การเปรียบเทียบการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีโดยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิง กับวิธีเพาะเชื้อโดยมาตรฐาน ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

น.ส.ปัณณพร ทองสุก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The Comparison of Nanopore Sequencing and Antimicrobial Susceptibility Standard Test in Diagnosis of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Urinary tract Infection in King Chulalongkorn Memorial Hospital

Miss Pannaporn Thongsuk

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีโดยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิงกับวิธีเพาะเชื้อโดยมาตรฐานในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
โดย	น.ส.ปัณณพร ทองสุก
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ นายแพทย์วรพจน์ นิลรัตนกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สารัช สุนทรโยธิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ นายแพทย์วรพจน์ นิลรัตนกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ แพทย์หญิงปิยวรรณ กิตติสกุลนาม)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ แพทย์หญิงนิรดา ศิริยากร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปัณณพร ทองสุก : การเปรียบเทียบการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีโดยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิงกับวิธีเพาะเชื้อโดยมาตรฐานในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. (The Comparison of Nanopore Sequencing and Antimicrobial Susceptibility Standard Test in Diagnosis of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Urinary tract Infection in King Chulalongkorn Memorial Hospital) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. นพ.วรพจน์ นิลรัตนกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

วัตถุประสงค์ เพื่อหาความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ในการตรวจหายีนดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี โดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อโดยมาตรฐาน ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วิธีการวิจัย ผู้ป่วยที่สงสัยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นำปัสสาวะไปปั่นเพื่อลดเซลล์มนุษย์ จากนั้นนำตะกอนแบคทีเรียไปสกัดดีเอ็นเอแล้วซีเควนต่อด้วยเครื่องมือนาโนพอร์เซอร์ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้ได้ผลเชื้อก่อโรคและยีนดื้อยานำมาเปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน

ผลการศึกษา มีเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม (CRE) 28 ตัวอย่าง เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสออกฤทธิ์ชนิดกว้าง (ESBL) 16 ตัวอย่าง และเชื้อที่ไม่ดื้อยา (non CRE/non ESBL/nonAmpcC) 16 ตัวอย่าง เครื่องมือนาร์โนพอร์ซีเควนเซอร์สามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคและยีนดื้อยาได้ตรงกับวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน เมื่อตัดตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอน้อยกว่า 1 ng/mcl 7 ตัวอย่างออกไปพบว่าเครื่องมือนี้มีความไวและความจำเพาะต่อการตรวจพบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมร้อยละ 86.9 และ 93.3 ตามลำดับ และพบว่ามีความไวและความจำเพาะต่อการตรวจพบยีนดื้อยา 3rd cephalosporin ร้อยละ 92.1 และ 60 ตามลำดับ

สรุป การตรวจหายีนดื้อยาคาร์บาพีเนมของเชื้อในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งมีความไวและความจำเพาะที่สูง เมื่อเทียบกับการตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐานในผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โดยสามารถลดระยะเวลาในการตรวจเจอเชื้อก่อโรคและยีนดื้อยาได้ โดยใช้เวลามัธยฐาน 3.5(2.2-8.2) ชั่วโมง เพื่อที่จะสามารถพิจารณาปรับยาปฏิชีวนะได้อย่างเหมาะสมในโดสที่ 2-3 เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเกินความจำเป็นและลดโอกาสดื้อยาในอนาคตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

6270047830 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: Nanopore sequencing, Carbapenemase genes, betalactamase genes, Enterobacteriaceae, CRE

Pannaporn Thongsuk : The Comparison of Nanopore Sequencing and Antimicrobial Susceptibility Standard Test in Diagnosis of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Urinary tract Infection in King Chulalongkorn Memorial Hospital. Advisor: VORAPHOJ NILARATANAKUL, Ph.D. Co-advisor: TANITTHA CHATSUWAN, Ph.D.

Objective To evaluate the sensitivity and the specificity of Nanopore sequencing against the standard (culture) method in bacterial identification and antibiotic resistance profiling from direct urine specimens.

Methods Bacterial cells were enriched from direct urine specimens by differential centrifugation to decrease the number of human cells. DNA was extracted from bacterial pellets and the purified DNA was then sequenced by Nanopore sequencing (MinION) to identify the organisms and drug resistance genes in comparison to the results of routine urine cultures and standard antibiotic susceptibility tests.

Results 60 specimens of Enterobacteriaceae were identified from routine urine, including the phenotypes of 28 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), 16 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae, and 16 non-CRE/non-ESBL/non-Amp-C. Excluding 7 specimens with low DNA amount (< 1 ng/mcl), sensitivity for carbapenemase genes and ESBL/AmpC genes detection by Nanopore sequencing are 86.9% (66.4-97.2%; 95%CI) and 92.1% (78.6-98.3%; 95%CI), respectively. Specificity for carbapenemase genes and ESBL/AmpC genes detection by Nanopore sequencing are 93.3% (77.9-99.1%; 95%CI) and 60% (32.3-83.4%; 95%CI),respectively.

Conclusion Nanopore sequencing identified pathogens and their resistance genes from urine in timeframe similar to polymerase chain reaction (median time 3.5 (2.2-8.2) hours from samples to results). More samples are needed for protocol and bioinformatic pipeline optimization to detect the resistances better and faster. Metagenomic sequencing based diagnosis will enable clinicians to adjust antimicrobial therapy before the second-third dose of most antibiotics (every 8-12 hours).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study:	Medicine	Student's Signature .....
Academic Year:	2020	Advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความเมตตากรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก อาจารย์นายแพทย์ ด็อกเตอร์ วรพจน์ นิลรัตนกุล สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อาจารย์ด็อกเตอร์ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ด็อกเตอร์ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ และคุณพัทธพล คุณาดิเรก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ

ขอขอบพระคุณ คุณทรงธรรม อนุนตการุณ บัณฑิตวิทยาลัย หลักสูตรชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำด้านการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบพระคุณ คุณสุมาณี นิลเกตุ นักเทคนิคการแพทย์ และพี่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา รวมถึงเจ้าหน้าที่พยาบาลวอร์ดอายุกรรมที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ ตลอดงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ นิสิตปริญญาเอก คุณกรธรา กะหวัง ผู้ช่วยทำงานวิจัยที่ได้สละเวลาในการช่วยทำวิจัยและให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชาย และเพื่อนที่ให้กำลังใจตลอดเวลาที่ทำงานวิจัยนี้

ปัณณพร ทองสุก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญรูปภาพ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 คำถามของการวิจัย 3

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย 3

1.4 สมมติฐาน 4

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น 4

1.6 กรอบความคิดแนวิจัย 4

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย 4

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 5

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข 6

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 7

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10

3.1 รูปแบบการวิจัย 10

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย 10

3.3 ขนาดตัวอย่าง 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย 11
3.5 การรวบรวมข้อมูล 13
3.6 ข้อจำกัดทางการวิจัย 13
3.7 ปัญหาทางจริยธรรม 13
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล 13
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 15
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 15
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 1
5.1 อภิปรายผล 1
5.2 จุดแข็งของการวิจัย 11
5.3 ข้อจำกัดในการวิจัย 11
5.4 สรุปผล 12
บรรณานุกรม 14
ประวัติผู้เขียน 17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการดื้อยากลุ่มคาร์บาร์พีเนมมีแนวโน้มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ..... 2

ภาพที่ 2 สถานการณ์เชื้อดื้อยาประจำปี 2562 แยกตามเขตสุขภาพ (6 เดือน)..... 2

ภาพที่ 3 แสดงจำนวนปัสสาวะของผู้ป่วยในโครงการวิจัย โดยแบ่งตามเชื้อก่อโรค..... 16

ภาพที่ 4 กราฟแสดงว่าที่เจอยีนดื้อยา แกน x เป็นนาทีที่เจอยีนดื้อยา, แกน y เป็นเปอร์เซ็นต์ของยีนดื้อยาสะสมที่พบตามเวลาที่ผ่านไป..... 20

ภาพที่ 5 แสดงเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์..... 12

ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนและระยะเวลาในกระบวนการตรวจหายีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง.. 13

ภาพที่ 7 แสดงหลักการทำงานของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์..... 13

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่นำมาศึกษา..... 17

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างปัสสาวะและดีเอ็นเอ : ปริมาณและเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ปริมาณจุลินทรีย์จากการเพาะเชื้อ ปริมาณดีเอ็นเอ จำนวนและความยาวของดีเอ็นเอ 18

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน 21

ตารางที่ 4 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 37

ตารางที่ 5 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 37

ตารางที่ 6 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 2

ตารางที่ 7 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 3

ตารางที่ 8 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 4

ตารางที่ 9 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 4

ตารางที่ 10 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 5

ตารางที่ 11 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 6

ตารางที่ 12 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 7

ตารางที่ 13 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง..... 7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

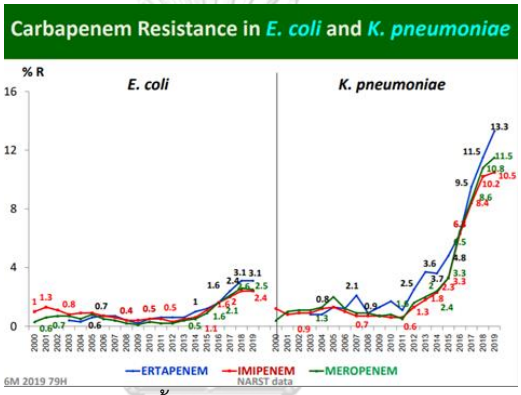
Carbapenems เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Beta-lactam ที่ออกฤทธิ์ค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น จัดเป็นยาที่มีการใช้บ่อยและแพร่หลายในปัจจุบันโดยเฉพาะกับการนำมาใช้เพื่อรักษาแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Klebsiella pneumoniae, E.coli, Enterobacter, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* เป็นต้น[1] สืบเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่เกินความจำเป็นในหลายประเทศ ทำให้พบเชื้อที่สามารถสร้าง Carbapenamase ได้มากขึ้นในหลายภูมิภาคในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นอกจากนี้เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ไม่เพียงที่จะดื้อเฉพาะ Carbapenems เท่านั้น ยังจะทำให้ดื้อยา β-lactams ตัวอื่นๆ อีก เช่น Cephalosporins หรือ Penicillins[2] ตั้งแต่ในช่วงปี ค.ศ. 1983 มีการรายงานเรื่องการดื้อยาของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม Extended-spectrum β lactamases จากเชื้อ *K. pneumoniae* จากการศึกษาของ Knothe และคณะจากเยอรมนี และพบรายงานลักษณะเดียวกันจากยุโรปและอังกฤษในเวลาถัดมา พบว่า ESBL- producing Enterobacteriaceae มีความชุกโดยรวมอยู่ที่ร้อยละ 20-40[3] ปัจจัยเสี่ยงส่วนมากเป็นกลุ่มที่ได้ยา Quinolones หรือ Cephalosporins มาก่อน ทำให้ยากลุ่ม Carbapenems มีความจำเป็นต้องนำมาใช้รักษาในคนไข้กลุ่มนี้มากขึ้น[4]

รายงานการดื้อยากลุ่ม Carbapenems ต่อเชื้อ *Klebsiella* spp. (โดยเป็น *K. pneumoniae* ร้อยละ 68 และ *K. oxytoca* ร้อยละ 31) ที่ทำการสำรวจในยุโรป (Belgium, Croatia, Czech Republic, Finland, Germany, Poland และ UK) กรณีถ้าเป็น meropenem อยู่ที่ ร้อยละ 0.4 ในปี ค.ศ. 2002 เพิ่มมาเป็น ร้อยละ 2.4 ในปี ค.ศ. 2006[5] Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; CRE มีความชุกโดยรวมอยู่ที่ร้อยละ 3-10 แต่อาจจะพบว่าสูงถึงร้อยละ 30 ได้สำหรับการติดเชื้อในโรงพยาบาลขนาดใหญ่[6]

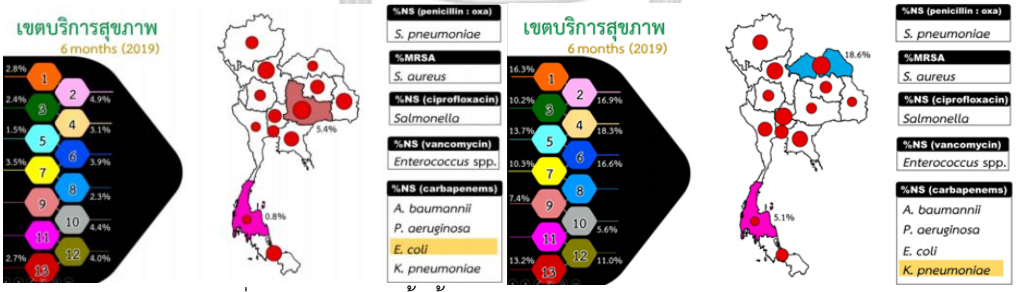
จากการศึกษาที่แสดงถึงอุบัติการณ์ของ Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae; CPE ที่เพิ่มมากขึ้นในบริเวณเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจัยสำคัญอันเนื่องมาจากการสั่งยาปฏิชีวนะที่ไม่สมเหตุสมผลและมากเกินกว่าความจำเป็นโดยเฉพาะผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในโรงพยาบาล จากการศึกษาที่ศึกษาเรื่องความเหมาะสมในการสั่งยาปฏิชีวนะผลปรากฏว่าเกือบร้อยละ 50 ที่มีการสั่งยาปฏิชีวนะที่ไม่สมเหตุสมผล โดยเฉพาะในยากลุ่ม Carbapenem[6]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สถานการณ์เชื้อ Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; CRE ในประเทศไทย รายงานจากศูนย์ระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand (NARST)) [7] มีจากข้อมูล รพ.เครือข่ายครอบคลุมทุกเขตบริการสุขภาพของกระทรวงสาธารณสุข จากข้อมูลปี พ.ศ.2560 และ 2561 พบความชุกของ *Klebsiella pneumoniae* ร้อยละ 19.6 และ 17.8 ตามลำดับ และ *Escherichia coli* ร้อยละ 5.2 และ 7.65 ตามลำดับ ในปี พ.ศ.2562 จากการสำรวจของเขตบริการสุขภาพของประเทศไทย พบ *E.coli* CRE 0.8-5.4% และพบ *Klebsiella pneumoniae* CRE 5.1-18.6% แตกต่างกันไปตามแต่ละเขตของบริการสุขภาพ



ภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการดื้อยากลุ่มคาร์บาร์พีเนมมีแนวโน้มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งจากเชื้อ E.coli และ K.pneumoniae ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา



ภาพที่ 2 สถานการณ์เชื้อดื้อยาประจำปี 2562 แยกตามเขตสุขภาพ (6 เดือน)

ภาพที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การดื้อยาของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ต่อยากลุ่มคาร์บาร์พีเนม ตามเขตบริการสุขภาพ 13 เขตของ รพ.เครือข่ายกระทรวงสาธารณสุขทั่วประเทศไทยในปี 2562 จะเห็นว่า อัตราการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อ *K. pneumoniae* พบสูงสุด 18.6 % ซึ่งเป็นอัตราที่มากกว่าอัตราการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อ *E. coli* ที่พบมากสุดเพียง 5.4%

จากข้อมูลการศึกษาโดย แพทย์หญิงณัชชา แซ่เตียว ซึ่งทำการเก็บข้อมูลในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่าง พ.ศ.2559-2560 โดยศึกษา *K. pneumoniae* ทั้งหมด 301 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียที่สามารถสร้าง carbapenemase ได้ทั้งหมด 83 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 27.6 ปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้พบแบคทีเรียที่สามารถสร้าง carbapenemase ได้แก่ การได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม cephalosporin, betalactamase inhibitor, fluoroquinolone, carbapenem และ glycopeptide ยกเว้นยากลุ่ม macrolide ไม่มีผลต่างกันกับแบคทีเรียที่ไม่สร้าง carbapenemase และผู้ป่วยที่มี Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*; CPK ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคหรือเป็นเชื้อประจำถิ่น มีผลทำให้ผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลนานขึ้นเป็น 31 วันเทียบกับ 19 วัน ในผู้ป่วยที่ไม่มีการติดเชื้อ CPK นอกจากนี้ ในกลุ่มที่มีการติดเชื้อจาก CPK มีอัตราการเสียชีวิต ถึงร้อยละ 50[8]

เนื่องจากในประเทศไทยพบปัญหาแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพอย่างมาก โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีความสำคัญ อยู่ในระดับขั้นวิกฤต (critical priority) คือ Carbapenem-resistant *A. baumannii*, Carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae และ Extended-spectrum β-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae ดังนั้นเพื่อลดการใช้ยาฆ่าเชื้อแบบครอบคลุมชนิดกว้างโดยไม่จำเป็น หรือจำกัดการใช้ให้น้อยที่สุด เพื่อลดอัตราการดื้อยา โดยเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องมือในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคและการดื้อยาได้เร็วขึ้น จึงเป็นที่มาของการศึกษาในงานวิจัยนี้

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก

การวินิจฉัยการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีในการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานมีความจำเพาะและความไวเท่าไร

คำถามรอง

การวินิจฉัยการดื้อยาของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี ที่มีการสร้างเอ็นไซม์เบต้าแลคแตมเมสชนิดกว้าง ในการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน มีความจำเพาะและความไวเท่าไร

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี โดยวิธีนาโนพอร์ซีเควนเซอร์กับวิธีเพาะเชื้อโดยมาตรฐาน ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

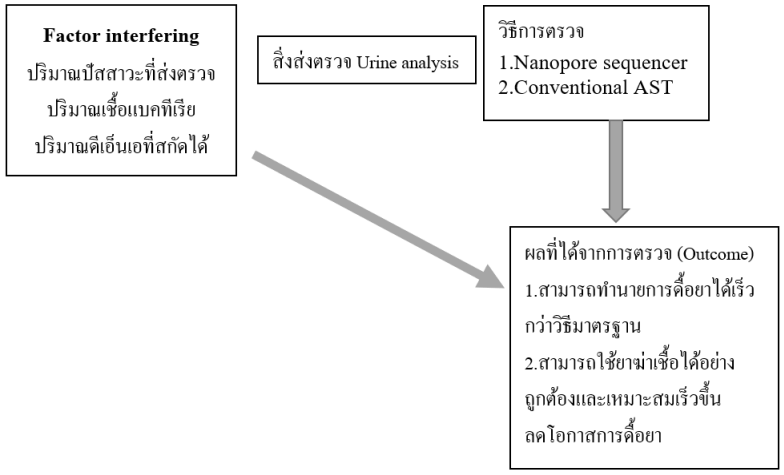
1.4 สมมติฐาน

สามารถทำนายการดื้อยาของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอริซิอี ที่ดื้อต่อยาคาร์บาร์พีเนม ในการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ได้

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

เชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง Carbapenemase ได้มีหลายชนิด แต่ที่จะเลือกมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้จะเลือกเฉพาะ Enterobacteriaceae เท่านั้น

1.6 กรอบความคิดแนววิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย

- Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบหมายรวมถึงเฉพาะกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยา Carbapenems โดยไม่จำกัดกลไก
- ESBL-producing Enterobacteriaceae คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบหมายรวมถึงเฉพาะกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย cephalosporin รุ่นที่สาม และ aztreonam แต่สามารถยับยั้งโดย clavulanic acid
- Nanopore sequencer คือ เครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของสาย DNA สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์เฉพาะ ตรวจหาเชื้อก่อโรคได้

- Urinary tract infection: ปัสสาวะมีปริมาณเม็ดเลือดขาวอย่างน้อย 5 leukocytes/mm^3 มีอาการของระบบทางเดินปัสสาวะติดเชื้อ เช่น อาการของระบบทางเดินปัสสาวะส่วนล่าง เช่น ปัสสาวะแสบขัด ปัสสาวะบ่อย ปัสสาวะแดงขุ่น ปวดถ่วงท้องน้อย อาการทางระบบทางเดินปัสสาวะส่วนบน เช่น ไข้หนาวสั่น ปวดบั้นเอว อาจจะมีอาการทางระบบปัสสาวะส่วนล่างร่วมด้วย[9]
- Asymptomatic bacteriuria: การตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย ≥ 1 ชนิดขึ้นไปในปริมาณ ≥ 10^5 CFU/ml จากการเพาะเชื้อในปัสสาวะ ไม่ว่าจะตรวจพบเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ (pyuria) หรือไม่ก็ได้ โดยที่ผู้ป่วยไม่มีอาการหรืออาการแสดงของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ[10]

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ได้ทราบความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ในการตรวจหายีนดื้อยา และสามารถนำไปใช้ทำนายการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี เพื่อประโยชน์ในทางคลินิกได้ เพื่อที่จะสามารถให้ยาฆ่าเชื้อได้อย่างเหมาะสมตั้งแต่ขนานที่สอง ลดการใช้ยาฆ่าเชื้อเกินความจำเป็น ลดโอกาสดื้อยา และภาวะแทรกซ้อนจากการใช้ยาฆ่าเชื้อที่ไม่เหมาะสม

การวิจัยนี้เป็นการเริ่มต้นการใช้ Nanopore sequencer มาตรวจในปัสสาวะ ซึ่งยังไม่เคยมีใคร ทำการวิจัยมาก่อนในประเทศไทย หากการวิจัยนี้ทำแล้วได้ผลที่น่าพอใจ sensitivity และ specificity ของการทดสอบดี ก็จะเป็นก้าวต่อไปที่จะได้นำการทดสอบนี้ไปใช้ในทางคลินิกในวงกว้าง

1. เพื่อเป็นการใช้เลือกยา เนื่องจากเป็นการทดสอบที่ได้ผลเร็วมากทำให้สามารถตัดสินใจให้การรักษาได้ก่อนที่ผลเพาะเชื้อจะออกอย่างเป็นทางการ ลดการใช้ยาฆ่าเชื้อครอบคลุมชนิดกว้างโดยไม่จำเป็น ลดโอกาสการดื้อยาในอนาคต
2. ในแง่ของการควบคุมการติดเชื้อถ้าหากเราทราบผลก่อน เราจะสามารถแยกโรคได้ทันทีก่อนการรายงานผลจาก Antibiotic Susceptibility Test ซึ่งจะทำให้เราป้องกันการแพร่กระจายของ CRE ในโรงพยาบาลได้ดียิ่งขึ้น

เนื่องจากเราสามารถให้ยาฆ่าเชื้อได้อย่างเหมาะสม ได้ภายในเวลารวดเร็วกว่าเดิมถึงสี่เท่าเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ผลการเพาะเชื้อนานถึง 48-72 ชั่วโมง อาจสามารถลดอัตราการดื้อยาฆ่าเชื้อและภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อได้ ช่วยสนับสนุนโครงการ Antimicrobial Stewardship Program และยังเป็นไปได้ที่จะขยายผลไปยังเชื้ออื่น หรือสิ่งส่งตรวจอื่น เช่น เสมหะ เป็นต้น

นอกจากนี้ ในโรงพยาบาลชุมชนบางแห่งหรือตามคลินิก ที่ไม่มีห้องปฏิบัติการสำหรับเพาะเชื้อเอง กว่าจะได้ผลเพาะเชื้อหาการดื้อยาอาจกินเวลานานถึงสิบวันเนื่องจากต้องส่งตรวจไปยัง

โรงพยาบาลอื่น เครื่องมือนี้ที่มีขนาดเล็กจึงอาจมีประโยชน์ในลักษณะเป็น bedside หรือ point-of-care test โดยเฉพาะในอนาคตเมื่อราคาในการตรวจ sequencing ถูกลงเรื่อย ๆ

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข

เนื่องจากราคาของชุดทดสอบทำให้ต้องใช้จำนวนชุดให้น้อยที่สุด จึงทำให้ต้องมีการเก็บสิ่งส่งตรวจรอไว้ จนรายงานผลออกมาว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae จึงค่อยนำชุดทดสอบไปตรวจกับปัสสาวะที่มีการเก็บไว้อีกที ในกรณีนี้อาจแก้ปัญหาได้ 2 แบบ

1. ขอสนับสนุนชุดทดสอบจากบริษัท
2. ขอทุนทำวิจัยเพิ่มเติมเพื่อสามารถหาชุดทดสอบได้มากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2018 Daniel Golparin และคณะ[11] ได้ศึกษาทำนายการดื้อยาของเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องมือ Nanopore Sequencer เป็นครั้งแรก การดื้อยาของเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* พบได้บ่อยในปัจจุบัน ดังนั้น การตรวจพบสายพันธุ์การดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว ทำให้รักษาได้อย่างถูกต้องเหมาะสม นอกจากนี้ยังตรวจการระบาดของโลกได้อย่างทันการณ์ การศึกษานี้ได้นำเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ ซึ่งเป็นนวัตกรรมใหม่ ที่สามารถอ่านรหัสพันธุกรรมยาวๆ ได้ ในเวลาที่รวดเร็วภายในหนึ่งวัน และการศึกษานี้ได้ทดลองในเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* โดยนำ 14 isolates มาเทียบกับวิธี Illumina และ PacBio sequencing พบว่า นาโนพอร์ มีความแม่นยำน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามการใช้ฐานข้อมูลและกระบวนการวิธีอย่างเหมาะสม สามารถทำให้การใช้เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ทำนายการดื้อยาได้อย่างถูกต้องมากขึ้น

Themoula Charalampous และคณะ[12] ได้ศึกษากระบวนการวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินหายใจส่วนล่างจากสิ่งส่งตรวจคือเสมหะ ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับวิธีตรวจทางจุลชีวะ metagenomics pipeline ประกอบด้วย

- Novel human DNA depletion
- Pathogen DNA extraction
- Library preparation
- MinION sequencing, Epi2ME analysis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากตัวอย่างการศึกษาทั้งหมดได้ 42 ตัวอย่าง พบว่า ผลการตรวจเชื้อโดยวิธีนี้ตรงกันกับผลการเพาะเชื้อร้อยละ 89 และเพิ่มเป็นร้อยละ 100 (ใช้ 13 ตัวอย่าง) หลังจากมีการพัฒนาปรับปรุงระบบในรอบที่สอง โดยใช้เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากได้สิ่งส่งตรวจไปจนถึงได้ผลยืนดื้อยา

ในปี 2016 K.Schmidt และคณะ[13] จากประเทศอังกฤษ ได้ศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียและยืนดื้อยาโดยตรงจากปัสสาวะ ไม่ได้ผ่านการเพาะเชื้อ โดยวิธี Nanopore sequencing จากการศึกษานี้ เลือกใช้ปัสสาวะ เนื่องจากพบการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะได้บ่อย มีอาการรุนแรงได้ ถ้าเกิดการติดเชื้อในกรวยไต มีภาวะแทรกซ้อน หรือเข้าสู่กระแสเลือด เกิดอัตราการนอนโรงพยาบาลสูงขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ ในประเทศอังกฤษ พบการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้ออีโคไล กว่าร้อยละ 60 มีต้นกำเนิดมาจากการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ เชื้อดื้อยาพบได้บ่อย

กรณีเคยได้รับยากลุ่ม fluoroquinolone, cephalosporin, betalactamase inhibitor combination

จากตัวอย่างปัสสาวะในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ 10 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างที่ใส่เชื้อดื้อยาอีโคไลเข้าไปในปัสสาวะคนสุขภาพดีอีก 5 ตัวอย่าง วิธีการเตรียม ใช้ปริมาณปัสสาวะ 4-10 ml ไปปั่น 300 g 2 นาทีเพื่อแยกโฮสต์เซลล์ออก และใช้ supernatant ปั่นอีกครั้งที่ 12,300 g อีก 5 นาที จะได้แบคทีเรียที่ตกตะกอนปริมาณ 1 ml จากนั้นแยก เซลล์ของโฮสต์ที่เหลือออกและแยกดีเอ็นเอของโฮสต์โดยใช้ kit จากนั้น purified DNA ก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลการเรียงตัวของเบสโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลและ bioinformatic pipeline เพื่อแปลรหัสสารพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์นำมาเทียบ กับวิธี Illumina และวิธีมาตรฐาน พบว่าการใช้ nanopore sequencer สามารถตรวจพบ 51 ยีนดื้อยา เทียบกับวิธี Illumina ซึ่งตรวจพบ 55 ยีนดื้อยา แต่มีบางส่วนที่ไม่สามารถวิเคราะห์หายีนดื้อยาได้เนื่องจาก มีสารพันธุกรรมที่น้อยเกินไป และบางส่วนมีการกลายพันธุ์ โดย ใช้เวลาพอกันกับการใช้ Illumina คือประมาณ 4 ชั่วโมง (ไม่รวมขั้นตอนการสกัด DNA) จากงานวิจัยนี้ ให้ ผลบวกจริง สำหรับการวิเคราะห์หายีนดื้อยามีความตรงกัน ร้อยละ 90 ถ้าใช้วิธี ilumina และร้อยละ 80 ถ้าใช้วิธีนาโนพอร์ เนื่องจากมีการวินิจฉัยผิดพลาดของพลาสมิดแอมซี

สรุปว่า การใช้วิธี metagenomic-sequencing based สามารถทราบผลการดื้อยาและสามารถปรับยาฆ่าเชื้อ ได้อย่างเหมาะสมก่อนการให้ยาครั้งที่ 2 กรณีให้ยาทุก 8 ชั่วโมง ทำให้สามารถวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้เร็วขึ้น มีประโยชน์ต่อการรักษาและปรับยาฆ่าเชื้อตามแนวทาง Antimicrobial Stewardship Program

ในปี 2018 Prannita D. Tamma และคณะจากมหาวิทยาลัยจอนห์ฮอปกินส์[14] ได้ศึกษาการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อเคลบเซลลา นิวโนเนียอี เพื่อทำนายการดื้อยาของเชื้อโดยเทียบการเพาะเชื้อหาการดื้อยาโดยวิธีมาตรฐาน โดยใช้วิธี Real-time Nanopore analysis approach, assembly-based Nanopore approach และ Approach Using short-read correction of nanopore assemblies เทียบกับวิธีการเพาะเชื้อมาตรฐาน โดยใช้ 40 *K. pneumoniae* isolates (21 carbapenemase-producing carbapenem *Klebsiella pneumoniae*, 10 non carbapenemase-producing carbapenem *Klebsiella pneumoniae* และ 9 carbapenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae*) พบว่า ผล genotypic และ Antimicrobial susceptibility testing (AST) ตรงกัน 77% (30-100%) เมื่อใช้วิธี Real time Nanopore approach และ 92% (80-100%) เมื่อใช้วิธี assembly approach และ วิธี Short - read correction of Nanopore assemblies โดยวิธี Real-time Nanopore approach สามารถรายงานยีนดื้อยาจากการเพาะเชื้อได้ภายใน 8 ชั่วโมง ส่วนวิธี assembly-based Nanopore

approach สามารถทราบผลยีนดื้อยาทั้งหมดและ single-nucleotide polymorphism ภายใน 14 ชั่วโมง

ทั้งวิธี Real time Nanopore approach และ Nanopore assembly approach นี้สามารถลดระยะเวลาการเข้าถึงยาฆ่าเชื้อที่ได้ประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งใช้เวลาถึง 48-72 ชั่วโมง ทำให้ได้ยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมช้า วิธีมาตรฐานที่ใช้กันโดยทั่วไปเพื่อหาการดื้อยา เช่น เครื่อง automated AST panel มักถูกจำกัดด้วยจำนวนของยาฆ่าเชื้อที่ทดสอบได้ และไม่สามารถทราบโดยตรงว่า ดื้อยา carbapenems จากกลไกอื่นหรือจากการสร้าง carbapenemases และไม่อาจทราบว่าเป็น carbapenemases ชนิดไหน เช่น KPC, NDM, ฯลฯ การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือ Whole-Genome Sequencing ช่วยในการแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการทำนายผลการดื้อยาโดยใช้การตรวจพบหรือไม่พบยีนดื้อยา รวมทั้งการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้อง ทำให้ทราบชนิดของ carbapenemases ช่วยในการตัดสินใจในการเลือกใช้ยาฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะที่ผสม beta-lactamase inhibitors รุ่นใหม่ ๆ ซึ่งมีความจำเพาะต่อ carbapenemase แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน

จากการศึกษาในประเทศจีน ในปี 2019 โดย Haofu Niu และคณะ[15] ได้ศึกษาการใช้เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ในการตรวจหา Carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* ซึ่งการตรวจหาเชื้อได้เร็วสามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม และช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของคนไข้ด้วย วิธีดั้งเดิมในการตรวจหาเชื้อดื้อยานี้ใช้เวลาค่อนข้างนานมาก ส่วนวิธีการ PCR หรือวิธีการ sequencing อื่นๆ ราคาแพงและใช้เทคโนโลยีสูง ไม่สามารถเอามาใช้ได้จริง จึงได้มีการใช้วิธีนาโนพอร์เป็นการตรวจคัดกรองเพราะมีความไวสูงและเป็นการตรวจ real time และราคาไม่แพง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

Diagnostic test (Cross-sectional descriptive study) เพื่อหาความจำเพาะของเครื่องมือ

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากร (POPULATION) และตัวอย่าง (SAMPLE)

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. ผู้ป่วยที่สงสัยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ
3. ผู้เข้าร่วมสามารถปฏิบัติตามระเบียบวิจัยได้
4. ผู้เข้าร่วมการศึกษาหรือผู้แทนโดยชอบธรรม (กรณีผู้ป่วยไม่สามารถลงชื่อยินยอมได้) ต้องลงชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. เก็บปัสสาวะไม่ได้ หรือปัสสาวะมีปริมาณน้อยกว่า 1 ml
2. สกัดดีเอ็นเอได้น้อยกว่า 1 qubit ng/mcl
3. ผลเพาะเชื้อไม่ใช่เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี

Target population ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะที่ดื้อยาคาร์บาร์พีเนม

Sample population ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีการดื้อยาคาร์บาร์พีเนมที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.3 ขนาดตัวอย่าง

ใช้วิธีคำนวณขนาดตัวอย่างโดยสูตร หาค่าเป็นสัดส่วนในประชากรหนึ่งกลุ่ม และนำค่า prevalence ของโรคเข้ามาคำนวณขนาดของประชากร จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าในการศึกษาโดย Niu Hao Fu และคณะ[15] ให้ทั้งค่า sensitivity และ specificity ของการทดสอบอยู่ที่ 90 % กำหนดให้ค่าความผิดพลาดที่ยอมรับได้อยู่ที่ 10 % นำมาคิดเป็นค่ามาตรฐาน Z score ได้ 1.96 สรุปจะคำนวณจำนวนประชากรตัวอย่างได้ดังนี้

$N = Z^{2}_{\alpha/2} P (1-P) / d^{2}$

P = ค่าความไวและความจำเพาะที่คาดหวัง (expected specificity) = 0.92

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (allowable error) = 0.10

$Z\ \alpha/2$ (two sided) = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับ type I error (α) เท่ากับ 0.05 = 1.96

ดังนั้น $n = (1.96)^2\ 0.92\ (1-0.92) / (0.1)^2 = 28.3$

จะได้จำนวนประชากร กลุ่ม CRE 30 คน และ Non-CRE 30 คน รวมเป็น 60 คน ซึ่งในกลุ่ม Non-CRE แยกเป็นกลุ่ม ดื้อกับไม่ดื้อยา 3rd-gen cephalosporins อย่างละ 50%

3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

1. ชี้แจงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัย ประโยชน์ที่ผู้ป่วยจะได้รับประโยชน์ที่ได้จากการทำการศึกษา

   บันทึกข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย เพศ, อายุ, หอผู้ป่วยที่ผู้ป่วยกำลังรับการรักษา, โรคประจำตัวอื่นๆ, วินิจฉัยโรคของผู้ป่วย ถ้ามีการส่งตรวจปัสสาวะเพื่อทำการเพาะเชื้อจะให้เก็บปัสสาวะแบ่งออกเป็นสองชุดก่อนเริ่มยาปฏิชีวนะถ้าสามารถทำได้ โดยเก็บปัสสาวะแต่ละชุดปริมาณ 10 ml โดยชุดแรกทำการส่งเพาะเชื้อตามปกติ ชุดที่สองคือปัสสาวะทั้งหมดที่เหลือจากการส่งเพาะเชื้อจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนเข้าสู่ขั้นตอนที่ 3
2. ปัสสาวะชุดที่สอง
   - ลดการปนเปื้อนของ Host DNA โดยนำปัสสาวะมาปั่นแยกโฮสต์เซลล์ให้ตกตะกอนที่ 300 g 3 นาที
   - ปั่น supernatant ที่ 3000 g 10 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนแบคทีเรีย(bacteria pellet)
   - Freeze bacteria pellet ที่ $-80^{O}C$ ในตู้เย็นที่มีการควบคุมและตรวจเช็คอุณหภูมิอย่างต่อเนื่อง
3. จากนั้นรอจนผลการเพาะเชื้อปัสสาวะจากวิธีมาตรฐานว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae หรือไม่ โดยกรณีที่ผลไม่ขึ้นเชื้อ หรือขึ้นเป็นเชื้ออื่น bacteria pellet ของผู้ป่วยรายนั้นจะยังไม่ถูกนำไปใช้ แต่อาจนำมาใช้ขยายผลในภายหลังเพื่อความสมบูรณ์ของงานวิจัย
4. นำ bacteria pellet ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิติดลบ 80 องศาเซลเซียส เฉพาะที่ขึ้นเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยเลือกสัดส่วนเชื้อ ดื้อยา : ไม่ดื้อยา carbapenems เป็น 1:1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในลักษณะ consecutive cases จนครบจำนวน n ที่ต้องการ มาสกัดแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วย QIAamp PowerFecal Pro DNA kit (บริษัท QIAGEN)

5. นำดีเอ็นที่ได้ไปทำการ Purification ด้วย AMPure XP magnetic bead (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ แล้วเก็บดีเอ็นเอที่แยกได้ในอุณหภูมิติดลบ 80 องศาเซลเซียส วัดจำนวนดีเอ็นเอด้วย Qubit Fluorometer (Life Technologies, Paisley, UK)
6. ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Nanopore Sequencing (Flow cell Mk1 R9 version, Rapid barcoding kit)

หมายเหตุ

วิธีการเก็บปัสสาวะ

1. กรณีที่ปัสสาวะได้เอง

ให้ผู้ป่วยความสะอาดอวัยวะเพศด้วยน้ำและสบู่ให้สะอาดเก็บปัสสาวะช่วงกลาง (midstream urine) โดยปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อน

2. กรณีที่มีสายสวนปัสสาวะอยู่แล้ว

ใช้ตัวหนีบ(Arterial clam) หนีบสายสวนไว้ก่อนเก็บปัสสาวะ เพื่อให้มีปัสสาวะไหลมาค้างอยู่บริเวณสาย ในปริมาณที่มากพอ ใช้ Syringe ต่อเข็มแล้วแทงบริเวณที่ทำความสะอาดไว้ดูดปัสสาวะใส่ภาชนะปราศจากเชื้อปิดฝาให้มิดชิดทันที เช็ดทำความสะอาดสายยางบริเวณที่ดูดปัสสาวะ แล้วคลายตัวหนีบให้ปัสสาวะไหลตามปกติ

3. กรณีที่ไม่สามารถปัสสาวะได้เอง

ให้เก็บโดยวิธีสวนปัสสาวะ(catheterization) โดยทำความสะอาดบริเวณปากหลอดปัสสาวะ (urethral area) ด้วยสบู่และน้ำ แล้วใส่สายสวนปัสสาวะ (catheter) เข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (bladder) ปล่อยให้ปัสสาวะไหลออกเอง แล้วจึงเก็บใส่ขวดฝาเกลียวปราศจากเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การส่งตรวจ

นำส่งตรวจทันที หรือภายใน 2 ชั่วโมง การเก็บรักษา หากไม่สามารถนำส่งได้ทันที ควรเก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8 องศาแล้วรีบนำส่ง ภายใน 24 ชั่วโมง ปัสสาวะที่เก็บมานานกว่า 2 ชั่วโมงหรือไม่ทราบเวลาแน่นอน จะไม่เพาะเชื้อต้องเก็บใหม่

3.5 การรวบรวมข้อมูล

- เก็บข้อมูลจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บข้อมูล prevalence ของ CRE ด้วย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาความจำเพาะของผลการตรวจการดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ และวิธีมาตรฐาน

3.6 ข้อจำกัดทางการวิจัย

เนื่องจากงบประมาณมีจำกัด เพื่อให้สามารถหาค่าสถิติที่ต้องการด้วยจำนวน N ที่น้อยที่สุด จึงเลือกเฉพาะตัวอย่างปัสสาวะที่มีเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งพบบ่อยที่สุด จึงต้องทำการขยายผลสำหรับเชื้ออื่น ๆ หรือสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ต่อไป

3.7 ปัญหาทางจริยธรรม

1. หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person)
   ผู้วิจัยจะให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนโดยการอธิบายและให้เอกสารที่มีข้อมูลการศึกษา จนผู้เข้าร่วมการศึกษาใจและสามารถตัดสินใจอย่างอิสระ ในการเข้าร่วมการวิจัยผู้วิจัยต้องได้รับความยินยอมอย่างเป็นลายลักษณ์อักษร (Informed consent) ก่อนเข้าร่วมการศึกษาเสมอ
2. หลักการให้ประโยชน์ และไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/ Non-maleficence)
   เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการแบ่งปัสสาวะเพื่อการส่งตรวจตามเวชปฏิบัติ ในกรณีที่ต้องเก็บปัสสาวะโดยการใส่สายสวน เราจะทำตามขั้นตอนมาตรฐานและปราศจากเชื้อ
3. หลักความยุติธรรม (Justice)
   ทุกคนจะถูกเชิญเข้าร่วมโครงการ ตามหลักเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกของการศึกษานี้

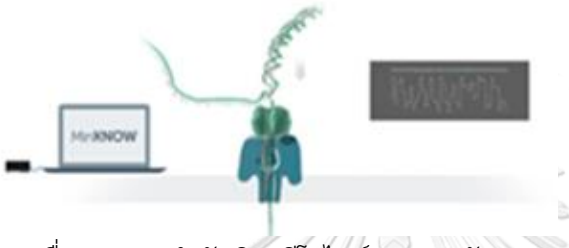
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบด้วยเครื่องมือ Nanopore sequencer จะเป็น Categorical data จะแสดงผลด้วยค่าจำนวนนับ (เปอร์เซ็นต์) และจะแสดงผลเป็นตาราง 2X2 ระหว่างการมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หรือไม่มียีนดื้อยา carbapenemase และ betalactamase จาก nanopore sequencing เทียบกับการดื้อยาหรือไม่ดื้อยา carbapenems และ betalactamase จาก conventional antibiotic susceptibility test (gold standard) เพื่อคำนวณหา 95% CI ของค่า sensitivity, specificity, NPV, PPV, accuracy[16] ส่วนข้อมูลอื่นๆเช่น ข้อมูลพื้นฐานของประชากรที่เป็นข้อมูล continuous data จะแสดงผลด้วยค่า mean (SD) สำหรับข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบปกติ

โดยใช้ Pipeline ดังภาพนี้



เมื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมด้วยเครื่องมือ Nanopore Sequencer จะได้ข้อมูลเป็นศักย์ไฟฟ้าอยู่ในรูปไฟล์ Raw data (FAST5 file)

จากนั้นจะผ่านขั้นตอน Basecalled ด้วยโปรแกรม Guppy เพื่อแปลงข้อมูลศักย์ไฟฟ้าดังกล่าวเป็นลำดับสารพันธุกรรมนิวคลีโอไทด์ ได้เป็นไฟล์ FASTQ “CGTTGATTGCTTGGCC”

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Reads QC, Adapter_trimming, Reads_filter: Porechop program และ Blast : Alignment to ResFinder 4.0 (Database for predictions of phenotypes form genotypes): Minimap2 program

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประชากรที่นำมาศึกษา

ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่นำมาศึกษาจากเกณฑ์การคัดเข้าในการศึกษา ได้แก่ ผู้ป่วยอายุ 18 ปีขึ้นไปที่สงสัยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โดยพบเม็ดเลือดขาวและแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งในปัสสาวะ โดยตั้งต้นเก็บปัสสาวะที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ภูมิสิริชั้น 3 และหอผู้ป่วยในอายุรกรรมเป็นส่วนใหญ่ เก็บข้อมูลในช่วงระหว่างเดือนสิงหาคม 2563 ถึง มีนาคม 2564 ทั้งหมด 8 เดือน จำนวนปัสสาวะที่รวบรวมได้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 358 ตัวอย่าง คัดออก 103 ตัวอย่างเนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่เอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี เพาะเชื้อไม่ขึ้น 52 ตัวอย่าง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 15 ตัวอย่าง ผลเพาะเชื้อเป็นยีสต์ 3 ตัวอย่าง และปนเปื้อน 12 ตัวอย่าง ผลเพาะเชื้อเป็นเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี 255 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม 28 ตัวอย่าง เป็นเชื้อดื้อยาชนิดสร้างเบต้าแลคแตมเมสออกฤทธิ์ชนิดกว้าง 108 ตัวอย่าง และไม่ใช่ทั้งสองกลุ่ม 119 ตัวอย่าง ต้องการเลือกเชื้อที่ดื้อยาคาร์บาพีเนมในอัตราส่วนไม่ใช่เชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมเป็น1:1 ดังนั้นจึงเลือกตัวอย่างที่เป็นเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมมาทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ที่เหลือคือกลุ่มเชื้อดื้อยาชนิดสร้างเบต้าแลคแตมเมสออกฤทธิ์ชนิดกว้างและไม่ดื้อยา โดยเลือกอย่างละครึ่งโดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะมากกว่า 5 cells/HPF และมีแบคทีเรียโคโลนีมากกว่า 10^5 cfu/ml ขึ้นไป สรุปว่าได้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะด้วยเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียเซียอีที่เข้าเกณฑ์การศึกษาจำนวนทั้งหมด 60 ราย ดังแสดงในรูปภาพที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

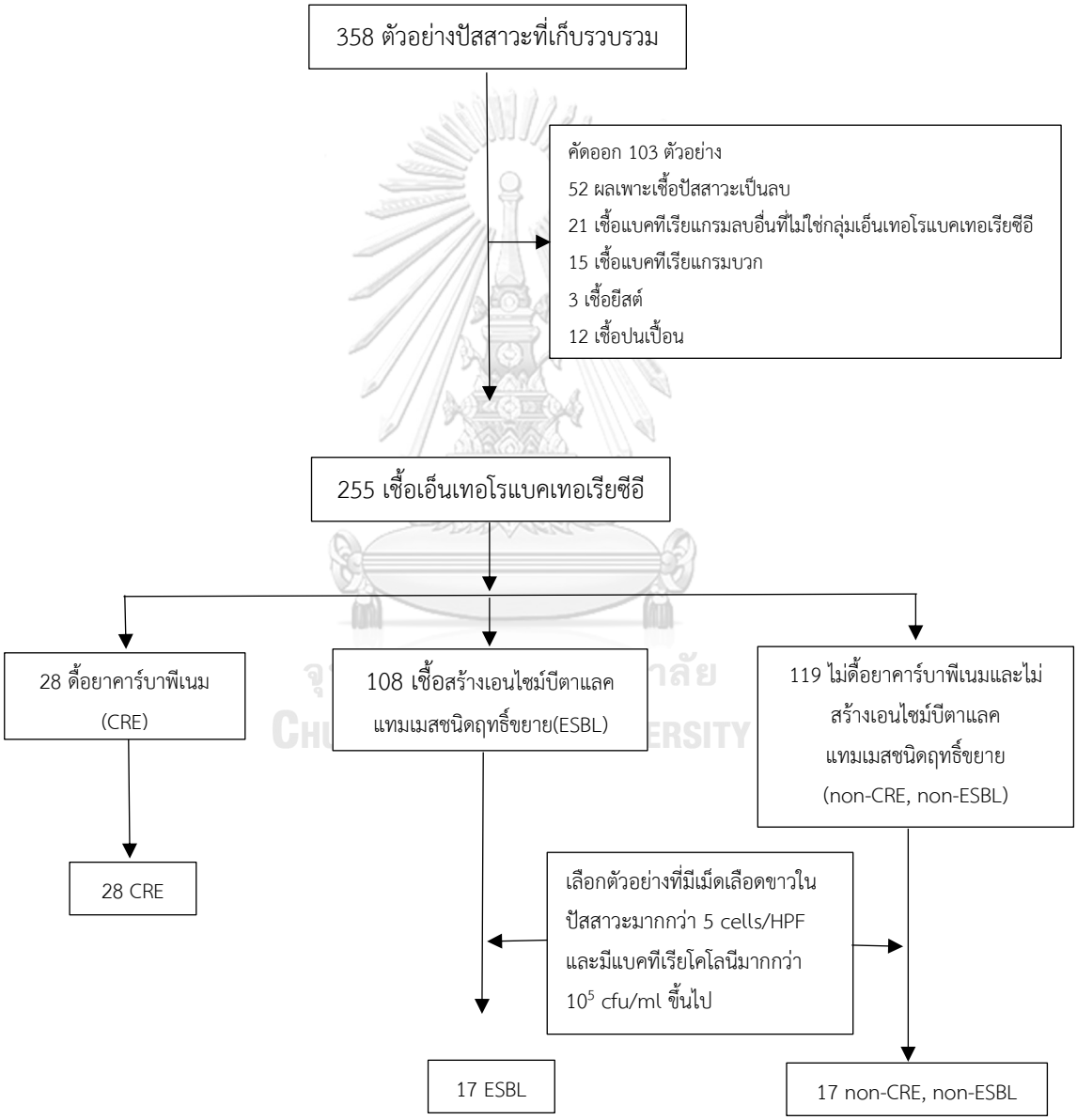
มีผู้ป่วยทั้งหมด 60 คน เป็นเพศชาย 24 คน คิดเป็นร้อยละ 40 และเป็นเพศหญิง 36 คน คิดเป็นร้อยละ 60 ค่ามัธยฐานอายุ 77 ปี โดยอายุระหว่าง 3 เดือน ถึง 96 ปี

มีโรคประจำตัวคิดเป็นร้อยละ 97 ส่วนใหญ่พบว่าเป็นโรคเบาหวาน 25 คน คิดเป็นร้อยละ 42 โรคความดันโลหิตสูง 9 คน คิดเป็นร้อยละ 15 โรคหลอดเลือดในสมอง 6 คน คิดเป็นร้อยละ 10โรคมะเร็ง 6 คน คิดเป็นร้อยละ 10 โรคไตเรื้อรัง 6 คน คิดเป็นร้อยละ 10 ภาวะกระเพาะปัสสาวะพิการทางระบบประสาท 2 คนคิดเป็นร้อยละ 3 และโรคอื่นๆ 4 คน คิดเป็นร้อยละ 7

การวินิจฉัยสุดท้ายเป็นโรคทางเดินปัสสาวะติดเชื้อ 39 คน คิดเป็นร้อยละ 65 เป็นภาวะมีแบคทีเรียในปัสสาวะแบบไม่มีอาการ 21 คน คิดเป็นร้อยละ 35

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด 255 ตัวอย่าง

พบว่ามีกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่ดื้อยาคาร์บาพีเนม (CRE) 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 11 กลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่สร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (ESBL) 108 ราย คิดเป็นร้อยละ 42 กลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่ไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนมและไม่สร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (ESBL) 119 ราย คิดเป็นร้อยละ 47 ข้อมูลทั่วไปของประชาการที่นำมาศึกษาดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 3 แสดงจำนวนปัสสาวะของผู้ป่วยในโครงการวิจัย โดยแบ่งตามเชื้อก่อโรค

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่นำมาศึกษา

ข้อมูลทั่วไป	CRE N=28 จำนวน (ร้อยละ)	ESBL/AmpC N=16 จำนวน (ร้อยละ)	NonCRE,ESBL,AmpC N=16 จำนวน(ร้อยละ)	ทั้งหมด N=60 จำนวน (ร้อยละ)
1. เพศ				
ชาย	11(39)	6(37.5)	7(44)	24(40)
หญิง	17(61)	10(62.5)	9(56)	36(60)
2. อายุ				
Median	77.5	75	72.5	77
3. โรคประจำตัว				
เบาหวาน	12(43)	5(31)	8(50)	25(42)
ความดันโลหิตสูง	4(14)	3(19)	2(12.5)	9(15)
เส้นเลือดในสมอง	3(11)	2(13)	1(6.2)	6(10)
มะเร็ง	3(11)	1(6)	2(12.5)	6(10)
ไตวายเรื้อรัง	1(3.5)	4(25)	1(6.2)	6(10)
กระเพาะปัสสาวะพิการ- ทางระบบประสาท	2(7)	-	-	2(3)
อื่นๆ	1(3.5)	1(6)	2(12.5)	4(7)
ไม่มีโรคประจำตัว	2(7)	-	-	2(3)
4. ผู้ป่วยในโรงพยาบาล				
หอผู้ป่วยอายุรกรรม	10(36)	5(31)	7(44)	22(37)
หอผู้ป่วยศัลยกรรม	5(17)	-	2(12)	7(12)
หอผู้ป่วยเด็ก	2(7)	-	-	2(3)
ผู้ป่วยนอกโรงพยาบาล	11(40)	11(69)	7(44)	29(48)
5. การวินิจฉัย				
4.1 ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ	15(54)	14(87.5)	10(62.5)	39(65)
4.2 ภาวะมีแบคทีเรียในปัสสาวะแบบไม่มีอาการ	13(46)	2(12.5)	6(37.5)	21(35)
6. เชื้อก่อโรค				
E. coli	6(21)	12(75)	11(69)	29(48)
Klebsiella-pneumoniae	16(57)	3(19)	4(25)	23(38)
Enterobacter spp.	3(11)	1(6)	-	4(7)
Klebsiella aerogenes	2(7)	-	-	2(3)
Proteus spp.	-	-	1(6)	1(2)
Mixed *E. coli/KP*	1(4)			1(2)

ตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ราย มีปริมาณปัสสาวะตั้งแต่ 2-10 มิลลิลิตร มีการเก็บข้อมูลปริมาณปัสสาวะร้อยละ 47 พบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะมากกว่า 5 cells/HPF ขึ้นไปคิดเป็นร้อยละ 90 มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10^5 ร้อยละ 87 และมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.13-692 qubit ng/mcl (วัดโดยเครื่องวัดความเข้มข้นสารพันธุกรรมคิวบิท 8.0 fluorometer) Total number of reads คือ 224-407580 ค่ามัธยฐาน 76088 (IQR; 6902, 187676) และค่าเฉลี่ยความยาวของดีเอ็นเอ คือ 190 – 4416 ค่ามัธยฐาน 1591 (IQR; 828, 2434) โดยแสดงรายละเอียดตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างปัสสาวะและดีเอ็นเอ : ปริมาณและเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ปริมาณจุลินทรีย์จากการเพาะเชื้อ ปริมาณดีเอ็นเอ จำนวนและความยาวของดีเอ็นเอ

Sample	Urine (ml)	WBC (cells/HPF)	Colonies culture (cfu/ml)	DNA (qubit ng/mcl)	Time to detect carbapenemase/ ESBL genes (min)	Total number of reads	Mean read length (bp)
1	10	50-100	$>10^5$	171	14.97	89300	2801.9
2	N/A	10-20	$>10^5$	190	61.96	64895	2154.6
3	2.5	10-20	$>10^5$	79.6	-	78243	2671.9
4	N/A	5-10	$>10^5$	67.6	-	21642	2602.8
5	10	50-100	$>10^5$	179	535.81	245658	2372.6
6	10	30-50	$>10^5$	105	150.81	129680	1864.1
7	6	10-20	$>10^5$	4.18	-	17171	562.6
8	N/A	50-100	$>10^5$	187	45.29	314766	3497.8
9	N/A	Numerous	$>10^5$	156	40.52	73933	2271.1
10	10	50-100	$>10^5$	131	53.65	69758	942.1
11	10	10-20	$>10^5$	81	402.93	234022	2454.4
12	10	10-20	$>10^5$	77.6	2265.67	69672	1696
13	1.5	10-20	$>10^5$	0.174	-	563	190
14	N/A	1-2	$>10^4$	0.316	-	1318	320
15	10	0-1	$>10^5$	3.06	3	32,685	3181
16	10	N/A	$>10^4$	118	122	43,008	4416
17	N/A	30-50	10^4-10^5	1.71	13	240417	2798
18	N/A	10-20	$>10^5$	2.08	2	120491	1391
19	N/A	Numerous	$>10^5$	42.2	2477	80183	256
20	10	5-10	$>10^5$	2.06	185	407580	4121
21	10	50-100	$>10^5$	2.16	51	94065	1242
22	7	30-50	$>10^5$	12.2	-	144724	1156
23	10	5-10	$>10^5$	2.26	-	133019	303
24	N/A	Numerous	$>10^5$	2.52	-	224850	2194

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างปัสสาวะและดีเอ็นเอ : ปริมาณและเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ปริมาณจุลินทรีย์จากการเพาะเชื้อ ปริมาณดีเอ็นเอ จำนวนและความยาวของดีเอ็นเอ (ต่อ)

Sample	Urine (ml)	WBC (cells/HPF)	Colonies culture (cfu/ml)	DNA (qubit ng/mcl)	Time to detect carbapenemase/ ESBL genes (min)	Total number of reads	Mean read length (bp)
25	N/A	50-100	$>10^5$	48.6	44	158476	1542
26	5.5	50-100	$>10^5$	7.42	76	403962	1253
27	N/A	50-100	$>10^5$	10	4	60341	3405
28	3	50-100	$>10^5$	0.324	234	1788	695
29	N/A	10-20	$>10^5$	54.4	-	201053	861
30	3.5	Numerous	$>10^5$	65.4	153	92097	531
31	N/A	50-100	$>10^5$	23.6	116	64433	983
32	N/A	10-20	$>10^5$	5.74	16	52521	235
33	N/A	30-50	$>10^5$	46	-	276356	912
34	10	20-30	$>10^5$	27.6	-	244076	1290
35	6	30-50	$>10^5$	18.8	-	239685	692
36	N/A	10-20	$>10^5$	9.74	-	130116	906
37	N/A	1-2	$>10^5$	5.44	685	6710	817
38	3	0-1	10^4-10^5	0.13	526	5123	322
39	N/A	20-30	$>10^5$	108	262	170793	1678
40	N/A	N/A	$>10^5$	494	154	68002	3194
41	N/A	Numerous	10^4-10^5	0.17	-	3206	409
42	7.5	Numerous	10^4-10^5	137	-	193304	3334
43	10	20-30	10^4-10^5	0.17	-	5162	386
44	N/A	30-50	$>10^5$	206	9	136643	1120
45	N/A	5-10	$>10^5$	145	360	118645	1604
46	N/A	N/A	10^4-10^5	9.74	840	132493	790
47	N/A	30-50	$>10^5$	228	21	321433	2089
48	N/A	N/A	$>10^5$	97.8	87	278431	3274
49	N/A	5-10	$>10^5$	28.8	0.03	262069	2224
50	8	Numerous	$>10^5$	96.2	53	7478	1534
51	5.5	20-30	$>10^5$	2.46	1020	2785	1821
52	9.5	N/A	$>10^5$	117	540	2095	2230
53	N/A	30-50	$>10^5$	159	3140	3908	1822
54	N/A	20-30	$>10^5$	161	319	5342	1799
55	N/A	30-50	$>10^5$	34.2	281	5723	2473
56	2	N/A	$>10^5$	0.392	-	224	528
57	N/A	50-100	$>10^5$	2.06	-	786	1579
58	10	N/A	$>10^5$	94.4	-	6298	1758
59	N/A	30-50	$>10^5$	111	-	11464	1199
60	N/A	Numerous	$>10^5$	692	-	8131	3567

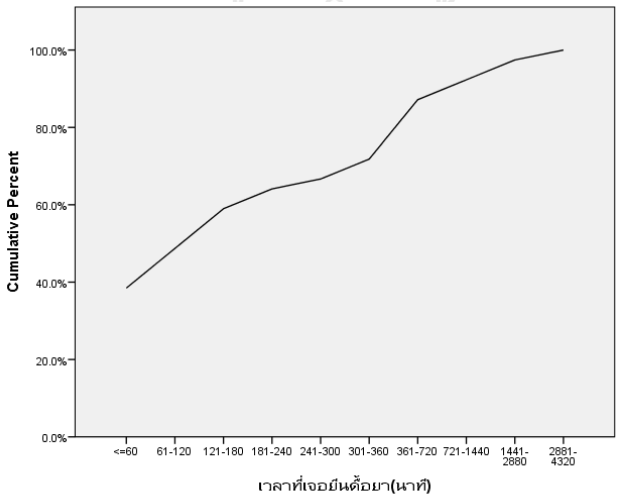
(หมายเหตุ แสดงสีเข้มในตาราง หมายถึง จำนวนดีเอ็นเอที่น้อยกว่า 10 qubit ng/mcl)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากตารางที่ 2 พบว่าจำนวนปัสสาวะทั้งหมด 60 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 10 qubit ng/mcl อยู่ 22 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37 (22/60) และในจำนวนนี้ มีตัวอย่างที่ปริมาณดีเอ็นเอน้อยมากกว่า 1 qubit ng/mcl อยู่ 7 ใน 22 ตัวอย่าง (ร้อยละ 31.8) หรือ คิดเป็นร้อยละ 11.7 ของตัวอย่างทั้งหมด (7/60) ในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 10 qubit ng/mcl 22 ตัวอย่างนี้ พบว่าสามารถตรวจพบยีนดื้อยาได้ 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 72.7 ส่วนที่เหลือ 6 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 27.3 ไม่สามารถตรวจพบยีนดื้อยา ในนี้มี 3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคและยีนดื้อยาได้เลย คิดเป็นร้อยละ 13.6 (3/22) สาเหตุที่ดีเอ็นเอในตัวอย่างน้อยคาดว่าน่าจะเกิดจาก

1. ปริมาณปัสสาวะที่น้อยกว่า 10 ml ซึ่งพบเป็นร้อยละ 32 หรือ 1 ใน 3 ของตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอน้อย
2. จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียพบน้อยกว่า 10^5 cfu/ml คิดเป็นร้อยละ 27 หรือ 1 ใน 4

เมื่อคิดระยะเวลาในการตรวจพบยีนดื้อยาในตัวอย่างทั้งหมด 39 ตัวอย่าง(จากตารางที่ 2) ประกอบด้วยยีนคาร์บาพีเนมเมสหรือเบต้าแลคเตมเมสแล้วแต่ตัวอย่างนั้น(ตัวอย่างที่เว้นไว้คือไม่พบยีนดื้อยามี 21 ตัวอย่าง) ระยะเวลาในการตรวจพบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมเมสภายใน 60 นาทีคิดเป็นร้อยละ 38.5 สามารถตรวจพบยีนดื้อยาภายใน 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 ชั่วโมงคิดเป็น ร้อยละ 48.7, 64.1, 71.8, 87.2, 92.3, 97.4, 100 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟที่ 1 ระยะเวลาสั้นที่สุดที่ตรวจพบยีนดื้อยาคือ 0.03 นาที หรือประมาณ 2 วินาที อย่างช้าที่สุดที่ตรวจพบคือ 3140 นาที หรือ 52.3 ชั่วโมง ระยะเวลามัธยฐานในการตรวจพบยีนดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมเมสคือ 122 นาที (40.5, 402.9)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงว่าที่เจอยีนดื้อยา แกน x เป็นนาทีที่เจอยีนดื้อยา, แกน y เป็นเปอร์เซ็นต์ของยีนดื้อยาสะสมที่พบตามเวลาที่ผ่านไป

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน

	Urine1*		Urine2*		Urine3*		Urine4*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*Enterobacter hormaechei*	*Enterobacter Cloacae* complex	*Escherichia coli*	*E.coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*K.pneumoniae* 2 isolates
Ampicillin	$bla_{\text{TEM-1B}}$	-		R	$bla_{\text{TEM-1C,1B,1D}}$	R		R/R
Amoxicillin/Clav		R		R		R		R/I
Piperacillin/Taz		I		R		R		R/R
Cefazolin		R		R		R		R/R
Cefuroxime		R		R		R		R/R
Ceftriaxone	$bla_{\text{ACT-15}}$ $bla_{\text{OXA-1,10,244,454}}$ $bla_{\text{VEB-1,7}}$ $bla_{\text{DHA-1,723,27}}$ $bla_{\text{TEM-1B,76,104,143,186,196,198,208}}$	R	$bla_{\text{CTX-M-27}}$	R	$bla_{\text{CTX-M-15,33,157,172,176,182,189,193,204,207,208}}$ $bla_{\text{SHV-100}}$	R	$bla_{\text{SHV-11,12}}$	R/R
Cefepime		SDD		R		R		SDD/SDD
Doripenem		S		R		R		I/I
Ertapenem		S		-		-		S/S
Imipenem	$bla_{\text{OXA-48}}$	I		R		R		I/I
Meropenem		S	$bla_{\text{NDM-1}}$	R	$bla_{\text{OXA-66}}$	R		S/S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine5**		Urine6**		Urine7		Urine8**/*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*Escherichia coli*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*Escherichia coli*	*E.coli*	*Escherichia coli*	*E.coli* 2 isolates
Ampicillin	bla_{TEM-1B}	R		R		R	bla_{OXA-1} , bla_{TEM-1B}	R/R
Amoxicillin/Clav		R		S		R		I/R
Piperacillin/Taz		S		S		R		S/R
Cefazolin		R		R		S		R/R
Cefuroxime		R		R		I		R/R
Ceftriaxone	$bla_{CTX-M-82}$	R	$bla_{CTX-M-15,103,117,156,180}$ bla_{OXA-10}	R		S	bla_{CMY-42}, $bla_{CTX-M-15,114,127,183,188-9}$	R/R
Cefepime		SDD		SDD		S		SDD/R
Doripenem		S		S		S		S/I
Ertapenem		S		S		S		S/R
Imipenem		S		S		S		S/R
Meropenem		S		S		S	$bla_{NDM-17,20}$, $bla_{NDM-4,5}$	S/R

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine9		Urine10		Urine11		Urine12	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*Proteus mirabilis*	*Proteus mirabilis*	*K.pneumoniae*	*K.pneumoniae*
Ampicillin	$bla_{\text{TEM-1B}}$	S	$bla_{\text{TEM-1B}}$	R	$bla_{\text{OXA-1}}$, $bla_{\text{TEM-1B,1c}}$	R		R
Amoxicillin/ Clav		S		I				S
Piperacillin/ Taz		S		I		S		S
Cefazolin		S		S		S		S
Cefuroxime		S		S		S		S
Ceftriaxone		S	$bla_{\text{TEM-105}}$	S	$bla_{\text{OXA-320,534}}$, $bla_{\text{TEM-15,28-30,33-34,55,57,70,76,79,95,104-105,122,127,143,148,156,164,166,176,186,196,198.201,206-9,214-6,220,230,234}}$	S	$bla_{\text{SHV-27}}$	S
Cefepime		S		S		S		S
Doripenem		S		S		-		S
Ertapenem		S		S		S		S
Imipenem		S		S		R		S
Meropenem		S		S		S		S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 13*/**		Urine 14*		Urine 15*		Urine 16*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	-	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*K.pneumoniae*	*K.pneumoniae/PA /E.faecium*
Ampicillin		R/R		R	*bla*$_{\text{TEM-1B}}$	R	*bla*$_{\text{TEM 1B}}$	R/-/R
Amoxicillin/Clav		R/R		R		R		R/-/-
Piperacillin/Taz		R/R		R		R		R/S/-
Cefazolin		R/R		R		R		R/-/-
Cefuroxime		R/R		R		R		R/-/-
Ceftriaxone		R/R		R	*bla*$_{\text{CTX-M-55,88,104,117,172,173,189,193,204,209}}$ *bla*$_{\text{CMY-2,32,62,121,137}}$ *bla* $_{\text{ACT-5}}$, *bla* $_{\text{MIR-5}}$ *bla*$_{\text{OXA-1,47,224,534}}$ *bla* $_{\text{TEM 30,33,34,70,52B,105,176,216,226}}$	R	*bla* $_{\text{TEM 30,57,196,215}}$ *bla* $_{\text{ACT-5,14}}$	R/-/-
Cefepime		R/R		R		R		R/-/-
Doripenem		I/S		R		R		R/I/-
Ertapenem				-		-		-
Imipenem		I/S		R	*bla*$_{\text{NDM-1,5,14,20,17}}$	R		R/R/-
Meropenem		S/S		R	*bla*$_{\text{OXA-232}}$	R	*bla*$_{\text{OXA-232}}$	R/R/-

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 17*		Urine 18*		Urine 19*		Urine 20*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*K.pneumoniae*, *A. baumannii*	*K.pneumoniae* /*A. baumannii*	*Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumoniae*	*Enterobacter cloacae complex*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*
Ampicillin	$bla_{\text{TEM-1A}}$	R/-		-		R	$bla_{\text{TEM 1A,1C}}$	R
Amoxicillin/Clav		R/-		R		R		R
Piperacillin/Taz		R/R		R		R		R
Cefazolin		R/-		R		R		R
Cefuroxime		R/-		R		R		R
Ceftriaxone	$bla_{\text{OXA-1,9,181,484}}$ $bla_{\text{CTX-M-15,117,184,189,209,218}}$ $bla_{\text{SHV-11,148}}$	R/R	$bla_{\text{ACT-16}}$	R		R	$bla_{\text{TEM 40,55}}$ $bla_{\text{OXA-244}}$ $bla_{\text{SHV-98}}$ $bla_{\text{CTX-M-15,150,211}}$	R
Cefepime		R/-		S		R		R
Doripenem		R/R		R		R		R
Ertapenem				-		-		-
Imipenem		R/R		R		R		I
Meropenem	$bla_{\text{OXA-232}}$	R/R	$bla_{\text{OXA-232}}$	R	$bla_{\text{OXA-232}}$	R	$bla_{\text{OXA-48}}$	R

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 21*		Urine 22		Urine 23		Urine 24	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*
Ampicillin	$bla_{\text{TEM-1A, 1C}}$	R		-		S		R
Amoxicillin/ Clav		R		S		S		I
Piperacillin/Taz		R		S		S		S
Cefazolin		R		S		S		S
Cefuroxime		R		R		S		S
Ceftriaxone	$bla_{\text{TEM-91,180,183}}$ $bla_{\text{CTX-M-15,88,156,176,193,202}}$	R		S	$bla_{\text{ACT-5}}$	S	$bla_{\text{ACT-5, 14}}$ $bla_{\text{OXA-1,224,534}}$	S
Cefepime		S		S		S		S
Doripenem		R		S		S		S
Ertapenem				S		S		S
Imipenem		R		S		S		S
Meropenem	$bla_{\text{OXA-232}}$	R		S		S	$bla_{\text{OXA-232}}$	S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 25**		Urine 26**		Urine 27**		Urine 28**	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*E.coli*	*E.coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*
Ampicillin	$bla_{\text{TEM-1B}}$	R		R		R		R
Amoxicillin/ Clav		R		R		R		I
Piperacillin/Taz		I		S		R		S
Cefazolin		R		R		R		S
Cefuroxime		R		R		R		S
Ceftriaxone	$bla_{\text{TEM-105,213}}$ $bla_{\text{CTX-M-42,55,88,188}}$ $bla_{\text{OXA-10,50}}$	R	$bla_{\text{OXA-1,320,534}}$ $bla_{\text{CTX-M-15,117,176,197}}$ $bla_{\text{TEM-1B,70,166,182}}$	R	$bla_{\text{ACT-5}}$ $bla_{\text{CMY-2,4,6,22,62,69,138,146}}$ $bla_{\text{CTX-M-55,172,173,176,209}}$ $bla_{\text{TEM-30,57,68,105,158,172,176}}$ $bla_{\text{VEB-1,3,4,5,6,8}}$	R	$bla_{\text{TEM-198}}$	S
Cefepime		R		S		R		S
Doripenem		S		S		S		S
Ertapenem		S		S		S		S
Imipenem		S		S		S		S
Meropenem	$bla_{\text{IMP-14,48}}$	S		S		S		S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 29**		Urine 30**		Urine 31**		Urine 32**	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*E.coli*	*E.coli/ citrobacter koseri*	*E.coli*	*E.coli/ Pseudomonas aeruginosa*	*E.coli*	*E.coli*	*Enterobacter cloacae* strain	*Enterobacter cloacae complex*
Ampicillin		R/-	bla_{TEM-1B}	R/-		R	bla_{OXA-1}	-
Amoxicillin/ Clav		I/S		R/-		I		R
Piperacillin/Taz		S/S		S/-		S		S
Cefazolin		R/-		R/-		R		R
Cefuroxime		R/S		R/-		R		R
Ceftriaxone		R/S	$bla_{OXA-1,320}$ $bla_{CTX-M-157}$ $bla_{TEM-166,188,215}$	R/-	$bla_{CTX-M-27,84,174}$ $bla_{TEM-146,217,220}$	R	bla_{ACT-9}	R
Cefepime		R/S		R/-		S		SDD
Doripenem		S/S		S/S		S		S
Ertapenem		S/S		S/-		S		S
Imipenem		S/S		S/S		S		S
Meropenem		S/S		S/S		S		S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 33 /**		Urine 34		Urine 35		Urine 36*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*E.coli*	*E.coli/ E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*
Ampicillin		R/R		R		R		R
Amoxicillin/ Clav		S/S		I		S		I
Piperacillin/Taz		S/S		S		S		S
Cefazolin		S/R		S		S		S
Cefuroxime		S/R		S		S		R
Ceftriaxone		S/R		S		S		S
Cefepime		S/S		S		S		S
Doripenem		S/S		S		S		S
Ertapenem		S/S		S		S		S
Imipenem		S/S		S		S		R
Meropenem		S/S		S		S		S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 37*		Urine 38*		Urine 39*		Urine 40*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*K.aerogenes*	*K.pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*E.coli/K.pneumoniae*	*E.coli /K.pneumoniae*
Ampicillin		R		-	*bla* $_{TEM1D}$	R		R/R
Amoxicillin/ Clav		R		R		R		S/R
Piperacillin/Taz		R		S		R		S/R
Cefazolin		R		R		R		R/R
Cefuroxime		R		R		R		R/R
Ceftriaxone	*bla*$_{SHV-26}$ *bla*$_{CTX-M-189}$ *bla* $_{OXA-9}$	R		S	*bla*$_{CTX-M-55,142,180,208-9}$ *bla* $_{OXA-9}$ *bla*$_{TEM-183}$	R	*bla*$_{ACT-5}$ *bla*$_{SHV11-12}$ *bla*$_{TEM-1B,1C,146,215}$ *bla*$_{CTX-M-19,24,55,127,129,156,192,204}$	R/R
Cefepime		R		S		R		S/R
Doripenem		R		S		R		S/I
Ertapenem		-		S		-		S/-
Imipenem		R	*bla*$_{NDM-1}$	I		R	*bla*$_{OXA-232}$	S/R
Meropenem	*bla*$_{OXA-232}$	R		S	*bla*$_{NDM-1,2}$	R		S/S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 41*		Urine 42*		Urine 43*		Urine 44*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*K.pneumoniae*	*K. aerogenes*	*K.pneumoniae*	*K.pneumoniae*	-	*K.pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*
Ampicillin		-	$bla_{OKP-B-3}$	R		R	bla_{OXA-1}	R
Amoxicillin/ Clav		R		R		R		R
Piperacillin/Taz		S		S		R		R
Cefazolin		R		R		R		R
Cefuroxime		R		R		R		R
Ceftriaxone		S	$bla_{DHA-1,27}$	S		R	$bla_{TEM-76,206,208,215}$ bla_{LAP-2}	R
Cefepime		S		S		R		SDD
Doripenem		S		I		R		R
Ertapenem		S		S		-		-
Imipenem		I		S		I		R
Meropenem		S		S		I	$bla_{NDM-1,6}$	R

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 45*		Urine 46*		Urine 47*		Urine 48*	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*	*E.cloacde complex*	*E.cloacde complex*
Ampicillin	*bla*$_{TEM-1B}$	R	*bla*$_{TEM-1A}$	R	*bla*$_{TEM-1B}$	R	*bla*$_{TEM-1B}$, *bla*$_{OXA-1}$	-
Amoxicillin/ Clav		R		R		R		R
Piperacillin/Taz		R		R		R		R
Cefazolin		R		R		R		R
Cefuroxime		R		R		R		R
Ceftriaxone	*bla*$_{TEM-76,206,208}$ *bla*$_{CTX-M-182}$ *bla*$_{OXA-1}$ *bla*$_{LAP-2}$ *bla*$_{SHV-100}$ *bla*$_{OXA-566}$	R		R	*bla*$_{TEM-34,70,176,200,215,226}$ *bla*$_{ACT-5}$ *bla*$_{OXA-1,31}$ *bla*$_{CTX-M-15,52,79,118,173,183}$ *bla*$_{CMY-2,4,32,107}$	R	*bla*$_{CTX-M-15,114,117,182,211}$ *bla*$_{ACT-15}$ *bla*$_{OXA-320,392,534}$ *bla*$_{TEM-104,144,196,216}$	R
Cefepime		S		R		R		R
Doripenem		R		R		R		R
Ertapenem				-		-		-
Imipenem		R		R		R		R
Meropenem	*bla*$_{OXA-48}$ *bla*$_{NDM-1}$	R	*bla*$_{NDM-16}$	R	*bla*$_{NDM-5,15,17,20,21}$	R	*Bla*$_{NDM-1,3,24}$	R

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 49*		Urine 50**		Urine 51**		Urine 52**	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*
Ampicillin		R	bla_{OXA-1}	R	bla_{SHV-1}	R		R
Amoxicillin/ Clav		R		I		I		R
Piperacillin/Taz		R		I		S		S
Cefazolin		R		R		R		R
Cefuroxime		R		R		R		R
Ceftriaxone	$bla_{CTX-M-15,55,176,189,197,209}$ $bla_{OKP-B-18}$	R	$bla_{OXA-31,534}$ $bla_{CTX-M-182,184,189,202-3,218}$	R		R	$Bla_{DHA-1,24}$	R
Cefepime		R		R		R		S
Doripenem		R		S		S		S
Ertapenem		-		S		S		S
Imipenem		R		S		S		S
Meropenem	$bla_{NDM-1,2,6,9,14,16,22,24}$	R		S		S		S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 53**		Urine 54**		Urine 55**		Urine 56	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*E.coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*
Ampicillin		R		R		R		R
Amoxicillin/ Clav		R		R		I		S
Piperacillin/Taz		S		I		R		S
Cefazolin		R		R		R		S
Cefuroxime		R		R		R		S
Ceftriaxone	$bla_{OXA-534}$	R	$bla_{OXA-224}$ $bla_{CTX-M-180,182,184}$	R	$bla_{CTX-M-114,210,216}$	R		S
Cefepime		S		R		R		S
Doripenem		S		S		S		S
Ertapenem		S		S		S		S
Imipenem		S		S		S		S
Meropenem		S		S		S		S

ตารางที่ 3 แสดงยีนดื้อยาที่พบโดยวิธีมินไอออนซีเควนซิ่ง ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 60 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจากการเพาะเชื้อปัสสาวะโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

	Urine 57		Urine 58		Urine 59		Urine 60	
	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture	MinION	Culture
Bacteria	-	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*	*E.coli*	*E.coli*
Ampicillin		R		R		R		R
Amoxicillin/ Clav		S		S		S		S
Piperacillin/Taz		S		S		S		S
Cefazolin		S		S		S		S
Cefuroxime		S		S		S		S
Ceftriaxone		S	$bla_{\text{TEM-127,144,176}}$	S		S		S
Cefepime		S		S		S		S
Doripenem		S		S		S		S
Ertapenem		S		S		S		S
Imipenem		S		S		S		S
Meropenem		S		S		S		S

(แสดงสีเทาเข้มในตารางหมายถึงยีนดื้อยาและผลความไวไม่ไปด้วยกัน, สีดำในตารางหมายถึงไม่สามารถตรวจเจอเชื้อก่อโรคได้โดย MinION)

*****หมายถึง เชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมเมส

**หมายถึง เชื้อดื้อยาชนิดสร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสชนิดออกฤทธิ์กว้างหรือดื้อยา cephalosporin

เชื้อที่ไม่มีเครื่องหมาย *,** หมายถึง ไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนมเมสและไม่ใช่เชื้อดื้อยาชนิดสร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสชนิดออกฤทธิ์กว้าง

จากการศึกษานี้เป็นการทดสอบความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ซึ่งนำมาทดสอบกับตัวอย่างปัสสาวะโดยตรง โดยผ่านการสกัดดีเอ็นเอ เตรียมบาร์โคดของแต่ละตัวอย่างโดย 1 flow cell สามารถใช้ได้กับ 12 ตัวอย่าง จากนั้นใส่ตัวอย่างทั้งหมดเข้าสู่เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ จะได้ข้อมูลออกมาเป็นศักย์ไฟฟ้า(ไฟล์ FAST5) ใช้โปรแกรม GUPPY basecaller เพื่อแปลงไฟล์เป็นลำดับเบส (ไฟล์ FASTQ) นำเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธีทาง bioinformatics เพื่อให้ได้ออกมาเป็นชื่อเชื้อก่อโรคและยีนดื้อยา โดยกระบวนการทั้งหมดนี้ใช้เวลามัธยฐานโดยประมาณ 3.2(1.8-6.8) ชั่วโมง ขึ้นกับเวลาที่จะเจอยีนดื้อยาและขั้นตอนการวิเคราะห์ยีนดื้อยา

ได้แสดงผลของเชื้อก่อโรคจากการเพาะเชื้อและความไวต่อยาปฏิชีวนะคู่กับผลการตรวจยีนจากเครื่องมือนาโนพอร์ จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยทั้งหมด 60 ราย ดังแสดงในตารางที่ 3

จากข้อมูลในตารางที่ 3 พบยีนดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม เช่น ยีน NDM, OXA-48,66,232 ในเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีทั้งหมด 23 ตัวอย่าง โดยเป็นผลบวกจริง 21 ตัวอย่าง และผลบวกลวง 2 ตัวอย่าง มีเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมเมสทั้งหมด 28 ตัวอย่าง พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมเมส 21 ตัวอย่าง และไม่พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมเมส 7 ตัวอย่าง โดย 5 ใน 7 ตัวอย่างนี้ พบว่ามีดีเอ็นเอน้อยเกินไป

ส่วนในกลุ่มที่ไม่ใช่เชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม 32 ตัวอย่าง พบว่ามี 2 ตัวอย่าง ที่เป็นบวกลวง ได้แก่ตัวอย่างที่ 24 ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่สร้างเอนไซม์บีตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย และตัวอย่าง 25 ซึ่งเป็นเชื้อไม่ดื้อยา (non-CRE, non-ESBL) พบยีน OXA-232 และ IMP 14, 48 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ากลุ่มที่ไม่ใช่เชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม 32 ราย ตรวจไม่พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนม 30 ราย จากการคำนวณทางสถิติพบว่าเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์มีความไว ความจำเพาะในการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมเมสดังนี้

ความไว(Sensitivity)	75% (55.1-89.3% : 95%CI)
ความจำเพาะ(Specificity)	94% (80.3-99.2% : 95%CI)
PPV	59.7% (27.6-85.2%: 95%CI)
NPV	96.8% (94-98%: 95%CI)
ค่าความถูกต้อง (Accuracy)	91.7% (81.6-97.2%: 95%CI)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี ดื้อยาคาร์บาพีเนม(CRE)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี ไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนม(Non-CRE)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก	21 (True positive)	2 (False positive)
	ผลลบ	7 (False negative)	30 (True negative)

เมื่อทดสอบดูยีนดื้อยาชนิดที่สร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมส ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าในกลุ่มเชื้อดื้อยาทั้งกลุ่มดื้อคาร์บาพีเนม (CRE) กลุ่มสร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสชนิดออกฤทธิ์กว้าง (ESBL) และกลุ่มที่สร้างเอนไซม์แอมป์ซีเบตาแลคแตมเมส ตรวจพบยีนดื้อยากลุ่ม 3rd cephalosporin 37 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 44 ตัวอย่าง คิดเป็นความไวร้อยละ 84.1 โดยพบยีนดื้อยาในกลุ่มเชื้อที่ไม่ดื้อยา 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คิดเป็นความจำเพาะร้อยละ 62.5

ตารางที่ 5 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี ดื้อยา(CRE & ESBL/ampC)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี ไม่ดื้อยา(Non-CRE/ESBL/ampC)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก (พบยีนดื้อยา3rd ceph)	37 (True positive)	6 (False positive)
	ผลลบ (ไม่พบยีนดื้อยา3rd ceph)	7 (False negative)	10 (True negative)

ความไว(Sensitivity) 84.1% (69.9-93.4% : 95%CI)

ความจำเพาะ(Specificity) 62.5% (35.4-84.8% : 95%CI)

PPV 61.9% (45.9-75.6%: 95%CI)

NPV 84.4% (71.4-92.2%: 95%CI)

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) 71.6% (58.5-82.5%: 95%CI)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จะเห็นได้ว่าเมื่อทดสอบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์จะมีความจำเพาะค่อนข้างสูง(ร้อยละ 94) ถ้าเจอยีนดื้อยาแสดงว่าน่าจะเป็นเชื้อดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมจริงแต่ความไวจะต่ำกว่าคือโอกาสที่จะตรวจเจอยีนดื้อยาร้อยละ 75 ในกลุ่มที่ดื้อยาคาร์บาพีเนม

ส่วนการทดสอบยีนดื้อยากลุ่ม 3rd cephalosporin ด้วยเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์จะมีความไวที่ค่อนข้างสูงกล่าวคือ โอกาสที่จะตรวจเจอยีนดื้อยาเบต้าแลคแตมร้อยละ 84.1 ในกลุ่มที่ดื้อยา แต่ความจำเพาะจะค่อนข้างต่ำ คือ ร้อยละ 62.5 กล่าวคือ ในกลุ่มที่ไม่ดื้อยาก็ยังสามารถพบยีนดื้อยา 3rd cephalosporin ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

จากการศึกษารูปแบบ Cross-sectional descriptive study โดยรวบรวมผู้ป่วยแบบ Prospective enrollment ในผู้ป่วยที่สงสัยภาวะติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเก็บปัสสาวะที่มีเม็ดเลือดขาวและแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เลือกเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอี เปรียบเทียบผลความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธีเพาะเชื้อมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการกับวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง ได้ผู้ป่วยจำนวน 60 ราย ใช้ระยะเวลาในการเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งสิ้น 8 เดือน ตั้งแต่ สิงหาคม 2563 จนถึง มีนาคม 2564

ข้อมูลพื้นฐาน เป็นผู้ป่วยเพศหญิง 36 คน และเพศชาย 24 คน คิดเป็น 1.5 : 1 อายุมัธยฐานอยู่ที่ 77 ปี อายุน้อยสุด 3 เดือนและอายุมากที่สุด 96 ปี มีโรคประจำตัวร้อยละ 97 โดยพบว่าเป็นโรคเบาหวานมากถึงร้อยละ 42 เป็นผู้ป่วยใน 31 คน คิดเป็นร้อยละ 52 เป็นผู้ป่วยนอก 29 ราย คิดเป็นร้อยละ 48 โดยผู้ป่วยใน เป็นผู้ป่วยในแผนกอายุรกรรมพบมากที่สุด 22 คน คิดเป็นร้อยละ 37 แผนกศัลยกรรม 7 คน คิดเป็นร้อยละ 12 และผู้ป่วยเด็ก 2 คน คิดเป็นร้อยละ 3

จากการศึกษาเรื่องการเปรียบการดื้อยาคาร์บาพีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งกับวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐานในผู้ป่วยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ในงานวิจัยนี้พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะร้อยละ 65 ที่เหลือร้อยละ 35 เป็นผู้ป่วยที่พบแบคทีเรียในปัสสาวะแต่ไม่มีอาการ ในจำนวน 60 รายนี้ พบเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่ดื้อยาคาร์บาพีเนมร้อยละ 46.7 อีกร้อยละ 53.3 เป็นเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่ไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนมซึ่งรวมถึงกลุ่มที่สร้างเอ็นไซม์เบต้าแลคแตมเมสชนิดออกฤทธิ์กว้าง กลุ่มที่สร้างเอนไซม์แอมป์ซีเบต้าแลคแตมเมสและกลุ่มที่ไม่ดื้อยา สำหรับยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมเมส พบ 23 ตัวอย่าง พบยีน OXA มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 48 พบยีน NDM รองลงมาคิดเป็นร้อยละ 39 พบทั้งสองยีนนี้ร้อยละ 9 และพบยีน IMP ร้อยละ 4

เชื้อที่พบมากที่สุดในกลุ่มดื้อยาคาร์บาพีเนมคือ เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* พบมากถึงร้อยละ 57 รองลงมาเป็นเชื้อ *E.coli* พบร้อยละ 21

การตรวจด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง พบว่าเชื้อก่อโรคตรงกันกับผลเพาะเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานทั้งหมด มีปัสสาวะตัวอย่างที่ 1 และ 18 พบว่าวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งสามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคได้ถึงระดับละเอียด กล่าวคือ สามารถตรวจพบว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter hormaechei* ซึ่งเป็นสมาชิกกลุ่มย่อยของเชื้อ *Enterobacter cloacae* complex อีกทีนึง ซึ่งการตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อไม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สามารถทำได้[17] แต่อย่างไรก็ตามการตรวจโดยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง ไม่สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคได้ใน 3 ตัวอย่างคือ ตัวอย่างที่ 14, 43 และ 57 เนื่องจากมีจำนวนดีเอ็นเอที่น้อยเกินไป

การตรวจหายีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 75 และ 94 ตามลำดับ

ส่วนการตรวจหายีนดื้อยากลุ่ม 3rd cephalosporin ด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 84.1 และ 62.5 ตามลำดับ

ในข้อมูลของตัวอย่างปัสสาวะ 60 ตัวอย่างนี้ มีจำนวน 7 และ 22 ตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอน้อยมากคือน้อยกว่า 1 และน้อยกว่า 10 ng/mcl ตามลำดับ ถ้าตัดตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอน้อยออกจะเหลือ 53 ตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอมากกว่า 1 ng/mcl ถ้านำมาคิดคำนวณความไวและความจำเพาะของของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์จะได้ดังนี้

ตารางที่ 6 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอ >= 1 qubit ng/mcl)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยาคาร์บาพีเนม(CRE)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนม(Non-CRE)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก	20 (True positive)	2 (False positive)
	ผลลบ	3 (False negative)	28 (True negative)

ความไว(Sensitivity) 86.9% (66.4-97.2% : 95%CI)

ความจำเพาะ(Specificity) 93.3% (77.9-99.1% : 95%CI)

PPV 61.7% (29.5-86.1%: 95%CI)

NPV 98.3% (95.3-99.4%: 95%CI)

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) 92.6% (82-98%: 95%CI)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอ >= 1 qubit ng/mcl)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยา(CRE & ESBL/ampC)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยา(Non-CRE/ESBL/ampC)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก (พบยีนดื้อยา3rd ceph)	35 (True positive)	6 (False positive)
	ผลลบ (ไม่พบยีนดื้อยา3rd ceph)	3 (False negative)	9 (True negative)

ความไว(Sensitivity) 92.1% (78.6-98.3% : 95%CI)

ความจำเพาะ(Specificity) 60.0% (32.3-83.4% : 95%CI)

PPV 62.5% (47.1-75.7% : 95%CI)

NPV 91.3% (76.7-97.1%: 95%CI)

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) 73.5% (59.6-84.7%: 95%CI)

จากตารางแสดงที่ 6 และ 7 จะเห็นว่าเมื่อตัดตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอน้อยกว่า 1 ng/mcl ออก จะได้ค่าความไวที่มากขึ้น จากร้อยละ 75 เป็น 86.9 ในการตรวจหายีนดื้อยาคาร์บาพีเนม และค่าความไวที่มากขึ้นจากร้อยละ 84.1 เป็น 92.1 ในการตรวจหายีนดื้อยา 3rd ceph. ส่วนความจำเพาะพอเดิมที่ประมาณร้อยละ 60

เมื่อคิดความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์โดยในการหายีนดื้อยาคาร์บาพีเนมโดยตัดตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอน้อยกว่า 10 qubit ng/mcl ออกไป ซึ่งมีตัวอย่าง 22 จะเหลือตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอมากกว่า 10 qubit ng/mcl ทั้งหมด 38 ตัวอย่าง จะได้ค่าความจำเพาะที่เพิ่มมากขึ้น จากร้อยละ 93.3 เป็นร้อยละ 95.7 เมื่อตัดตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอน้อยกว่า 1 เป็นน้อยกว่า 10 ตามลำดับ ส่วนค่าความไวได้พอเดิม คือประมาณร้อยละ 86 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอ >= 10 qubit ng/mcl)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยาคาร์บาพีเนม(CRE)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนม(Non-CRE)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก	13 (True positive)	1 (False positive)
	ผลลบ	2 (False negative)	22 (True negative)

ความไว(Sensitivity)	86.7% (59.5-98.3% : 95%CI)
ความจำเพาะ(Specificity)	95.7% (78.1-99.9% : 95%CI)
PPV	71.1% (26.4-94.4%: 95%CI)
NPV	98.3% (94.1-99.5%: 95%CI)
ค่าความถูกต้อง (Accuracy)	94.7% (82.1-99.3%: 95%CI)

ตารางที่ 9 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอ >= 10 qubit ng/mcl)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยา(CRE & ESBL/ampC)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยา(Non-CRE/ESBL/ampC)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก (พบยีนดื้อยา3rd ceph)	26 (True positive)	4 (False positive)
	ผลลบ (ไม่พบยีนดื้อยา3rd ceph)	1 (False negative)	7 (True negative)

ความไว(Sensitivity)	96.3% (81.0-99.9% : 95%CI)
ความจำเพาะ(Specificity)	63.6% (30.8-89.1% : 95%CI)
PPV	65.7% (46.7-80.8%: 95%CI)
NPV	95.9% (76.7-99.4%: 95%CI)
ค่าความถูกต้อง (Accuracy)	77.4% (60.9-89.3%: 95%CI)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อนำแต่ตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอตั้งแต่ 10 qubit ng/mcl มาคำนวณค่าความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ในการหายีนดื้อยาเบต้าแลคแตมพบว่ามีความไวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 92.1เป็นร้อยละ 96.3 แต่ความจำเพาะมีค่าพอเดิม ร้อยละ 63.6 เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 9

ถ้าเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนแบคทีเรียโคลีตั้งแต่ 10^5 cfu/ml ขึ้นไป ซึ่งจะมีตัวอย่างทั้งหมด 52 ตัวอย่าง มาคำนวณค่าความไวและความจำเพาของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ในการหายีนดื้อยาคาร์บาพีเนม จะได้ค่าความไวและค่าความจำเพาะเท่าๆ กันกับเมื่อคัดตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอปริมาณน้อยออก โดยจะได้ค่าตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีแบคทีเรียโคโลนี >= 10^5 cfu/ml)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยาคาร์บาพีเนม(CRE)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนม(Non-CRE)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก	17 (True positive)	2 (False positive)
	ผลลบ	3 (False negative)	32 (True negative)

ความไว(Sensitivity)	85% (62.1-96.8% : 95%CI)
ความจำเพาะ(Specificity)	93.8% (79.2-99.2% : 95%CI)
PPV	62.7% (30.3-86.7%: 95%CI)
NPV	98.1% (94.7-99.3%: 95%CI)
ค่าความถูกต้อง (Accuracy)	92.8% (82.1-98.1%: 95%CI)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ส่วนความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ในการหายีนดื้อยา 3rd ceph.เลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนแบคทีเรียโคลีตั้งแต่ 10^5 cfu/ml ขึ้นไปมาคำนวณจะได้ค่าความไวที่ต่ำกว่าเดิม แต่ค่าความจำเพาะพอเดิม เมื่อเทียบกับกรณีตัดตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอปริมาณน้อยออก โดยจะได้ค่าแสดงตามตารางที่ 11 ดังนี้

ตารางที่ 11 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีแบคทีเรียโคโลนี >= 10^5 cfu/ml)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยา(CRE & ESBL/ampC)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยา(Non-CRE/ESBL/ampC)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก (พบยีนดื้อยา3rd ceph)	32 (True positive)	6 (False positive)
	ผลลบ (ไม่พบยีนดื้อยา3rd ceph)	4 (False negative)	10 (True negative)

ความไว(Sensitivity)	88.9% (73.9-96.9% : 95%CI)
ความจำเพาะ(Specificity)	62.5% (35.4-84.8% : 95%CI)
PPV	63.2% (47.4-76.6%: 95%CI)
NPV	88.6% (74.1-95.5%: 95%CI)
ค่าความถูกต้อง (Accuracy)	73.6% (59.5-84.8%: 95%CI)

เมื่อคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 1 qubit ng/mcl และสามารถตรวจพบยีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งในเวลา ไม่เกิน 24 ชั่วโมง หรือ 1,440 นาที จะคำนวณค่าความไวและความจำเพาะของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ได้ตารางแสดงดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 12 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอ >= 1 qubit ng/mcl และสามารถตรวจพบยีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง ภายในเวลา 24 ชั่วโมง)

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยาคาร์บาพีเนม(CRE)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยาคาร์บาพีเนม(Non-CRE)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก	19 (True positive)	2 (False positive)
	ผลลบ	3 (False negative)	26 (True negative)

ความไว(Sensitivity) 86.4% (65.1-97.1% : 95%CI)

ความจำเพาะ(Specificity) 92.9% (76.5-99.1% : 95%CI)

PPV 59.9% (28.0-85.2%: 95%CI)

NPV 98.2% (95.0-99.4%: 95%CI)

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) 92.1% (80.9-97.9%: 95%CI)

ตารางที่ 13 แสดงความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง (เฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอ >= 1 qubit ng/mcl และสามารถตรวจพบยีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง ภายในเวลา 24 ชั่วโมง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

		การตรวจวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐาน (Gold standard)	
		เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีดื้อยา(CRE & ESBL/ampC)	เชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีไม่ดื้อยา(Non-CRE/ESBL/ampC)
การตรวจยีนดื้อยาวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง (Diagnostic test)	ผลบวก (พบยีนดื้อยา3rd ceph)	33 (True positive)	5 (False positive)
	ผลลบ (ไม่พบยีนดื้อยา3rd ceph)	3 (False negative)	9 (True negative)

ความไว(Sensitivity) 91.7% (77.5-98.3% : 95%CI)

ความจำเพาะ(Specificity) 64.3% (35.1-87.2% : 95%CI)

PPV 65.0% (47.8-79.1% : 95%CI)

NPV 91.4% (77.1-97.1%: 95%CI)

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) 75.8% (61.6-86.8%: 95%CI)

จากตารางที่ 12 จะเห็นว่า เมื่อเลือกตัวอย่างเฉพาะที่มีปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 1 qubit ng/mcl ขึ้นไป และสามารถตรวจพบยีนดื้อยาได้ภายใน 24 ชั่วโมง มาคำนวณทางสถิติพบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่งใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอตั้งแต่ 1 qubit ng/mcl โดยไม่คำนึงถึงเวลาในการพบยีนดื้อยา พบว่ามีเพียง 3 ตัวอย่างที่ตรวจพบยีนดื้อยาในเวลาเกิน 24 ชั่วโมง เมื่อคำนวณค่า NPV จะได้ค่า 98.2% (95.0-99.4%: 95%CI)

นั่นแสดงว่า ถ้าใช้วิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งในการตรวจยีนดื้อยาคาร์บาพีเนม โดยจำกัดเวลาภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อผลตรวจไม่พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนม แสดงว่าไม่มียีนดื้อยาจริงคิดเป็นร้อยละ 98.2 และอาจมีบางส่วนที่มียีนดื้อยาแต่ตรวจไม่พบได้ คิดเป็นร้อยละ 1.8

สำหรับการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. ด้วยวิธีนาโนพอซีเควนซิ่ง เลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีจำนวนดีเอ็นเอตั้งแต่ 1 qubit ng/mcl และสามารถตรวจพบยีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามี NPV 91.4% (77.1-97.1%: 95%CI) นั่นแสดงว่า ถ้าใช้วิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งในการตรวจยีนดื้อยา 3rd ceph. โดยจำกัดเวลาภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อผลตรวจไม่พบยีนดื้อยา 3rd ceph. แสดงว่าไม่มียีนดื้อยาจริงคิดเป็นร้อยละ 91.4 และอาจมีบางส่วนที่มียีนดื้อยาแต่ตรวจไม่พบได้ คิดเป็นร้อยละ 8.6

ดังนั้นเมื่อผลการตรวจไม่พบยีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง สามารถแปลผลได้ว่า ผลเป็นลบจริงเกินร้อยละ 90 และอาจจะมีบางส่วนที่เป็นผลลบลวงได้เพียงร้อยละ 1.8 สำหรับยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมและ 8.6 สำหรับยีนดื้อยา 3rd ceph สามารถพิจารณาลดยาฆ่าเชื้อได้ (de-escalate) แต่ถ้าผลเป็นบวก พบว่าเป็นบวกจริงเพียงร้อยละ 59.9 สำหรับยีนดื้อยาคาร์บาพีเนม และร้อยละ 65 สำหรับยีนดื้อยา 3rd ceph เนื่องจากความชุกของโรคต่ำสำหรับเชื้อกลุ่มดื้อยาคาร์บาพีเนม (Prevalence CRE 11%, ESBL 42%)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการศึกษานี้พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมเมสเป็นยีน OXA มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 48 (OXA-48, OXA-232) พบยีน NDM รองลงมาคิดเป็นร้อยละ 39 พบทั้งสองยีนนี้ร้อยละ 9 ไม่พบยีน KPC เลยซึ่งเป็นไปตามระบาดวิทยาของประเทศไทยที่พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนม OXA และ NDM มากที่สุด ซึ่งสามารถพิจารณาให้ยาฆ่าเชื้อในกลุ่ม Carbapenem-sparing ได้ กรณีเชื้อมีความไวต่อยา เช่น Ceftazidime-avibactam ซึ่งครอบคลุมเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมกลุ่ม OXA แต่ไม่ครอบคลุมในกลุ่มที่เป็น NDM ซึ่งยาหลักคือกลุ่ม Aztreonam แต่ยังไม่มีในประเทศไทย ดังนั้นถ้าพบยีน NDM ยังคงใช้ยาในกลุ่ม Colistin ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อทางเลือกสุดท้ายในประเทศไทย

จากการศึกษาพบว่ามี 7 ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่า 1 qubit ng/mcl และ 22 ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่า 10 quit ng/mcl พบว่าไม่มีค่ามาตรฐานของปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยเกินไป บางการศึกษาแนะนำปริมาณดีเอ็นเอที่ 20 ng/mcl แต่ก็สามารถตรวจซีเควนซิ่งได้แม้

ปริมาณดีเอ็นเอจะน้อยถึง 6 ng/mcl ก็ตาม [18] ในการศึกษานี้พบว่าดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง 1-10 ng/mcl (15 ตัวอย่าง) ยังสามารถระบุเชื้อและยีนดื้อยาจากการซีเควนซิ่งได้ถูกต้องเป็นส่วนใหญ่

ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ปริมาณปัสสาวะที่น้อยเกินไป (น้อยกว่า 10 ml) การได้ยาฆ่าเชื้อมาก่อนที่จะได้ปัสสาวะมาตรวจ และวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

เนื่องจากปริมาณปัสสาวะที่ได้ในการศึกษานี้ส่วนใหญ่น้อยกว่า 10 ml ในตัวอย่างที่เก็บปัสสาวะได้น้อย เช่น 1.5-3 ml มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 1 qubit ng/mcl ทั้งหมด จึงเป็นข้อจำกัดนึงที่อาจจะทำให้ดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อย

นอกจากนี้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ ในการศึกษานี้ใช้ QIAamp PowerFecal Pro DNA kit ซึ่งใช้เม็ดบีด(bead)และกระบวนการทางเคมีเพื่อให้เซลล์แตกและให้ได้ดีเอ็นเอ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่รวดเร็วกว่าอีกวิธีอื่น แต่อาจจะได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีคุณภาพน้อยกว่า

อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าได้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่า 1 qubit ng/mcl ให้เก็บปัสสาวะส่งตรวจใหม่ และใช้ปริมาณปัสสาวะไม่น้อยกว่า 10 ml เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาเรื่องปริมาณดีเอ็นเอน้อยได้ แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการให้ยาฆ่าเชื้อไปแล้วนั้น อาจจะทำให้ปริมาณเชื้อน้อยลง ส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยลงไปด้วย

การรอผลเพาะเชื้อตามวิธีมาตรฐานนั้นใช้เวลาถึง 48-72 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย ดังนั้นส่งผลให้มีความล่าช้าในการปรับยาฆ่าเชื้ออย่างเหมาะสม ผู้ป่วยในการศึกษานี้ โดยเฉพาะในกลุ่มดื้อยาคาร์บาพีเนมนั้น พบว่ามีการปรับเปลี่ยนยาฆ่าเชื้ออย่างเร็วสุด คือ ประมาณ 48 ชั่วโมง บางรายใช้เวลาถึง 96 ชั่วโมง การตรวจหายีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง ถ้าตัดเวลาในการเจอยีนดื้อยาภายใน 24 ชั่วโมง สามารถค้นพบยีนดื้อยาร้อยละ 92 โดยรวมจะใช้เวลาทั้งหมด 26 ชั่วโมง ตั้งแต่ได้รับสิ่งส่งตรวจจนถึงเวลาที่ตรวจเจอยีนดื้อยา ซึ่งแบ่งเป็นเวลาที่ใช้ในการเตรียมสิ่งส่งตรวจจนถึงสกัดดีเอ็นเอเสร็จ จะใช้เวลาโดยเฉลี่ย 2 ชั่วโมง และการตรวจยีนดื้อยาใช้เวลา 24 ชั่วโมง บางรายอาจตรวจเจอยีนดื้อยาเร็วกว่านั้น ดังนั้นการตรวจด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งใช้เวลาสั้นกว่าวิธีมาตรฐานถึง 2-3 เท่า สามารถเปลี่ยนยาฆ่าเชื้อได้เร็วขึ้น 24-48 ชั่วโมง

ภาวะติดเชื้อทางเดินปัสสาวะเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข พบได้บ่อยในทุกกลุ่มอายุและยังมีปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็น ส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาตามมา จะเห็นได้ว่าพบเชื้อดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมเพิ่มขึ้นมาก อยู่ในระดับขั้นวิกฤต จากข้อมูล NARST 2020[19] พบว่าเชื้อ *E. coli* ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมพบเป็นร้อย 3 ส่วน *K. pneumoniae* พบว่าดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมร้อยละ 10

ดังนั้นเพื่อลดการใช้ยาฆ่าเชื้อแบบครอบคลุมชนิดกว้างโดยไม่จำเป็น หรือจำกัดการใช้ให้น้อยที่สุด เพื่อลดอัตราการดื้อยา โดยเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องมือในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคและการดื้อยาได้เร็วขึ้น จึงเป็นที่มาของการศึกษาในงานวิจัยนี้

จากการการศึกษาของ K.Schmidt และคณะ จากประเทศอังกฤษ[13] ได้ศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียและยีนดื้อยาโดยตรงจากปัสสาวะด้วยวิธี Nanopore sequencing หาสารพันธุกรรม เทียบกับวิธี Illumina พบว่าการใช้ nanopore sequencer สามารถตรวจพบยีนดื้อยาได้พอกันกับวิธี Illumina แต่มีบางส่วนที่ไม่สามารถวิเคราะห์หายีนดื้อยาได้เนื่องจาก มีสารพันธุกรรมที่น้อยเกินไป และบางส่วนมีการกลายพันธุ์ คล้ายการศึกษานี้ ที่บางส่วนหายีนดื้อยาไม่ได้เนื่องจากมีสารพันธุกรรมที่น้อยเกินไป สำหรับการวิเคราะห์หายีนดื้อยามีความตรงกันร้อยละ 90 ถ้าใช้วิธี ilumina และร้อยละ 80 ถ้าใช้วิธีนาโนพอร์ เนื่องจากมีการวินิจฉัยผิดพลาดของพลาสมิดแอมซี ซึ่งในการศึกษาฉบับนี้ให้ผลการศึกษาเป็นที่น่าพอใจกว่าคือพบความไวและความจำเพาะที่ร้อยละ 86.9 และ 93.3 เมื่อตัดตัวอย่างที่ดีเอ็นเอน้อยกว่า 1 qubit ng/mcl ออก แต่ถ้ารวมทั้งหมดทุกตัวอย่างจะได้ค่าความไวที่ลดลงคือร้อยละ 75 แต่ความจำเพาะยังคงสูงกว่าการศึกษาของ K.Schmidt คือร้อยละ 94

จากการศึกษาของ Prannita D. Tamma และคณะจากมหาวิทยาลัยจอนห์ฮอปกินส์ในปี 2018[14] ศึกษาการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *K. pneumoniae* เพื่อทำนายการดื้อยาของเชื้อโดยเทียบการเพาะเชื้อหาการดื้อยาโดยวิธีมาตรฐาน โดยใช้วิธี Real-time Nanopore analysis approach, assembly-based Nanopore approach และ Approach Using short-read correction of nanopore assemblies เทียบกับวิธีการเพาะเชื้อมาตรฐาน พบว่า ผล genotypic และ Antimicrobial susceptibility testing (AST) ตรงกัน 77% (30-100%) เมื่อใช้วิธี Real time Nanopore approach โดยวิธี Real-time Nanopore approach สามารถรายงานยีนดื้อยาจากการเพาะเชื้อได้ภายใน 8 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาฉบับนี้ที่ใช้ระยะเวลาในการตรวจพบเพียง 3.5(2.2-8.2) ชั่วโมงเท่านั้น

จากการศึกษาของ Prannita D. Tamma เป็นการใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* isolates ต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ K.Schmidt ซึ่งใช้เป็นเชื้อที่มาจากปัสสาวะโดยตรงใกล้เคียงกับการศึกษาฉบับนี้ ในการศึกษาของ K.Schmidt เลือกใช้แบคทีเรียจำนวนมากกว่า 10^7 cfu/ml เพื่อที่จะให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอ 1 microgram ซึ่งเพียงพอต่อการซีเควนซิ่งโดยเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์ ผลความไวของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์จากการศึกษานี้คือร้อยละ 80

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้เลือกใช้ตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บรวบรวมได้ของ ปัสสาวะที่ขึ้นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีที่ดื้อยาคาร์บาพีเนมทั้งหมดที่มี 28 ตัวอย่าง ซึ่งมีบางส่วนที่มีจำนวนแบคทีเรียที่น้อยกว่า 10^5 cfu/ml คิดเป็นร้อยละ 13 และจำนวนแบคทีเรียที่มากกว่า 10^5 cfu/ml คิดเป็นร้อยละ 87 ซึ่งพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่น้อยกว่า 10^5 cfu/ml สัมพันธ์กับการตรวจไม่พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนม ส่วนตัวอย่างที่พบยีนดื้อยาคาร์บาพีเนมส่วนใหญ่มักสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียที่มากกว่า 10^5 cfu/ml ขึ้นไป เนื่องจากมีตัวอย่างในการศึกษาที่เป็นกลุ่มเอ็นเทอ

โรแบคเทอเรียซีอีที่ดื้อยาคาร์บาพีเนมค่อนข้างน้อยจึงทำให้เลือกเข้ามาในการศึกษาทั้งหมด จึงทำให้มีบางส่วนที่มีจำนวนแบคทีเรียโคโลนีและดีเอ็นเอน้อย จึงทำให้ความไวน้อยลงตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้พบว่า เมื่อตัดปริมาณตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอน้อยออกไปแล้ว(น้อยกว่า 1 qubit ng/mcl) จะมีความไวและความจำเพาะที่มากกว่าการศึกษาก่อนคือร้อยละ 86.9 และ 93.3 ตามลำดับ

5.2 จุดแข็งของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่รวบรวมตัวอย่างแบบไปข้างหน้า (prospective study) ที่ทำวิจัยในปัสสาวะโดยตรง ไม่ผ่านการเพาะเชื้อ เทียบผลการดื้อยาคาร์บาพีเนมของเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีโดยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งกับวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐานในผู้ป่วยติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเป็นการศึกษาแรกที่ทำในประเทศไทย ใช้เวลาในการตรวจหายีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง Median 3.5 (2.2-8.2) ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการตรวจเจอยีนดื้อยาและการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นหลัก แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจหายีนดื้อยาวิธีนี้ใช้เวลาน้อยกว่าการตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐานซึ่งใช้เวลานานถึง 48-72 ชั่วโมง มุ่งหวังเพื่อที่ให้ยาปฏิชีวนะได้อย่างเหมาะสมตั้งแต่ขนานที่สองหรือสาม ลดการใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็น นำไปสู่การลดโอกาสเกิดเชื้อดื้อยา และภาวะแทรกซ้อนจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม

5.3 ข้อจำกัดในการวิจัย

จำนวนปัสสาวะตัวอย่างที่เป็นเชื้อเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีค่อนข้างน้อยเกินไป เนื่องจาก

1. เป็นการศึกษาภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพียงแห่งเดียว
2. สถานการณ์โควิดส่งผลให้มีจำนวนเคสผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ลดลงไปด้วย
3. การเก็บตัวอย่างปัสสาวะค่อนข้างมีขีดจำกัดเนื่องจาก ผู้ป่วยมักได้ยาปฏิชีวนะไปก่อนแล้ว อาจทำให้เพาะเชื้อไม่ขึ้น หรือปริมาณเชื้อลดลงไปมาก
4. ดีเอ็นเอน้อยเกินไปทำให้ไม่สามารถตรวจเจอยีนดื้อยาในตัวอย่างปัสสาวะได้
5. เชื้อก่อโรคในทางเดินปัสสาวะส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อ *E. coli* มากที่สุด ซึ่งพบว่าอัตราการดื้อยาคาร์บาพีเนมต่ำกว่าเชื้อ *K. pneumoniae*
6. เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์และโฟล์เซลล์ สามารถใช้ได้กับตัวอย่างปัสสาวะเพียง 12 ตัวอย่างเท่านั้น ถ้าเก็บในอุณหภูมิไม่เหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพการใช้งานของโฟล์เซลล์ลดลง นอกจากนี้ยังไม่มีวางจำหน่ายในประเทศไทย ต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้นปัจจุบันราคาของโฟล์เซลล์ยังค่อนข้างสูงมาก

7. ถ้ามีระบบเซิร์ฟเวอร์จะสามารถทำให้วิเคราะห์ผลข้อมูลเกี่ยวกับยีนดื้อยาได้ไวมากขึ้น
8. ต้องอาศัยความชำนาญในการสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ความรู้ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (*Bioinformatics*) นำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย

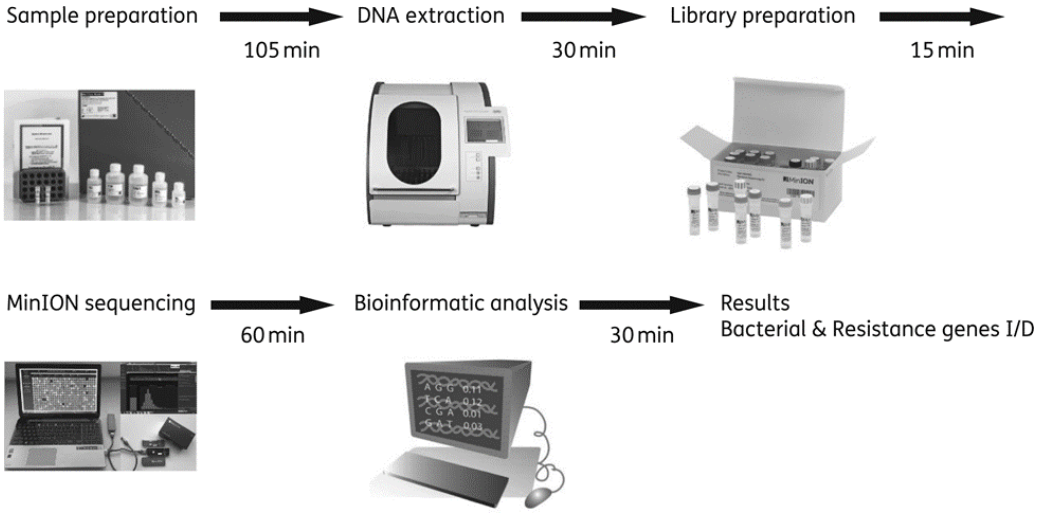
5.4 สรุปผล

การตรวจหายีนดื้อยาคาร์บาพีเนมของเชื้อในกลุ่มเอ็นเทอโรแบคเทอเรียซีอีด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่งมีความไวและความจำเพาะที่สูง เมื่อเทียบกับการตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อตามมาตรฐานในผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โดยสามารถลดระยะเวลาในการตรวจเจอเชื้อก่อโรคและยีนดื้อยาได้ เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมและลดโอกาสดื้อยาในอนาคตได้

นอกจากนี้จำนวนดีเอ็นเอที่น้อยอาจจะทำให้คุณภาพในการตรวจพบยีนดื้อยาน้อยลงไปด้วย ในการศึกษาต่อไปควรเพิ่มตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มค่าความไวและความจำเพาะ รวมถึงคุณภาพของการตรวจพบยีนดื้อยา เช่น พัฒนา Pipeline เป็นต้น

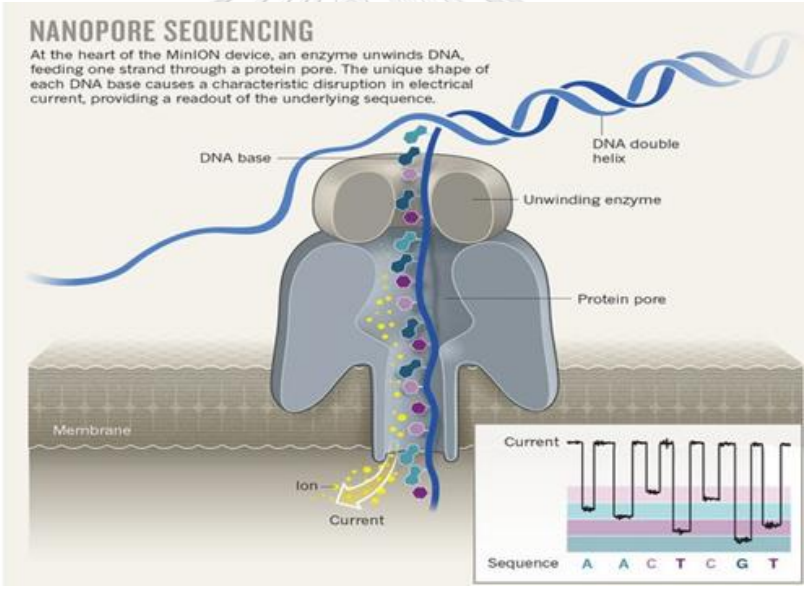
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 5 แสดงเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์



ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนและระยะเวลาในกระบวนการตรวจหายีนดื้อยาด้วยวิธีนาโนพอร์ซีเควนซิ่ง

(อ้างอิงจาก *J Antimicrob Chemother*, Volume 72, Issue 1, January 2017, Pages 104–114, https://doi.org/10.1093/jac/dkw397) [13]



ภาพที่ 7 แสดงหลักการทำงานของเครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์

เครื่องมือนาโนพอร์ซีเควนเซอร์เป็นเครื่องมือยุคใหม่ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

บรรณานุกรม

1. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(2):223-32.
2. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, and Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):432-8.
3. ประสิทธิ์และคณะ. Escape the ESKAPE : Gram negative bacteria devils. Update in infectious diseases 2019.
4. Rodríguez-Baño J, Navarro MD. Extended-spectrum beta-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:104-10.
5. Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;63(2):217-22.
6. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Inappropriate use of carbapenems in Thailand: a need for better education on de-escalation therapy. Clin Infect Dis. 2008;47(6):858-9.
7. National Naitmicrobial Resistance Surveillance Center TN. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE [Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/.
8. ณัชชา แซ่เตียว ชส. ความถูกต้องแม่นยำของแรปิดเทสคาร์บาพีเนมในการตรวจหาแบคทีเรียเคล็บซีลล่านิวโมเนียอีที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 2560.
9. JDSaP B. Urinary tract infection. In: Bennett JE, editor. Mandell Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Ninth ed.
10. Linsay E. Nicolle KG, SUzanne F. Bradley, Reed Siemieniuk. Clinical Practice Guideline for the Management of Asymptomatic Bacteriuria 2019 Update. Infectious Diseases Society of America. 2019.
11. Golparian D, Donà V, Sánchez-Busó L, Foerster S, Harris S, Endimiani A, et al. Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of Neisseria

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

gonorrhoeae isolates using the Oxford Nanopore MinION sequencer. Sci Rep. 2018;8(1):17596.

12. Charalampous T, Kay GL, Richardson H, Aydin A, Baldan R, Jeanes C, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. Nat Biotechnol. 2019;37(7):783-92.
13. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, Doumith M, Munroe D, Pires C, et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. J Antimicrob Chemother. 2017;72(1):104-14.
14. Tamma PD, Fan Y, Bergman Y, Pertea G, Kazmi AQ, Lewis S, et al. Applying Rapid Whole-Genome Sequencing To Predict Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Results among Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(1).
15. Niu H, Zhang W, Wei L, Liu M, Liu H, Zhao C, et al. Rapid Nanopore Assay for Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae. Front Microbiol. 2019;10:1672.
16. software Me-t-us. Diagnostic test evaluation calculator 2021 [updated 2021. Available from: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php.
17. Ohad S, Block C, Kravitz V, Farber A, Pilo S, Breuer R, et al. Rapid identification of Enterobacter hormaechei and Enterobacter cloacae genetic cluster III. J Appl Microbiol. 2014;116(5):1315-21.
18. Maghini DG, Moss EL, Vance SE, and Bhatt AS. Improved high-molecular-weight DNA extraction, nanopore sequencing and metagenomic assembly from the human gut microbiome. Nature protocols. 2021;16(1):458-71.
19. Thailand N. antimicrobial resistance 2020 [Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th/data/AMR%202000-2020-06M.pdf.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปัณณพร ทองสุก
วัน เดือน ปี เกิด	31 มีนาคม 2529
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก
ที่อยู่ปัจจุบัน	4/2 ม.7 ต.คุยบ้านโอง อ.พรานกระต่าย จ.กำแพงเพชร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY