negative probe เท่านั้นเช่นเดียวกัน ซึ่งสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบความจำเพาะตรงกับผลที่ตรวจพิสูจน์แล้วของงานวิจัยก่อนหน้าคิดเป็นความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ของความจำเพาะต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบ ด้วยชุด primers/probes ของวิธี TaqMan probes real-time PCR ถึงแม้ว่าในการทดสอบความจำเพาะของชุด primers/probes ในงานวิจัยนี้จะยังไม่มีสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียชนิด intracellular bacteria มาใช้ในการทดสอบก็ตาม แต่จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุด primers/probes มาทำการตรวจสอบด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าชุด primers/probes ของวิธี TaqMan probes real-time PCR สามารถครอบคลุมเชื้อ Intracellular bacteria สายพันธุ์ *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis* และ *Neisseria meningitidis*

ผลการทดสอบความไว (limit of detection) ความสามารถในการตรวจพบเชื้อปริมาณน้อยที่สุดของชุด primers/probes ของวิธี TaqMan probes real-time PCR ผลการศึกษาพบว่ามีค่าความไว (limit of detection) เท่ากับ 1,000 copies/µl (C_T < 35) หมายความว่า ปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่ชุด primers/probes สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 1000 copies/µl เชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR จะต้องมีปริมาณเชื้อที่มีความเข้มข้นตั้งแต่

1,000 copies/µl ขึ้นไป จากค่าความไว และ ความจำเพาะของชุด primers/probes สามารถใช้ วิธี TaqMan probes real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือด และ เลือดแยกส่วน

จากผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี conventional PCR ด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียชุดเดียวกับที่ทดสอบด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่า วิธี conventional PCR สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 ตัวอย่างโดยไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบได้ และตรวจไม่พบเชื้อ 2 ตัวอย่าง อาจเนื่องจากสารพันธุกรรมมีปริมาณความเข้มข้นน้อยเกินไป โดยตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าวมีปริมาณความเข้มข้นน้อยกว่าช่วงค่า OD 260 ที่สามารถวัดค่าได้ด้วยวิธี spectrophotometer และเมื่อเปรียบเทียบผลกับวิธี TaqMan probes real-time PCR พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งหมด โดย 2 ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธี conventional PCR แสดงผลการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบน gram negative probe โดย colony No. C440 (*P. vulgaris)* แสดงผลค่า C_T =32.32 และ colony No.442 (P. mirabilis) แสดงผลค่า C_T= 31.85 [ภาพประกอบ 26] จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธี TaqMan probes real-time PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียมากกว่าวิธี conventional PCR

จากผลการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี TaqMan probes real-time PCR กับวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งหมดจำนวน 16 ราย (64 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) พบผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบเชื้อ ในผู้ป่วย 15 ราย (60 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) สอดคล้องกันทั้ง 3 การทดสอบ แสดงให้เห็นว่าว่าวิธี TaqMan probes real-time PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบผลลบที่แท้จริง เทียบเท่ากับวิธีเพาะเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR และ ผลการทดสอบด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วย 1 ราย (2 ตัวอย่างเลือดแยกส่วน) โดยตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในตัวอย่างเลือดแยกส่วนชนิด น้ำเลือด และ เลือดครบส่วน แต่ผลการตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเชื้อจากเลือด และ วิธี conventional PCR

จากข้อจำกัดของการคัดเลือกตัวอย่างในงานวิจัยนี้ยังเก็บตัวอย่างเลือดในผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเพื่อมาศึกษาได้น้อย เนื่องจากในการส่งตัวอย่างเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยภาวะวิกฤตในห้องฉุกเฉินในปัจจุบันนี้จะมีโปรแกรมการตรวจวินิจฉัย และ ให้การรักษาที่เรียกว่า Sepsis care fast-track program โดยเมื่อรับผู้ป่วยเข้ามาห้องฉุกเฉินแล้วด้วยอาการ หรือ มีผลการตรวจร่างกายแรกรับเข้าเกณฑ์ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด จะมีกำหนดเวลาว่าต้องทำการรักษาโดยเก็บเลือดเพื่อส่งตรวจเพาะเชื้อ และ ให้ยาปฏิชีวนะที่ครอบคลุมเชื้อภายในระยะเวลา 25-30 นาที โดยขั้นตอนการขอเก็บตัวอย่างผู้ป่วยที่กำหนดไว้จะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจหาเชื้อไม่ทราบสาเหตุพร้อมกับการเก็บตัวอย่างเพาะเชื้อจากเลือด แต่เนื่องจากผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะแล้วจึงยังไม่

สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้ โดยมีการเก็บตัวอย่างภายหลังเมื่อผู้ป่วยพักรักษาตัวที่หอผู้ป่วย เป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการคัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด จึงทำให้ไม่สามารถดำเนินการตามวัตถุประสงค์เดิมที่จะเทียบว่าการทดสอบด้วยวิธี TaqMan probes real-rime PCR จะมีความเร็วกว่า 24 ชั่วโมงหรือไม่ และ เนื่องจากสถานการณ์แพร่ระบาดของโรค COVID-19 ที่มีการปิดรับผู้ป่วยฉุกเฉิน การเก็บตัวอย่างจึงทำได้ยากขึ้น

เนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยในงานวิจัยนี้ยังมีจำนวนน้อย และ ยังไม่มีผู้ป่วยยืนยันผลบวกด้วยวิธีเพาะเชื้อจากเลือด จากผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเชื้อจากเลือด ในผู้ป่วย 16 ราย ซึ่งทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งผลการวินิจฉัยทาง clinical ของผู้ป่วยทุกรายเข้าเกณฑ์ของผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด จึงอาจสรุปได้ว่าผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ไม่ได้มีประสิทธิภาพด้อยไปกว่าวิธีเพาะเชื้อจากเลือด เนื่องจากให้ผลการตรวจที่มีความสอดคล้องกัน คือตรวจไม่พบเชื้อในผู้ป่วย 15 ราย เช่นเดียวกัน แต่วิธี TaqMan probes real-time PCR ยังมีข้อดีกว่า คือสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในผู้ป่วย 1 ราย ในตัวอย่างเลือดครบส่วน และ น้ำเลือด (plasma) ซึ่งผู้ป่วยรายนี้ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเชื้อจากเลือด การเพาะเชื้อจากปัสสาวะ และ ผลการเพาะเชื้อจากเสมหะที่ให้ผล *Acinetobacter baumannii* ซึ่งรายงานผลภายหลังว่าเป็นการ contamination ทั้งนี้แพทย์ได้ทำการรักษาผู้ป่วยรายนี้ไปแล้วด้วยการให้ยา Augmentin ผลพบว่าผู้ป่วยมีการตอบสนองดี ได้ทำการศึกษาประวัติ และ ผลการรักษาของผู้ป่วยรายที่ตรวจพบผลบวกด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR พบว่า

จากประวัติ และ ผลการรักษา ของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อรายนี้ เป็นผู้ป่วยเพศชาย อายุ 72 ปี มีโรคประจำตัว ได้รับการผ่าตัดกระเพาะอาหาร และ ตัดต่อหลอดอาหารกับลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ตัดม้ามทิ้ง เนื่องมาจากโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ได้รับอาหารทางสายยาง ทางจมูก มาตลอด โดยผู้ป่วยรายนี้ได้เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างวันที่ 10-14 กันยายน 2564 ด้วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ผลการตรวจร่างกายแรกรับ มีไข้ที่อุณหภูมิ 38.6 องศาเซลเซียส อัตราการเต้นของชีพจร 154 ครั้งต่อนาที อัตราการหายใจ 28 ครั้งต่อนาที ความดันโลหิต 173/46 มิลลิเมตรปรอท ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในเม็ดเลือดแดง 86 เปอร์เซ็นต์ การประเมินความรู้สึกตัว (E4V1M4) ผู้ป่วยลืมตาได้เอง ไม่มีการออกเสียง และ ขยับร่างกายเมื่อเจ็บปวด มีภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory failure) ได้มีการสอดท่อเข้าหลอดลม และ ตรวจพบหลักฐานของภาวะปอดบวมทั้งจากการตรวจร่างกาย และ ยืนยันด้วยภาพรังสีเอกซเรย์ โดยมีความผิดปกติที่ปอดกลีบล่างทั้งสองข้าง (reticular opacity infiltration both lower lobes) และรายงานผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ พบว่ามีผลการเพาะเชื้อจากเลือด และ ผลการ

เพาะเชื้อจากปัสสาวะเป็นลบ แต่ผลการเพาะเชื้อจากเสมหะพบเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ซึ่งมีการสรุปภายหลังว่าผลการพบเชื้อในเสมหะเป็น contamination

Acinetobacter เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างกลมท่อน (coccobacilli) สามารถก่อโรคได้ในหลายระบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางเดินหายใจส่วนล่าง โดยสปีชีสที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อคือ *Acinetobacter baumannii* มีการติดเชื้อได้ในหลายอวัยวะ ทั้งการติดเชื้อที่ปอด การติดเชื้อในระบบทางเดินปสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อบุชองทองอักเสบ และ การติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งเชื้อสามารถอยู่ในส่วนของเลือดครบส่วน และ น้ำเลือด เชื้อมีความสามารถในการจับกับเซลล์ และ สร้างสารทำลายเนื้อเยื่อ สามารถคงทนอยู่ในสภาพแวดลอมได้นาน มีอุบัติการณ์สูงในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่เคยพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานานมากกว่า 90 วัน รวมทั้งผู้ป่วยหนักติดเตียง จากข้อมูลการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลในสหรัฐอเมริกา *Acinetobacter baumannii* คิดเป็นร้อยละ 1.3 ของการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยพบการติดเชื้อในกระแสเลือดมากจากห้องฉุกเฉินมากกว่าจากหน่วยรักษาผู้ป่วยอื่น ๆ การติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในกระแสเลือดมีอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับสามในห้องฉุกเฉินรองจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa และ Candida spp.*(46) *Acinetobacter baumannii* ไม่มีปัจจัยก่อความรุนแรงของโรคที่เด่นชัด แต่มีอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพสูง และ หลายชนิด จึงถูกจัดเป็นหนึ่งในหกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิด จากผลการเพาะเชื้อในเสมหะของผู้ป่วยรายนี้มีการรายงานผลในภายหลังว่าผลการพบเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในเสมหะเป็น contamination และ ผลจากการได้รับยาผู้ป่วยมีการตอบสนองดีต่อยา Augmentin อาการของผู้ป่วยที่ดีขึ้นเมื่อได้รับยาปฏิชีวนะช่วยยืนยันว่าผู้ป่วยไม่ได้ติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในเสมหะ และ อาจมีการติดเชื้อแบคทีเรียไม่ทราบสาเหตุชนิดอื่น

จากอาการทางคลินิกของผู้ป่วย และ ผลการตรวจร่างกายแรกรับดังกล่าวข้างต้นซึ่งเข้าเกณฑ์ของอาการภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ร่วมกับผู้ป่วยมีภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน ต้องสอดท่อเข้าหลอดลม และ ผลจากการตรวจร่างกายพบหลักฐานของของภาวะปอดบวม ยืนยันด้วยภาพรังสีเอกซเรย์ โดยมีความผิดปกติที่ปอดกลีบล่างทั้งสองข้าง และ เนื่องจากอาการไข้ และ อาการโดยรวมของผู้ป่วยตอบสนองดีต่อ Augmentin 1.2 gm IV ทุก 8 ชั่วโมง ซึ่งให้ยาด้วยการฉีดระหว่างวันที่ 10-14 กันยายน 2564 และ การรับประทาน Augmentin 1 กรัม วันละสองครั้ง รวมทั้งหมดเป็นเวลา 14 วัน ผลการรักษาได้ผลดีจนกระทั่งสามารถถอดท่อสอดหลอดลมได้ตั้งแต่วันที่ 12 กันยายน 2564 และ ไม่ต้องให้ออกซิเจน ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นอย่างมาก เป็นอีกเหตุผลที่สนับสนุนว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดจริง

ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าผลการเพาะเชื้อในเลือดจะได้ผลลบ แต่จากอาการที่รุนแรง มีภาวะปอดบวม และ การตอบสนองอย่างดีต่อ Augmentin เป็นเครื่องสนับสนุนว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบคทีเรียใน

เลือดจริง ดังนั้น การเตรียมกระบวนการตรวจหาเชื้อทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการแยกส่วนประกอบของเลือด และ การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ที่ได้พัฒนาในงานวิจัยนี้ เป็นเครื่องสะท้อนให้เห็นว่า น่าจะสามารถนำมาใช้ได้จริง โดยผลของวิธีทดสอบนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับผลการวินิจฉัยทางคลินิก และ ผลการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยที่ดีขึ้น ในขณะที่ผลการเพาะเชื้อเป็นลบในทุกชนิดตัวอย่างส่งตรวจ ผลการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในเลือดด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ถึงแม้จะตรวจพบในผู้ป่วยเพียง 1 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 16 ราย แต่สามารถตอบคำถามของงานวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์หลักสำคัญของงานวิจัยนี้ที่ทำการศึกษา เพื่อปรับปรุงวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการให้มีความไว ความจำเพาะ สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็วขึ้น เป็นข้อมูลสำหรับแพทย์ในการช่วยวินิจฉัย และ ให้การรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วขึ้น ในกรณีที่ยังไม่ทราบผลการเพาะเชื้อ หรือ ผลการเพาะเชื้อเป็นลบ จะสามารถช่วยสนับสนุนการวินิจฉัย และ การเลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย นอกจากนี้ผลที่ได้จากวิธี TaqMan probes real-time PCR ยังมีความไวกว่าวิธี conventional PCR การศึกษาในขั้นต้นดังกล่าวควรที่จะได้รับการต่อยอดในอนาคต โดยมีตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่มากขึ้น เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพของวิธี TaqMan probes real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อจากเลือด ทั้งนี้ประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ อาจจะสามารถเทียบเคียงได้กับวิธีการเพาะเชื้อจากเลือด และ/หรือการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะดังตัวอย่างที่ปรากฏในผู้ป่วยรายนี้

จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า วิธีแยกส่วนประกอบของเลือดเพื่อปรับปรุงขั้นตอนก่อนพีซีอาร์ ร่วมกับ วิธี TaqMan probes real-time PCR เป็นอีกทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในเลือดทางห้องปฏิบัติการ ในขั้นตอนการแยกส่วนประกอบของเลือดออกเป็น 4 ส่วน ก่อนนำมาสกัดสารพันธุกรรม จะทำให้ได้ส่วนของเลือดที่จำเพาะและครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด และ สามารถเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของเชื้อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ นอกจากนี้ชุด primers และ probes ของวิธี TaqMan probes real-time PCR ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ยังสามารถแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ได้อย่างจำเพาะ และ สามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งชนิด extracellular และ intracellular bacteria มีค่าความไว (limit of detection) เท่ากับ 1,000 copies/µl (C_T < 35) หมายความว่า ปริมาณเชื้อน้อยที่สุดที่ชุด primers/probes สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 1000 copies/µl โดยใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ไม่เกิน 4 ชั่วโมง รวมเวลาตั้งแต่การแยกส่วนประกอบของเลือด การสกัดสารพันธุกรรม และ ขั้นตอน real-time PCR สามารถรายงานผลการตรวจได้ภายใน 1 วัน ทำให้ได้รับผลการตรวจที่รวดเร็วขึ้น

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาซึ่งยังมีจำนวนน้อยจึงยังไม่สามารถแสดงผลของการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างวิธี TaqMan probes real-time

PCR กับ วิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อจากเลือดได้อย่างครบถ้วน การศึกษาในขั้นต้นดังกล่าวควรที่จะได้รับการศึกษาเพิ่มเติม โดยมีการคัดเลือกตัวอย่างเลือดเพิ่มเติมในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพของวิธี TaqMan probes real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อจากเลือด ทั้งนี้ประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ อาจจะสามารถเทียบเคียงได้กับวิธีการเพาะเชื้อจากเลือด และ/หรือการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะดังตัวอย่างที่ปรากฏในผู้ป่วยรายที่ตรวจพบผลบวกจากงานวิจัยนี้ นอกจากนี้วิธีแยกส่วนประกอบของเลือดเพื่อปรับปรุงขั้นตอนก่อนพีซีอาร์ร่วมกับ วิธี TaqMan probes real-time PCR สามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาเพื่อขยายขอบเขตในการวินิจฉัยของห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวของกับโรคติดเชื้อทางสมอง และ ระบบประสาท ที่เกี่ยวข้องกับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งในปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการใช้วิธีการตรวจหาเชื้อด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป และ วิธี multiplex PCR แต่ยังไม่สามารถครอบคลุมเชื้อได้ทั้งหมด ยังมีกรณีของผู้ป่วยมีอาการของโรคติดเชื้อซึ่งไม่สามารถหาสาเหตุ หรือ ระบุชนิดของเชื้อได้ และมีผลการตรวจไม่พบเชื้อทั้งด้วยวิธี PCR และการเพาะเชื้อจากเลือด มีสมมุติฐานว่าเชื้อดังกล่าว อาจจะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด intracellular bacteria ซึ่งอาศัยอยู่ในเซลล์ วิธีการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ศึกษาในงานวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มปริมาณ และ คุณภาพของสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียชนิด intracellular bacteria และ ชุด primers/probes ของวิธี TaqMan probes real-time PCR ยังสามารถครอบคลุมเชื้อที่เกี่ยวของกับโรคติดเชื้อทางสมองในกลุ่ม *Haemophilus influenzae , Listeria monocytogenes, Neisseria meningitidis, Enterobacter* และ *Streptococcus spp*. ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ และ การศึกษาต่อยอดของงานวิจัยในอนาคต จะช่วยให้มีวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจระบุชนิดของเชื้อก่อโรคในเลือด และ ช่วยในการเลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ หรือ เข้ารับการรักษา มีการพยากรณ์โรคที่ดีขึ้น และลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจากภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด

อย่างไรก็ตามความรวดเร็วของการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการรักษาผู้ป่วยภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ดังนั้นวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จึงอาจจะเป็นอีกทางเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ และ รายงานผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว โดยมีรายละเอียด และ เวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แต่ละขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนการแยกส่วนประกอบของเลือดทั้ง 4 ส่วนใช้เวลา 60 นาที ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมของเลือดแยกส่วนใช้เวลา 45 นาที ขั้นตอนการวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี spectrophotometer 15 นาที และ ขั้นตอนวิธี TaqMan probes real-time PCR รวมเวลาเตรียมปฏิกิริยา PCR และ เวลาทำปฏิกิริยาบนเครื่อง real-time PCR ใช้เวลา 90

นาที ดังนั้นด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถรายงานผลการทดสอบหลังจากได้รับตัวอย่างภายในเวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

REFERENCES

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-10.

2. Dugar S, Choudhary C, Duggal A. Sepsis and septic shock: Guideline-based management. Cleve Clin J Med. 2020;87(1):53-64.

3. Seckel MA. Sepsis-3: The new definitions. Nursing2020 Critical Care. 2017;12(2):37-43.

4. Markwart R, Saito H, Harder T, Tomczyk S, Cassini A, Fleischmann-Struzek C, et al. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. Intensive Care Med. 2020;46(8):1536-51.

5. Plevin R, Callcut R. Update in sepsis guidelines: what is really new? Trauma Surg Acute Care Open. 2017;2(1):e000088.

6. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet. 2020;395(10219):200-11.

7. Timsit JF, Ruppe E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. Intensive Care Med. 2020;46(2):266-84.

8. Warhurst G, Dunn G, Chadwick P, Blackwood B, McAuley D, Perkins GD, et al. Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review. Health Technology Assessment. 2015;19(35).

9. Trung NT, Tong HV, Lien TT, Son TV, Huyen TTT, Quyen DT, et al. Clinical utility of an optimised multiplex real-time PCR assay for the identification of pathogens causing sepsis in Vietnamese patients. International Journal of Infectious Diseases. 2018;67:122-8.

10. Trung NT, Thau NS, Bang MH, Song LH. PCR-based Sepsis@Quick test is superior in comparison with blood culture for identification of sepsis-causative pathogens. Sci Rep. 2019;9(1):13663.

11. Liu CF, Shi XP, Chen Y, Jin Y, Zhang B. Rapid diagnosis of sepsis with TaqMan-Based multiplex real-time PCR. J Clin Lab Anal. 2018;32(2).

12. Valle DL, Jr., Andrade JI, Cabrera EC, Rivera WL. Evaluation of buffy coat 16S rRNA PCR, buffy coat culture and whole blood PCR for detection of bacteraemia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(2):117-22.

13. Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology-Sgm. 1996;142:3-16.

14. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology. 2007;45(9):2761-4.

15. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. J uoeh. 2016;38(3):223-32.

16. Hiremath P, Bannigidad P, Yelgond S. Identification of Flagellated or Fimbriated Bacterial Cells using Digital Image Processing Techniques. International Journal of Computer Applications. 2012;59:12-6.

17. Atanasova K. Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs 2010.

18. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus. 2017;9(6):e1403.

19. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2017;33(3):300-5.

20. Ullah H, Ali S. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions. 2017.

21. Kaufman G. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. Nurs Stand. 2011;25(42):49-55.

22. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. Plos One. 2015;10(2).

23. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and

management. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):603-61.

24. Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB. Killing from the inside: Intracellular role of T3 SS in the fate of Pseudomonas aeruginosa within macrophages revealed by mgtC and oprF mutants. PLoS Pathog. 2019;15(6):e1007812.

25. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology (Reading). 2009;155(Pt 6):1749-57.

26. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections. Annals of Microbiology. 2011;61(4):717-32.

27. Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC, Morrison M. Proteus spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2018;31(3).

28. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev. 2019;32(4).

29. Davin-Regli A, Pagès JM. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Front Microbiol. 2015;6:392.

30. Khattak ZE, Anjum F. Haemophilus Influenzae. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

31. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Microbe Profile: Listeria monocytogenes: a paradigm among intracellular bacterial pathogens. Microbiology (Reading). 2019;165(7):719-21.

32. Chai Q, Zhang Y, Liu CH. Mycobacterium tuberculosis: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:158.

33. Sharma SK, Mohan A, Kohli M. Extrapulmonary tuberculosis. Expert Rev Respir Med. 2021;15(7):931-48.

34. Rouphael NG, Stephens DS. Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology. Methods Mol Biol. 2012;799:1-20.

35. Thakur A, Mikkelsen H, Jungersen G. Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. J Immunol Res. 2019;2019:1356540.

36. Vera S, Martínez R, Gormaz JG, Gajardo A, Galleguillos F, Rodrigo R. Novel relationships between oxidative stress and angiogenesis-related factors in sepsis: New

biomarkers and therapies. Ann Med. 2015;47(4):289-300.

37. Sarkar M, Niranjan N, Banyal PK. Mechanisms of hypoxemia. Lung India. 2017;34(1):47-60.

38. Vincent J-L, De Backer D. Circulatory Shock. New England Journal of Medicine. 2013;369(18):1726-34.

39. Proudfoot AG, McAuley DF, Griffiths MJ, Hind M. Human models of acute lung injury. Dis Model Mech. 2011;4(2):145-53.

40. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology. 2015;6.

41. Arya M, Shergill I, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel H. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert review of molecular diagnostics. 2005;5:209-19.

42. Zhao YA, Park S, Kreiswirth BN, Ginocchio CC, Veyret R, Laayoun A, et al. Rapid Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification-Molecular Beacon Platform To Detect Fungal and Bacterial Bloodstream Infections. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(7):2067-78.

43. Han H, Hu ZY, Sun SM, Yao F, Yan XH, Zhang XM, et al. Simultaneous Detection and Identification of Bacteria And Fungi in Cerebrospinal Fluid by TaqMan Probe-Based Real-Time PCR. Clinical Laboratory. 2014;60(8):1287-93.

44. Wang HY, Kim S, Kim H, Kim J, Kim Y, Park SD, et al. Real-time PCR TaqMan assay for rapid screening of bloodstream infection. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014;13:3.

45. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J Clin Microbiol. 2007;45(4):1211-8.

46. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012;3(3):243-50.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การสกัดสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ magLEAD 12gC

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ดูดตัวอย่างใส่ sample tube 0.4 ml

ขั้นตอนการสกัด nucleic acid

1. เปิดเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ
2. เลือก function การใช้งาน
3. เตรียม cartridge น้ำยาสกัดสารพันธุกรรม และ tip ก่อนการใช้งาน ควรเช็คว่าไม่มีส่วน ประกอบของน้ำยาติดบริเวณด้านบนใน cartridge หากมีน้ำยาติดบริเวณด้านบนใน cartridge สะบัดให้ส่วนประกอบของน้ำยาตกลงมาและต้องไม่มีฟองอากาศ จำนวน consumable ที่ใช้ต่อการสกัด 1 ตัวอย่าง มีดังนี้
   - Nucleic acid extraction cartridge MagDEA® Dx SV 1 ชิ้น
   - Tip set 1 ชิ้น
   - Collection tube 1 ชิ้น
   - Sample tube 1 ชิ้น
4. เลือก protocol สำหรับการใช้งาน
5. ตรวจเช็คการจัดวางองค์ประกอบชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม MagDEA® Dx SV, Sample tube, Collection tube สำหรับใส่ elution, Tip rack จัดวางอย่างถูกต้องตาม คู่มือคำแนะนา การใช้งาน
6. ปิดฝาประตูเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ
7. กดปุ่ม start เพื่อเริ่มขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที
8. หลังจากสกัดสารพันธุกรรมเรียบร้อยแล้ว ทำการเก็บ elution 50 ul ที่อยู่ใน Collection tube ออกจากเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ และติดสติ๊กเกอร์หลอดให้ เรียบร้อย
9. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm นาน 2 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C รอทำ real-time PCR

Reference: magLEAD 12gC (Precision System Science Co., Ltd.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

16s rRNA Bacterial conventional PCR protocol

Note: Avoiding sample contamination

Instrument: ProFlex PCR System

Reagents: Molecular grade sterile distilled water (Nuclease free)
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) cat # M8295
10 mM dNTPs
10 μM 8F primer
10 μM 536R primer/ 1392R

PCR reaction mix worksheet

Operator: _____Perform date: _____Extraction kit used: _____

Note: _____

PCR master mix

No.	Component	1x (μl)	__ x (μl)
1	Nuclease free DW	18	
2	2X Gotaq® Green master mix	25	
5	10 μM 8F primer	1	
6	10 μM 536R primer/ 1392R	1	
	Total	**45**	
8	Template DNA (50 ng/ul)	5	

PCR reaction condition

95°C	2 min	
95°C	45 sec	35 cycles
46°C	45 sec	
72°C	45 sec	
72°C	5 min	
4 °C	Forever	

Positive control: TOP10 *E. coli* 50 ng 2 μl

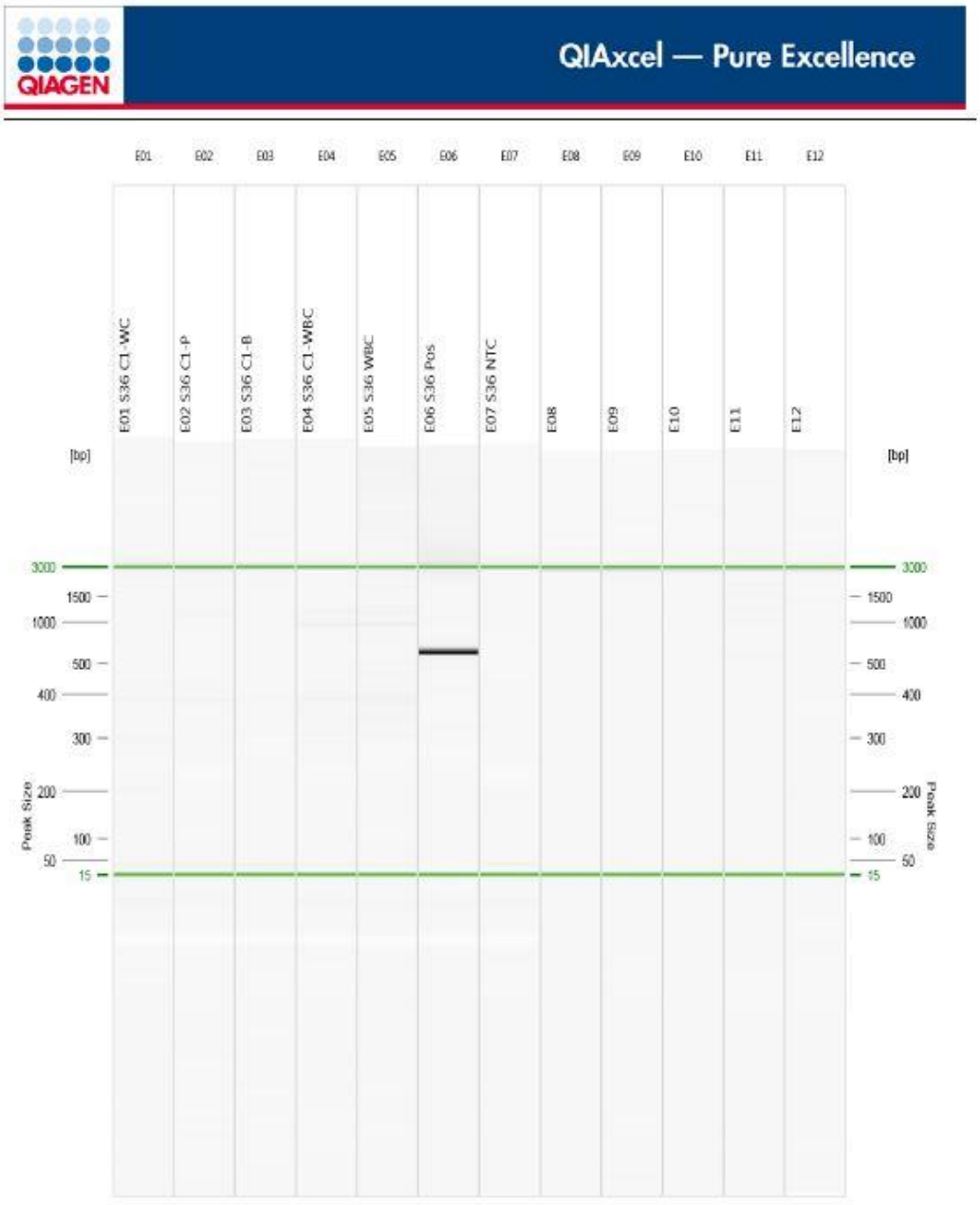
Visualizing results: Run 10 μl of PCR products on 1.5% agarose gel.

Interpretation: Target at 16s rRNA gene

Product size V1-V3 = ~ 528 bp

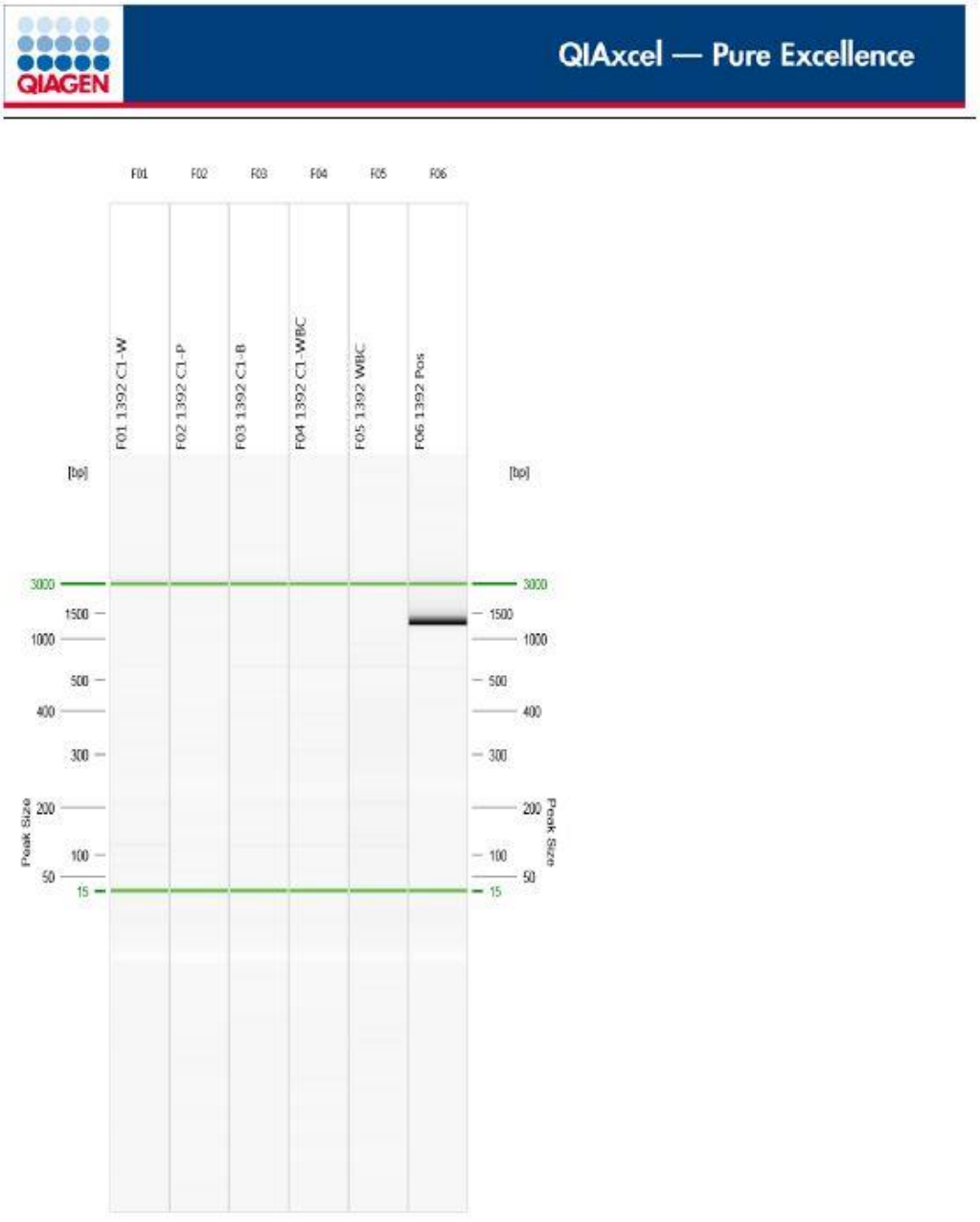
V1-V9 = ~ 1384 bp

ภาคผนวก ค



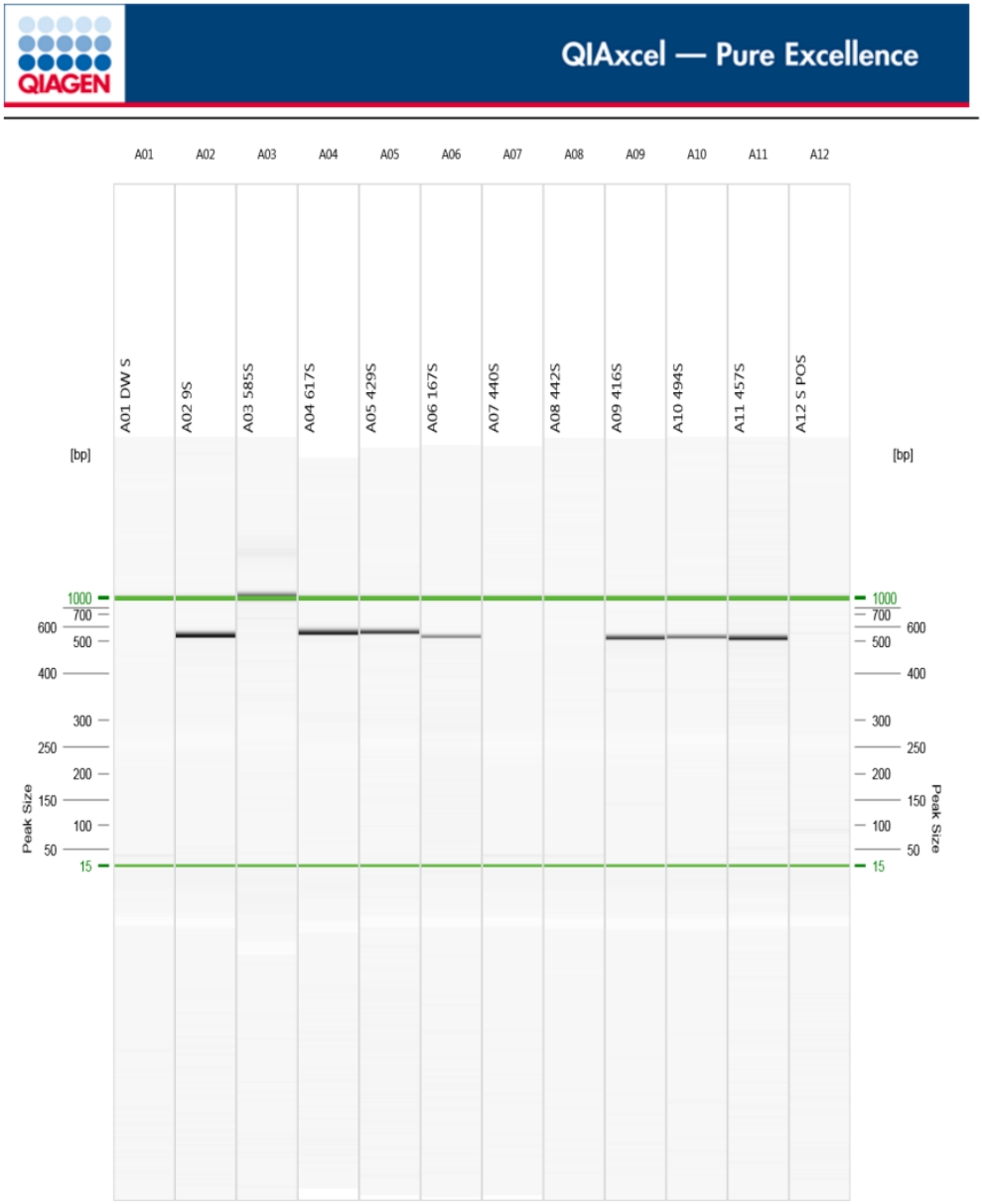
ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธี Conventional PCR (V1-V3 = ~ 528 bp)

Target at 16s rRNA gene >Product size V1-V3 = ~ 528 bp



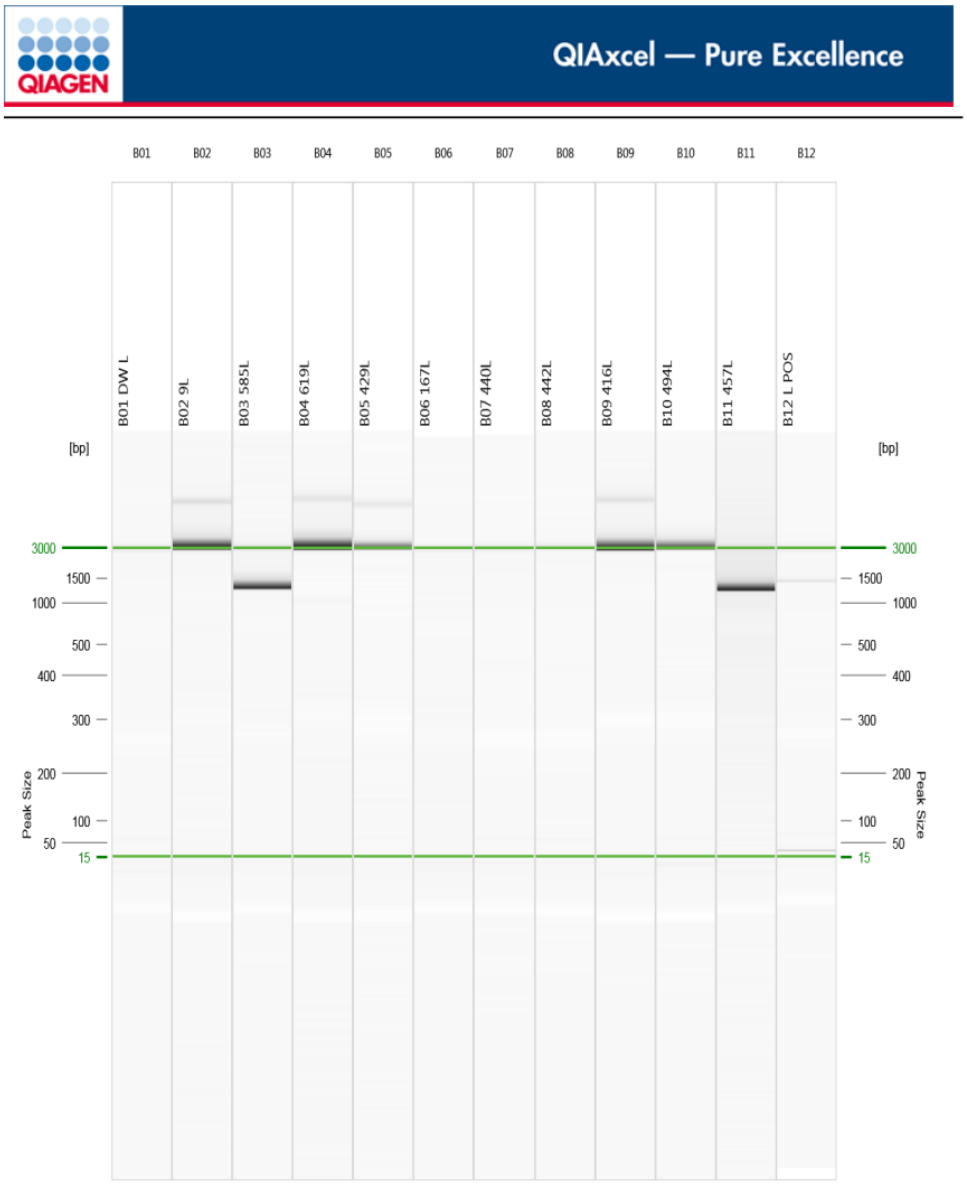
ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยวิธี Conventional PCR (V1-V9 = ~ 1384 bp)

Target at 16s rRNA gene >Product size V1-V9 = ~ 1384 bp



ภาพประกอบ 16 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Conventional PCR (V1-V3 = ~ 528 bp)

Target at 16s rRNA gene >Product size V1-V3 = ~ 528 bp



ภาพประกอบ 17 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Conventional PCR (V1-V9 = ~ 1384 bp)

Target at 16s rRNA gene >Product size V1-V9 = ~ 1384 bp

ภาคผนวก ง

EasySep™ Direct Human cell separation kit (STEMCELL™ Technologies) ในงานวิจัยนี้ใช้ชุดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว 3 ชนิด ดังแสดงใน [ภาพประกอบ 16-18] โดยใช้ EASYSEP ™ MAGNETS รุ่น “The Big Easy” (Catalog # 18001)

EasySep™ Negative Selection

EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation Kit

STEMCELL™ TECHNOLOGIES

Directions for Use – Manual EasySep™ Protocols

See page 1 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Tables 1 and 2 for detailed instructions regarding the EasySep™ procedure for each magnet.

Table 1. EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation Kit Protocol

		EASYSEP™ MAGNETS	
STEP	INSTRUCTIONS	EasySep™ (Catalog #18000)	“The Big Easy” (Catalog #18001)
1	Add whole blood sample to required tube.	0.5 - 1 mL	1 - 3 mL
	Required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38007)	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds
3	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
4	Add RapidSpheres™ to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
5	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
6	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume.‡ Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Top up to 4X the original sample volume	Top up to 4X the original sample volume
7	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 3 minutes	RT for 5 minutes
8	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube, pouring the enriched cell suspension* into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
9	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
10	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 9 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 3 minutes	RT for 5 minutes
11	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
12	Remove the tube from the magnet and place the new tube from step 11 (without lid) into the magnet and incubate for a third separation.	RT for 3 minutes	RT for 5 minutes
13	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Isolated cells are ready for use	Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)
‡ When using the maximum top-up volume the sample may extend above the top of the magnet. This will not affect performance.
* Following the first magnetic separation the collected cells may contain a significant amount of RBCs and may look similar to the original unprocessed human whole blood sample.
** To minimize RBC contamination in the isolated cells, pour off the sample along a clean area of the tube (i.e. the opposite side to where the sample was poured in).

ภาพประกอบ 18 EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation KIT Protocol

EasySep™ Negative Selection

EasySep™ Direct Human Pan-Granulocyte Isolation Kit

STEMCELL™ TECHNOLOGIES

Directions for Use – Manual EasySep™ Protocols

See page 1 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Tables 1 and 2 for detailed instructions regarding the EasySep™ procedure for each magnet.

Table 1. EasySep™ Direct Human Pan-Granulocyte Isolation Kit Protocol

		EASYSEP™ MAGNETS	
STEP	INSTRUCTIONS	EasySep™ (Catalog #18000)	"The Big Easy" (Catalog #18001)
1	Collect sample within the volume range.	0.5 - 2 mL	1 - 6 mL
	Add whole blood sample to required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Corning Catalog #352058)	14 mL (17 x 100 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Corning Catalog #352057)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds
3	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
4	Add RapidSpheres™ to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
5	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
6	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume‡. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Top up to 4 mL	• Top up to 10 mL for samples < 4 mL • Top up to 12 mL for samples ≥ 4 mL
7	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
8	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube, pouring the enriched cell suspension* into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
9	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
10	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 9 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
11	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
12	Remove the tube from the magnet and place the new tube (without lid) into the magnet and incubate for a third separation.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
13	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Isolated cells are ready for use	Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)
‡ When using the maximum top-up volume the sample may extend above the top of the magnet. This will not affect performance.
* Following the first magnetic separation the collected cells may contain a significant amount of RBCs and may look similar to the original unprocessed human whole blood sample.
** To minimize RBC contamination in the isolated cells, pour off the sample along a clean area of the tube (i.e. the opposite side to where the sample was poured in).

ภาพประกอบ 19 EasySep™ Direct Human Pan-Granulocyte Isolation KIT Protocol

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit

STEMCELL™ TECHNOLOGIES

Directions for Use – Manual EasySep™ Protocols

See page 1 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Tables 1 and 2 for detailed instructions regarding the EasySep™ procedure for each magnet.

Table 1. EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit Protocol for WHOLE BLOOD, BUFFY COAT, or SPLEEN

		EASYSEP™ MAGNETS	
STEP	INSTRUCTIONS	EasySep™ (Catalog #18000)	"The Big Easy" (Catalog #18001)
1	Collect sample within the volume range.	0.5 - 1.5 mL	1.5 - 7 mL
	Add whole blood sample to required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38007)	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds
3	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
4	Add RapidSpheres™ to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
5	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
6	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Top up to 2.5 mL	• Top up to double the volume for samples ≤ 5 mL • Top up to 10 mL for samples > 5 mL
7	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
8	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube, pouring the enriched cell suspension* into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
9	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
10	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 9 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
11	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Isolated cells are ready for use	Use a new 14 mL tube
12	Remove the tube from the magnet and place the new tube (without lid) into the magnet and incubate for a third separation.	---	RT for 5 minutes
13	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	---	Isolated cells are ready for use

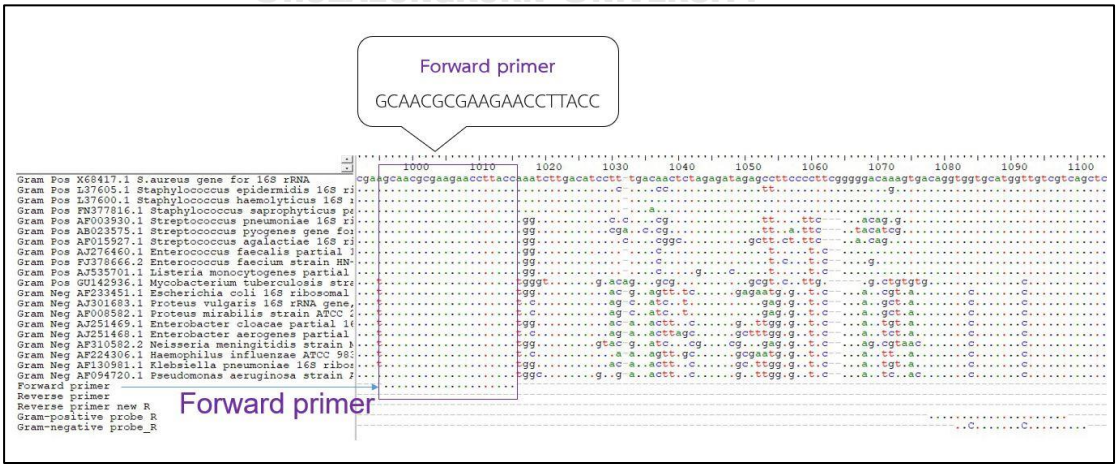
RT; room temperature (15 - 25°C)
* Following the first magnetic separation the collected cells may contain a significant amount of RBCs and may look similar to the original unprocessed human whole blood sample.
** To minimize RBC contamination in the isolated cells, pour off the sample along a clean area of the tube (i.e. the opposite side to where the sample was poured in).

ภาพประกอบ 20 EasySep™ Direct Human Total lymphocyte Isolation KIT Protocol

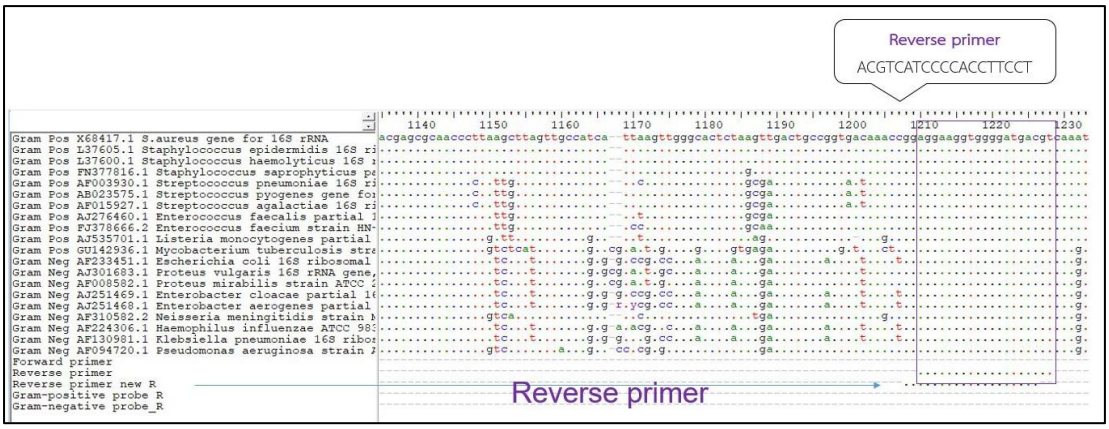
ภาคผนวก จ

Primers and probes 16S rRNA for bacteria detection using real-time PCR

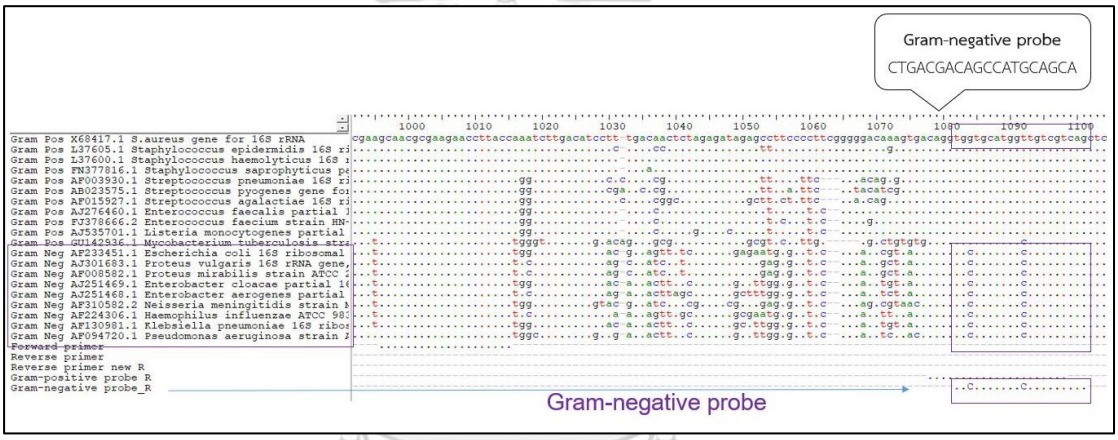
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพประกอบ 21 Conserve alignment 16S rRNA Forward primer.

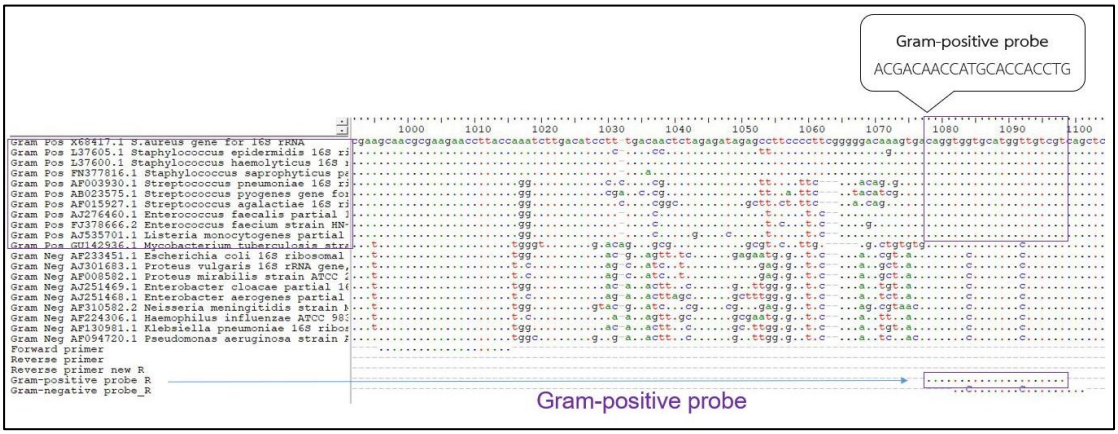


ภาพประกอบ 22 Conserve alignment 16S rRNA Reverse primer.



ภาพประกอบ 23 Conserve alignment 16S rRNA gram-negative probe.

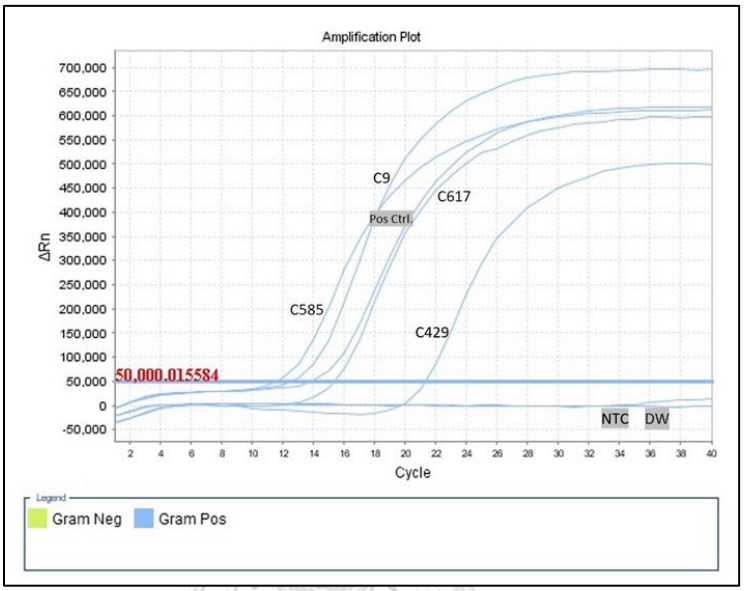
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



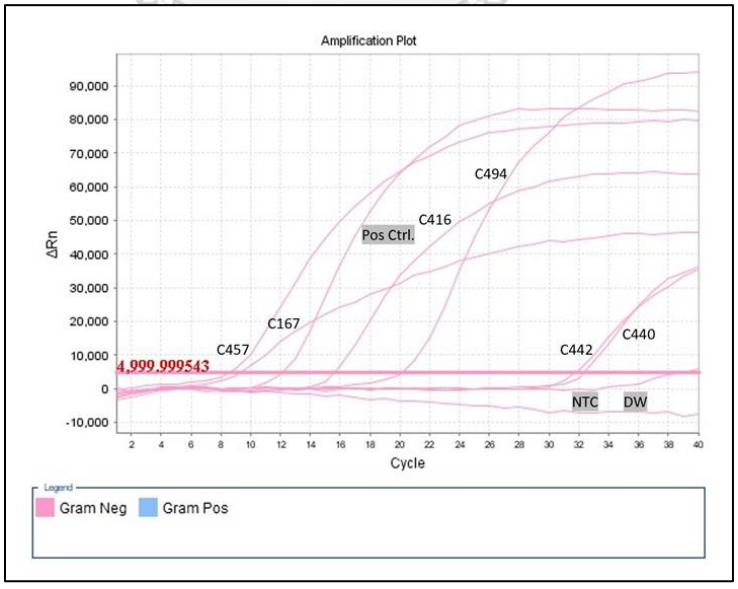
ภาพประกอบ 24 Conserve alignment 16S rRNA gram-positive probe.

ภาคผนวก ฉ

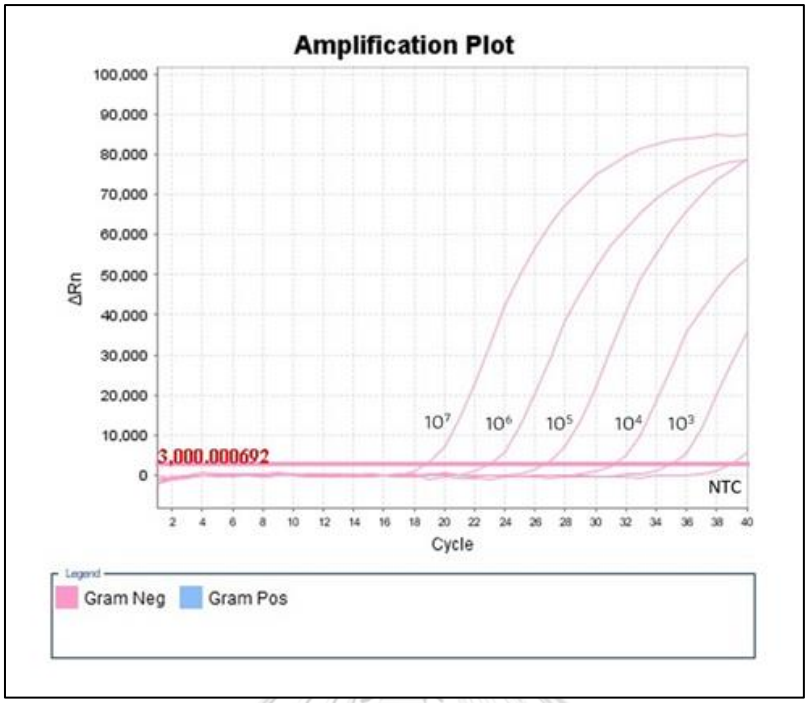
ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR



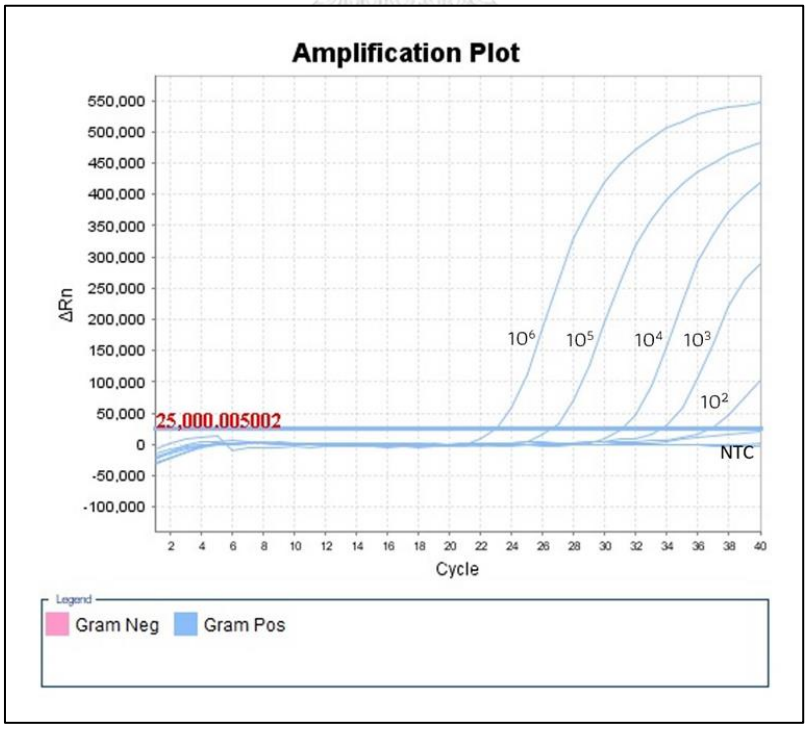
ภาพประกอบ 25 Specificity results of gram-positive probes.



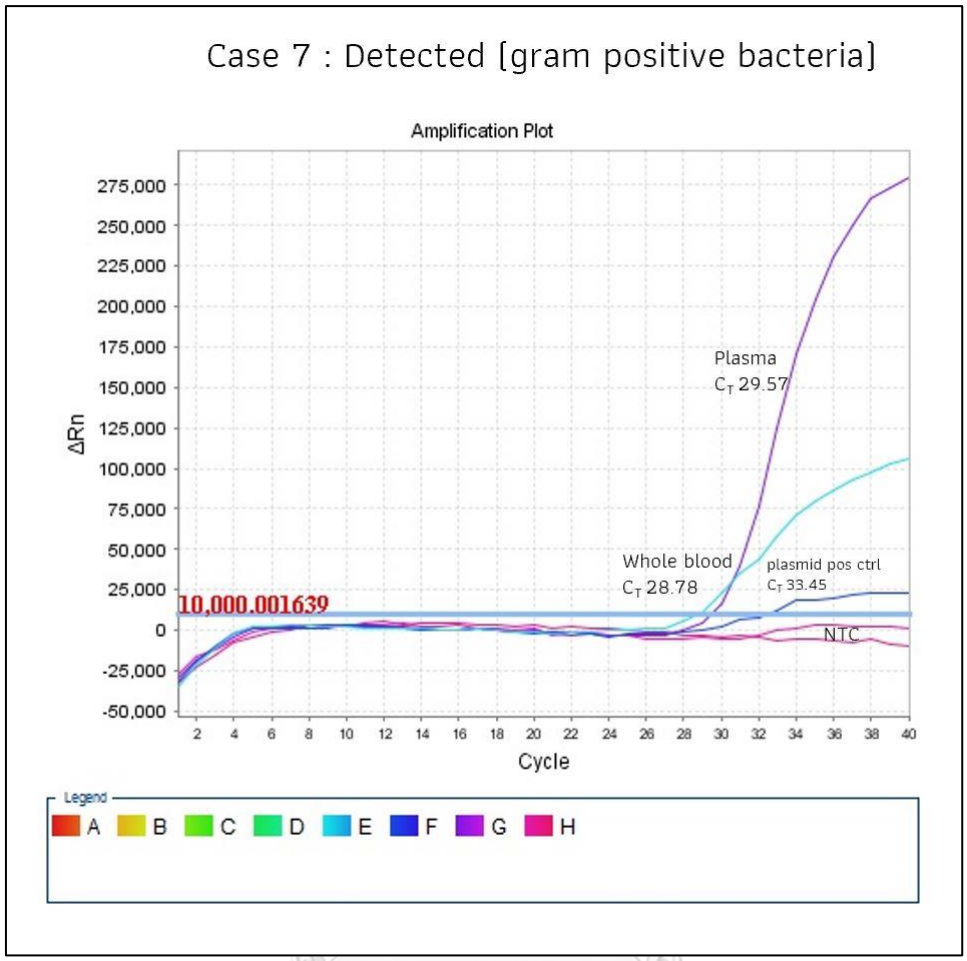
ภาพประกอบ 26 Specificity results of gram-negative probes.



ภาพประกอบ 27 Sensitivity results of gram-negative probes.



ภาพประกอบ 28 Sensitivity results of gram-positive probes.



ภาพประกอบ 29 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดด้วยวิธี TaqMan probes real-time PCR ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 2 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

VITA

NAME	นางสาวพรรณี วรรณทอง
DATE OF BIRTH	26 December 1978
PLACE OF BIRTH	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
INSTITUTIONS ATTENDED	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ปีการศึกษา 2543 ปัจจุบันศึกษาต่อ หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
HOME ADDRESS	41/31 คอนโดฟีล ซอยลาดพร้าว 33 แขวงจันทรเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University