การเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) กับการเพาะเชื้อในการวิเคราะห์แยกเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง

นายกิตติศักดิ์ ตั้งจิตตรง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

COMPARISON BETWEEN USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND CULTURE FOR DETECTION OF CAUSATIVE BACTERIA IN PERITONEAL DIALYSIS (PD) PATIENTS WITH PERITONITIS

Mr. Kittisak Tangjittrong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) กับการเพาะเชื้อในการวิเคราะห์แยกเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง
โดย	นายกิตติศักดิ์ ตั้งจิตตรง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤกษาดี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤกษาดี)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ธัญญพงษ์ ณ นคร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(แพทย์หญิง ปิยะธิดา จึงสมาน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กิตติศักดิ์ ตั้งจิตตรง : การเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) กับการเพาะเชื้อในการวิเคราะห์แยกเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง. (COMPARISON BETWEEN USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND CULTURE FOR DETECTION OF CAUSATIVE BACTERIA IN PERITONEAL DIALYSIS (PD) PATIENTS WITH PERITONITIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤกษาดี, 67 หน้า.

ที่มา: การติดเชื้อในช่องท้องเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องและการตรวจวินิจฉัยคือการนำน้ำยาล้างช่องท้องมาเพาะเชื้อซึ่งเป็นการตรวจที่มาตรฐานโดยใช้เวลาอย่างน้อย 3 วันในการระบุเชื้อ อย่างไรก็ตามบางครั้งเชื้อเจริญเติบโตยากทำให้เพาะเชื้อไม่ขึ้น จึงมีการศึกษาในต่างประเทศถึงการใช้ PCR มาช่วยในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย

วิธีการศึกษา: การศึกษานี้เป็นการศึกษาสหสถาบันในโรงพยาบาลทั้งหมด 5 แห่ง ระยะเวลาดำเนินการศึกษา 6 เดือน ในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง โดยนำน้ำยาล้างช่องท้องมาตรวจเพาะเชื้อแบคทีเรียและ PCR

ผลการศึกษา: มีผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 146 ราย อายุเฉลี่ย 59 ปี ส่วนใหญ่เป็นเพศชายร้อยละ 51.4 สาเหตุของโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายที่พบมากที่สุด คือ ความดันโลหิตสูงร้อยละ 47.9 สาเหตุรองลงไป คือ เบาหวาน ผู้ป่วยทุกคนมีน้ำยาขุ่นและเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำยาล้างช่องท้องเฉลี่ยเท่ากับ 3,881±4,459 เซลล์/มล. ผลเพาะเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 65.8 เพาะเชื้อไม่ขึ้นพบร้อยละ 25.4 เมื่อนำน้ำยามาตรวจ real time PCR พบว่ามี sensitivity ร้อยละ 77 specificity ร้อยละ 70.3 positive predictive value ร้อยละ 88.4 และ negative predictive value ร้อยละ 51 สามารถเพิ่มความไวจากการเพาะเชื้ออีกคิดเป็นร้อยละ 29.7 อย่างไรก็ตามผลการตรวจขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอ การเลือกใช้ primer และการปนเปื้อนระหว่างขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและ PCR ได้

สรุปผลการศึกษา: การตรวจด้วยวิธี real time PCR เพื่อวิเคราะห์แยกเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องยังไม่สามารถนำมาใช้เสริมหรือทดแทนการเพาะเชื้อซึ่งเป็นมาตรฐานในประเทศไทยได้ ยังต้องมีการศึกษาการใช้ 16S rDNA เพื่อพัฒนาต่อไปในอนาคต

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5574107630 : MAJOR MEDICINE
KEYWORDS: REAL TIME PCR / 16S RDNA / BACTERIAL PERITONITIS / CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIALYSIS

KITTISAK TANGJITTRONG: COMPARISON BETWEEN USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND CULTURE FOR DETECTION OF CAUSATIVE BACTERIA IN PERITONEAL DIALYSIS (PD) PATIENTS WITH PERITONITIS. ADVISOR: ASSOC. PROF. TALERNGSAK KANJANABUCH, M.D., CO-ADVISOR: SUPAPORN WACHARAPLUESADEE, Ph.D., 67 pp.

Background: Peritonitis is one of the most common complications of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and conventional culture takes at least 3 days to provide the final identification and there were small numbers of bacteria or fastidious bacteria in the CAPD fluid. Quantitative bacterial DNA PCR assays may also complement culture methods in the diagnosis of CAPD peritonitis.

Material and methods: A multicenter, diagnostic cross-sectional non-randomized study was conducted in 5 PD centers in Thailand. Peritoneal dialysis (PD) fluid were collected from peritonitis patients by sterile technique and then identify causative pathogen with conventional culture method and PCR method.

Results: 146 patients (mean age, 59 years) with PD-related peritonitis were enrolled and peritoneal dialysis fluid were collected, 51.4% were male, 47.9.% of patients ESRD from hypertension and 40.4% from diabetes nephropathy. All of patients came with cloudy effluent and PD fluid white blood cells mean 3,881±4,459 cells/ml. 65.8% were bacterial peritonitis. 25.4% were culture-negative peritonitis. Real time PCR assays were done in all of patients. Sensitivity was 77%, specificity was 70.3%, positive predictive value was 88.4% and negative predictive value was 51%. Real time PCR increase sensitivity add on conventional culture 29.7%. Nevertheless the results may be depend on DNA extraction method, 16S rDNA primer pair and contamination during process of DNA extraction and PCR method.

Conclusion: Real time PCR assays not yet complement culture methods in the diagnosis of CAPD peritonitis. The use of 16S rDNA needs further study and improve sensitivity.

Department: Medicine	Student's Signature .....
Field of Study: Medicine	Advisor's Signature .....
Academic Year: 2013	Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

1) รองศาสตราจารย์นายแพทย์เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ให้คำปรึกษาในการทำงานแก่ผู้วิจัยตลอดมา จนงานต่างๆสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

2) ศาสตราจารย์นายแพทย์สมชาย เอี่ยมอ่องและรองศาสตราจารย์นายแพทย์เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ซึ่งกรุณาติดตามและสนับสนุนการดำเนินการวิจัยอย่างต่อเนื่อง

3) อาจารย์แพทย์หญิงปิยะธิดา จึงสมาน สำหรับคำแนะนำและความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งความกรุณาที่มีต่อผู้วิจัยอย่างสม่ำเสมอตลอดมา

4) แพทย์ผู้เชี่ยวชาญ พยาบาลผู้ประสานงานและเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ในโรงพยาบาลทั้ง 5 แห่งซึ่งเข้าร่วมการวิจัย อันได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โรงพยาบาลบ้านแพ้วองค์กรมหาชน (พร้อมมิตร) โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ.อุบลราชธานี โรงพยาบาลพิจิตรและโรงพยาบาลพระพุทธบาท จ.สระบุรี สำหรับความมุ่งมั่นและตั้งใจดำเนินการวิจัยร่วมกันเพื่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องอย่างต่อเนื่องในประเทศของเรา

5) คณาจารย์ในหน่วยโรคไตทุกท่าน สำหรับความเอาใจใส่และสนับสนุนการดำเนินการวิจัยอย่างต่อเนื่อง

6) ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว สำหรับความเข้าใจ กำลังใจ และการสนับสนุนทั้งในด้านการเรียนและการทำงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

สารบัญแผนภูมิ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale) 1

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question) 2

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective) 3

1.4 สมมติฐาน (Hypothesis) 3

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework) 3

1.6 วิธีดำเนินการวิจัย 3

1.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations) 4

1.8 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation) 4

1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application) 4

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 เยื่อบุช่องท้อง (Peritoneum) 5

2.2 สาเหตุของเยื่อบุช่องท้องอักเสบในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้อง 7

2.3 อาการและอาการแสดงทางคลินิกการติดเชื้อช่องท้อง 8

2.4 นิยามของภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ 9

2.5 เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะช่องท้องติดเชื้อ 9

2.6 วิธีส่งตรวจน้ำยาล้างช่องท้อง[4] 14

2.7 การรักษาภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ 23

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย (Procedure) 35

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design) 35

หน้า

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology) 35
3.3 คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational definitions) 36
3.4 การดำเนินการวิจัย 37
3.5 การรวบรวมข้อมูล)Data collection(..... 43
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล)Data Analysis(..... 44
บทที่ 4 ผลของการวิจัย 45
4.1 ผู้ที่เข้าร่วมการศึกษา 45
4.2 ข้อมูลของผู้ป่วยทั้งหมด 45
บทที่ 5 การอภิปรายผล (Discussion) 52
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย (Conclusion) 55
รายการอ้างอิง 56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของยาปฏิชีวนะสำหรับบริหารทางช่องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องด้วยตนเอง 32
ตารางที่ 2 แสดงขนาดของยาปฏิชีวนะที่บริหารทางช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องด้วยเครื่องอัตโนมัติ 33
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยทั้งหมด 45
ตารางที่ 4 แสดงผลเพาะเชื้อทั้งหมด 46
ตารางที่ 5 แสดงผลเพาะเชื้อที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย 47
ตารางที่ 6 แสดงผลเพาะเชื้อที่เป็นเชื้อรา 47
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลผลการรักษาของผู้ป่วยทั้งหมด 48
ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจด้วย real time PCR 49
ตารางที่ 9 แสดงผลการตรวจด้วย real time PCR เฉพาะเชื้อแบคทีเรีย 49
ตารางที่ 10 แสดงกลุ่มที่ real time PCR ได้ผลบวกและพบเชื้อแบคทีเรีย 50
ตารางที่ 11 แสดงกลุ่มที่ real time PCR ได้ผลลบแต่เพาะเชื้อพบเชื้อแบคทีเรีย 51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงหลักการการตรวจโดยใช้ β-D-Glucan 17
รูปที่ 2 แสดงจำนวนของ product ที่เกิดจาก PCR เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประยะเวลาหนึ่ง 20
รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจเซลล์ 39
รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจเพาะเชื้อ 39
รูปที่ 5 แสดง product DNA และจำนวนรอบ จากการทำ PCR 42
รูปที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ Melting curve analysis 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย 3
แผนภูมิที่ 2 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อกลุ่ม *Enterococcus* และ *Streptococcus* spp 26
แผนภูมิที่ 3 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อจาก *Staphylococcus aureus* 27
แผนภูมิที่ 4 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ 29
แผนภูมิที่ 5 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อชนิดเพาะไม่ขึ้นเชื้อ 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

โรคไตเรื้อรังเป็นภาวะที่การทำงานไตลดลง ทำให้ร่างกายมีความบกพร่องในการขับของเสียออกจากร่างกายความสามารถในการควบคุมสมดุลน้ำและเกลือแร่ หน้าที่ในการสร้างฮอร์โมนและเอนไซม์ต่างๆ โรคไตเรื้อรังจึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ การดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง มีวัตถุประสงค์เพื่อชะลอการดำเนินโรคให้ไปสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายและป้องกันภาวะแทรกซ้อนทางหัวใจและหลอดเลือดที่เกิดจากการคั่งของของเสียและน้ำส่วนเกินในร่างกาย ในปัจจุบันผู้ป่วยไตวายมีจำนวนมากขึ้น การดูแลรักษาผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย คือการบำบัดทดแทนไต โดยมีการรักษาอยู่ 3 วิธีได้แก่ การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis; HD) การล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis; PD) และการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation; KT) จากข้อมูลของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทยของ Thailand Renal Replacement Therapy (TRT) ประจำปี 2551 พบว่าหลังจากคณะรัฐมนตรีมีมติเมื่อวันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2550 ให้การบริการทดแทนไตสำหรับผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายอยู่ในสิทธิประโยชน์ของระบบหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า ทำให้ผู้ป่วยโรคไตเข้าถึงการรักษาได้ทั่วถึงมากขึ้น ภายหลังการประกาศใช้นโยบาย “พีดี-เฟิร์สท์” สนับสนุนให้ผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเลือกการล้างไตทางช่องท้องเป็นวิธีแรกก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยที่ล้างไตทางช่องท้องและศูนย์บริการล้างไตทางช่องท้องอย่างมาก ในประเทศไทยมีผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่บำบัดทดแทนไตด้วยการล้างไตทางช่องท้องในประเทศไทย เกือบ 3,000 ราย ภายใน 1 ปี[1] และจากรายงานของนพ.ทวี วงศ์ศิริ[2] พบว่า มีจำนวนผู้ป่วยสะสมที่ 3 ปี เท่ากับ 10,031 คน แต่สามารถล้างไตทางช่องท้องต่อได้เพียง 3 ใน 4 สาเหตุหลักของการสิ้นสุดการล้างไตทางช่องท้องเกิดจากการติดเชื้อ โดยเฉพาะการติดเชื้อที่สัมพันธ์กับการล้างไตทางช่องท้อง (peritonitis, exit-site infection) การติดเชื้อรุนแรงในช่องท้องเป็นระยะเวลานานส่งผลให้สูญเสียหน้าที่ของผนังช่องท้อง (peritoneal membrane) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การล้างไตทางช่องท้องล้มเหลวและต้องเปลี่ยนวิธีการบำบัดทดแทนไตเป็นวิธีอื่น จากการสำรวจในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีอุบัติการณ์ช่องท้องอักเสบเท่ากับ 0.47 ครั้งต่อรายต่อปีหรือ 1 ครั้งทุก 25.5 เดือน ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดยคณะทำงานทวิภาคีเอเชีย-แปซิฟิก[3] (Asia-Pacific Key Performance Indicators: KPIs) ที่ไม่เกิน 0.30 ครั้งต่อปี หรือไม่บ่อยกว่า 40 เดือนต่อครั้ง และมีศูนย์ล้างไตทางช่องท้องถึง 23 ศูนย์ (ร้อยละ 24 ของทั้งหมด) ที่มีอุบัติการณ์สูงกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำที่กำหนดโดยสมาคมล้างไตทางช่องท้องโลก International Society For Peritoneal Dialysis (ISPD) พ.ศ. 2553[4] คือต้องมีอัตราการติดเชื้อไม่เกิน 0.67 ครั้งต่อรายต่อปี หรือไม่บ่อยกว่า 1 ครั้งต่อ 18 เดือน และจากการศึกษาของ นพ.เถลิงศักดิ์และคณะ ซึ่งทำการรวบรวมอุบัติการณ์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุของภาวะช่องท้องอักเสบของผู้ป่วยในประเทศไทยและรายงานเมื่อ พ.ศ. 2554 พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 8,201 เพาะไม่ขึ้นเชื้อร้อยละ 34.5[5] นอกจากนี้การศึกษาของ Magid และคณะ[6] ได้ศึกษาผู้ป่วยไตวายที่ล้างไตทางช่องท้องแล้วติดเชื้อในช่องท้องในประเทศออสเตรเลีย เป็นระยะเวลา 3 ปี พบว่ามีผู้ติดเชื้อทั้งหมด 4,675 ราย โดยมีการติดเชื้อ 435 ครั้งในผู้ป่วยที่ผลเพาะเชื้อ

ไม่ขึ้นจำนวน 361 ราย หรือคิดเป็น 0.07 ครั้งต่อคนต่อปี ในจำนวนนี้ต้องเอาสายออกร้อยละ 12 ต้องเปลี่ยนวิธีเป็นการฟอกเลือดร้อยละ 10 และเสียชีวิตร้อยละ 1 สะท้อนให้เห็นถึงปัญหาด้านคุณภาพของการล้างไตทางช่องท้องและเทคนิคการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจ ซึ่งสาเหตุที่ผลการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจไม่ขึ้น อาจเกิดจากปริมาณน้ำในช่องท้องที่ส่งตรวจมีปริมาณน้อย วิธีการเก็บส่งตรวจไม่ได้มาตรฐาน ปริมาณเชื้อน้อยเกินไป ตัวเชื้อเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตยาก (fastidious microorganism) ซึ่งต้องการอาหารและสภาวะพิเศษในการเจริญเติบโตหรือใช้เวลาเจริญนานกว่าปกติและปัญหาของข้อจำกัดของวิธีการตรวจในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก เชื้อกลุ่มเหล่านี้ได้แก่ ไมโคแบคทีเรีย *Leptospira*, *Rickettsia* เป็นต้น หรือเคยได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน เป็นต้น อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อด้วยวิธีอื่นกับการเพาะเชื้อซึ่งเป็นการตรวจมาตรฐาน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีขึ้นเพื่อหาวิธีการค้นหาเชื้อจุลชีพก่อโรคในน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง โดยคาดหวังว่าจะช่วยวินิจฉัยชนิดของเชื้อก่อโรคได้ นำไปสู่การลดการเสื่อมของผนังหน้าท้อง ผู้ป่วยสามารถใช้การบำบัดทดแทนไตทางหน้าท้องได้ยาวนานขึ้น ลดอัตราการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ตลอดจนลดอัตราการเสียชีวิตและงบประมาณ ซึ่งเป็นการช่วยเสริมนโยบายของรัฐบาลในการปรับปรุงคุณภาพชีวิตผู้ป่วย และพัฒนาคุณภาพการล้างไตทางช่องท้องของประเทศให้มีมาตรฐานสูงขึ้น

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาว่าหากมีวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมกว่าการเพาะเชื้อมาช่วยในการวินิจฉัย ได้แก่ วิธีการตรวจทางอณูชีววิทยา (molecular technique) โดยการตรวจหาดีเอ็นเอ เช่น การตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ก็จะสามารถที่จะระบุเชื้อแบคทีเรียได้ต่อไป จากการศึกษาของ Kim และคณะ[7] ได้ศึกษาการใช้ broad range PCR ในการตรวจแบคทีเรียตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนกันยายนปี พ.ศ. 2552 จากน้ำล้างไตทางช่องท้องที่ฉีดลงไปในขวดเพาะเชื้อ 100 ตัวอย่าง พบว่า 53 ตัวอย่างเพาะเชื้อขึ้นและ PCR ได้ผลบวก มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่ PCR ได้ผลบวกเป็นเชื้อ *Bacillus cirlucans* ส่วนกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่ขึ้นและ PCR ได้ผลลบมี 44 ตัวอย่าง และมีเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่ผลเพาะเชื้อขึ้นแต่ PCR ได้ผลลบ ได้แก่ *Candida albicans* นอกจากนี้ PCR ยังสามารถระบุ species ของเชื้อได้โดยใช้ 16S rDNA sequencing ในปัจจุบัน 16S rDNA นำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคระดับงานวิจัยค่อนข้างมาก แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาตรวจน้ำช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในไทยมาก่อน ดังนั้นก็สามารถนำไปเป็นค่าอ้างอิงและนำไปสู่การตรวจที่จำเป็นในอนาคต รวมทั้งนำไปสู่การรักษาที่จำเพาะต่อไปในภายหน้า

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (Primary research question)

การใช้วิธีการตรวจด้วย PCR เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องให้ความไวและความจำเพาะเป็นอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

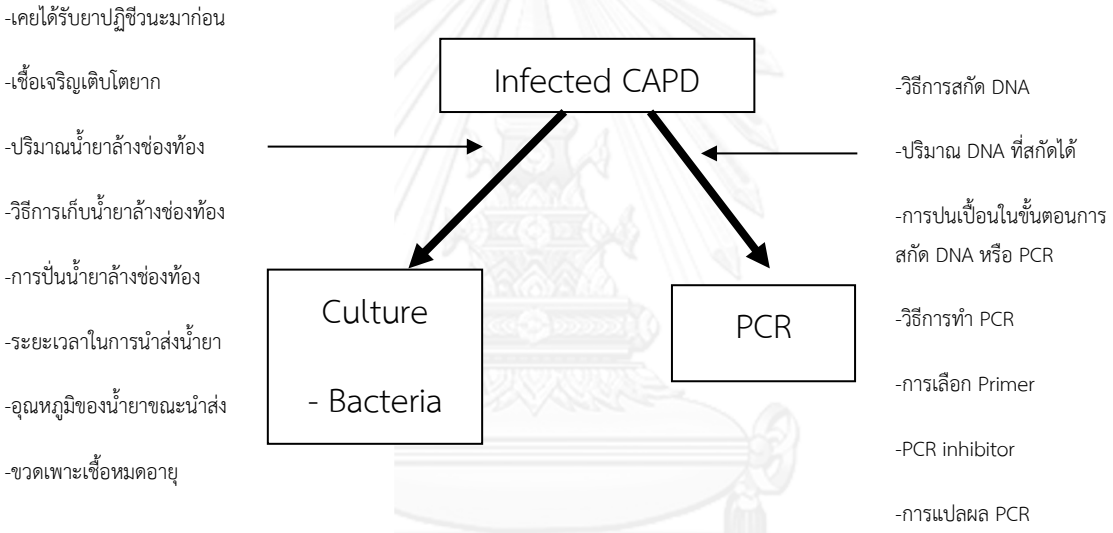
เพื่อนำผลการตรวจด้วย PCR ไปใช้ในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง

1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)

การใช้วิธีการตรวจด้วย PCR สามารถวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องได้

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)

แผนภูมที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.6 วิธีดำเนินการวิจัย

1.6.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเป็น diagnostic test interventional study

1.6.2 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1) รวบรวมข้อมูลผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องจาก 5 โรงพยาบาล ดังต่อไปนี้ คือ

ก. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร
ข. โรงพยาบาลบ้านแพ้ว องค์การมหาชน สาขาพร้อมมิตร กรุงเทพมหานคร
ค. โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ.อุบลราชธานี
ง. โรงพยาบาลพิจิตร จ.พิจิตร
จ. โรงพยาบาลพระพุทธบาท จ.สระบุรี

โดยเก็บข้อมูลทั่วไป ได้แก่ อายุ, เพศ ประวัติการติดเชื้อในช่องท้อง ประวัติการได้ยา

ปฏิชีวนะ การตอบสนองต่อการรักษา

2) เก็บน้ำยาในช่องท้องในผู้ป่วยที่ติดเชื้อส่งตรวจ PCR ห้อง lab โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3) นำผล PCR มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

1.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations)

1.7.1 หลักการเคารพในความเป็นบุคคล โดยผู้เข้าร่วมวิจัยได้รับข้อมูล สามารถเข้าใจข้อมูลที่ได้รับอย่างสมบูรณ์และเพียงพอสำหรับการตัดสินใจ และตัดสินใจเข้าร่วมด้วยความสมัครใจ และข้อมูลที่ได้มีการรักษาเป็นความลับ

1.7.2 หลักคุณประโยชน์และเว้นการก่อโทษ ผู้เข้าร่วมวิจัยจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ และอาจเกิดความเสี่ยงต่อตัวผู้เข้าร่วมวิจัยเพียงเล็กน้อย คือความลับของผู้ป่วยอาจถูกเปิดเผย แต่ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้ป่วยโดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย ข้อมูลส่วนใหญ่เป็นข้อมูลการติดเชื้อของน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง

1.7.3 หลักความยุติธรรม มีกระบวนการคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัย มีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน โดยผู้เข้าร่วมวิจัยเป็นผู้ที่ติดเชื้อในช่องท้องซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีโอกาสได้รับประโยชน์จากงานวิจัย

1.8 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

1.8.1 วิธีการเก็บน้ำส่งตรวจต่างวิธีกัน

1.8.2 การนำส่งสารตัวอย่างมาที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application)

1.9.1 ทราบผลการตรวจโดยใช้ PCR

1.9 2 สามารถนำผลการศึกษาไปอ้างอิง และนำไปสู่การตรวจที่จำเป็นในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การล้างไตทางช่องท้องในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย หลักการรักษาคือการนำของเสียและน้ำออกจากร่างกายผู้ป่วยโดยวิธีการซึมผ่าน (diffusion) ขบวนการพา (convection) และการดูดซึมกลับ (reabsorption) ซึ่งอาศัยเยื่อบุผนังช่องท้องเป็นเยื่อเลือกผ่าน[8]

ก. การซึมผ่าน (diffusion) เป็นการแพร่ของของเสียและโพแทสเซียมจากเลือดซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าผ่านเยื่อบุผนังช่องท้องออกไปยังน้ำยาล้างช่องท้องซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่า

ข. ขบวนการพา (convection) เป็นการเคลื่อนที่ของน้ำและ solute โดยอาศัยแรงดึงน้ำของสาร osmotic agent ที่มีความเข้มข้นสูงในน้ำยาล้างช่องท้องเรียก ultrafiltration

ค. การดูดซึมกลับ (reabsorption) เป็นการดูดซึมน้ำและ solute จากน้ำยาล้างช่องท้องในช่องท้องคืนสู่หลอดเลือดผ่านทางท่อน้ำเหลือง

โดยน้ำยาล้างไตจะถูกใส่เข้าไปในช่องท้อง เยื่อบุผนังช่องท้องจะทำหน้าที่กรองของเสียและของเหลวออกจากเลือดไปสู่น้ำยาล้างไต หลังจากนั้น 2-3 ชั่วโมง น้ำยาล้างไตที่มีของเสียอยู่จะถูกปล่อยออกจากช่องท้องและถูกแทนที่ด้วยน้ำยาใหม่ที่เติมเข้าไป ดังนั้นน้ำยาล้างช่องท้องที่ใช้ควรมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสมา แต่ไม่มีสารที่ต้องการฟอกออกจากตัวผู้ป่วยเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ยูเรีย ครีอะตินิน กรดยูริค โพแทสเซียม และของเสีย และมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสซึ่งทำหน้าที่ดึงน้ำออกจากร่างกายผู้ป่วย ในช่องท้องมีโครงสร้างที่สำคัญดังนี้

2.1 เยื่อบุช่องท้อง (Peritoneum)

โครงสร้างในช่องท้อง (peritoneal cavity) มีพื้นที่ประมาณ 1-2 ตารางเมตร แบ่งเป็นพื้นที่ 2 ส่วนเชื่อมต่อกันเป็นผืนแผ่นเดียวกันทั่วทั้งท้อง[9-11] ได้แก่

2.1.1 Parietal peritoneum เป็นส่วนที่อยู่ชิดกับผนังหน้าท้อง คิดเป็นพื้นที่ร้อยละ 10-20 มีความสำคัญต่อการแลกเปลี่ยนสสารและน้ำมากกว่า visceral peritoneum

2.1.2 Visceral peritoneum เป็นส่วนที่คลุมอวัยวะต่างๆในช่องท้อง เช่น กระเพาะอาหาร ม้าม ตับ และลำไส้ คิดเป็นพื้นที่ร้อยละ 80-90 แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1) ส่วนที่ตรึงอวัยวะต่างๆภายในช่องท้องไว้กับผนังช่องท้องด้านหลังเรียกมีเซนเทอรี (mesentery)

2) ส่วนที่เชื่อมอวัยวะต่างๆภายในช่องท้องเข้าด้วยกัน เรียกว่า omentum

3) ส่วนที่หุ้มล้อมรอบอวัยวะภายในช่องท้อง มีสัดส่วนของพื้นที่มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 60

2.1.3 Peritoneal membrane ประกอบด้วยเนื้อเยื่อต่างๆที่มีความสำคัญต่อการแลกเปลี่ยนสสารและน้ำเมื่อล้างไตทางช่องท้อง คือ mesothelium, interstitium, vascular microcirculation และ visceral lymphatic system

1) Mesothelium[12-14] เป็นเยื่อบุช่องท้องชั้นนอกสุดที่สัมผัสกับน้ำยา dialysisประกอบด้วย simple squamous epithelium cell เรียงตัวต่อเนื่องกันบนชั้น basement membrane โดยแต่ละเซลล์เชื่อมติดกันด้วย tight junction ยกเว้นผิวด้านล่างของกะบังลมและบริเวณเหนือต่อกลุ่มก้อนเซลล์เม็ดเลือดขาว (milk spot) ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์และ basement membrane เรียกว่า stroma ซึ่งเป็นทางผ่านของน้ำและสสารต่างๆ mesothelial cell ที่บุ visceral peritoneum มีผนังเซลล์งอกยื่นออกไปเรียก microvilli ทำหน้าที่เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการแลกเปลี่ยนสสารและน้ำของเยื่อบุผนังช่องท้อง และมีส่วนของผนังเซลล์ที่หวำเข้ามาเป็นช่องทางผ่านเข้าออกของสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เรียก vesicle mesothelial cell ทำหน้าที่สร้างและขับสารหลายชนิดในการเกิดการอักเสบติดเชื้อและป้องกันการเกิดพังผืดภายในช่องท้อง รวมทั้งสารหล่อลื่นซึ่งช่วยลดการเสียดสีระหว่างเยื่อบุผนังช่องท้องกับการบีบตัวของลำไส้

2) Interstitium ประกอบด้วย fibroblast, macrophage, mast cell, หลอดเลือด, หลอดน้ำเหลืองและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ฝังรวมกันอยู่ใน amorphous substance ที่มีของเหลวคุณสมบัติแตกต่างกัน

3) Blood vessel[15, 16] โดย visceral peritoneum รับเลือดจากหลอดเลือดแดงมีเซนเทอริก(Mesenteric vessels) ซึ่งนำเลือดมาเลี้ยงอวัยวะภายในช่องท้อง ส่วน parietal peritoneum รับเลือดจากหลอดเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อผนังหน้าท้อง โดยหลอดเลือดนี้จะให้แขนงเส้นเลือดแดงขนาดเล็ก (arteriole) เชื่อมต่อกับร่างแหเส้นเลือดฝอย (capillary network) เพื่อนำเลือดไปแลกปลี่ยนกับน้ำยาล้างช่องท้องก่อนนำกลับคืนกระแสเลือดอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมี peritoneal capillaries ซึ่งมีโครงสร้างที่ยอมให้สารเลือกผ่านได้ในขนาดที่ต่างกัน ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ชนิด[17-19] ได้แก่

ก. Large pores มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200-400 อังสตรอม พบน้อยกว่าร้อยละ 0.01 สามารถให้สารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ผ่านได้

ข. Small pores มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-65 อังสตรอม พบร้อยละ 98 ไม่ยอมให้สารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าอัลบูมินผ่าน มีความสำคัญต่อการขจัดน้ำและการซึมผ่านของ small solute

ค. Ultrasmall poresมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 อังสตรอม สามารถยอมให้ผ่านเท่านั้นพบร้อยละ 2

4) Lymphatic system ท่อน้ำเหลืองทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและ solute ต่างๆในบริเวณ

เนื้อเยื่อ interstitium และในช่องท้องกลับสู่กระแสเลือด ระบบน้ำเหลืองมีบทบาทในการควบคุมปริมาตรน้ำในช่องท้องให้คงที่เฉลี่ย 100 มิลลิลิตร และป้องกันเนื้อเยื่อ interstitium ไม่ให้บวมจากการไหลออกของน้ำและ solute ในหลอดเลือดฝอย และการไหลเข้าของน้ำยาล้างช่องท้องในช่องท้อง

2.2 สาเหตุของเยื่อบุช่องท้องอักเสบในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้อง

แบ่งสาเหตุของเยื่อบุช่องท้องอักเสบออกได้เป็นการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อและการอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ

2.2.1 สาเหตุของภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ(20)

เชื้อโรคสามารถแพร่เข้าสู่ช่องท้องได้หลายวิธี แต่ละวิธีเกิดจากเชื้อโรคแต่ละชนิด ดังนั้น การทราบชนิดของเชื้อก่อเหตุ อาจทำให้ค้นพบและช่วยแก้ไขสาเหตุของการติดเชื้อ เพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำ กลไกการติดเชื้อมีได้หลายทาง ได้แก่ [21]

ก. Intraluminal route (Touch contamination) เกิดจากการปนเปื้อนเชื้อโรคขณะทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำยาล้างช่องท้องหรือสาย transfer ดังนั้นเชื้อก่อโรคจึงเป็นเชื้อที่อาศัยตามผิวหนังผู้ป่วย ได้แก่ coagulase negative *Staphylococcus*, *Diptheroid* spp., *Corynebacterium* spp. และ *Bacillus* spp. ผู้ป่วยบางรายที่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือนอนรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานานอาจพบเชื้อราและเชื้อ *Acinetobacter baumanii* ได้ อาจพบเชื้อ *Pasteurella maltocida* และ *Capnocytophaga carnimorsus* จากอุบัติเหตุแมวหรือสุนัขกัดสาย Tenckhoff ขาด พบอุบัติการณ์การติดเชื้อด้วยวิธีนี้ร้อยละ 30-40 แต่หลังจากมีการใช้วิธีเปลี่ยนถ่ายน้ำยาด้วยเทคนิค “Flush-before-fill” พบว่าอุบัติการณ์การติดเชื้อด้วยช่องทางนี้ ลดลงอย่างมาก

ข. Periluminal route เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเกาะติดแน่นกับสาย Tenckhoff โดยการสร้าง biofilm เช่น *S. aureus* และ *Pseudomonas* spp. หรือใช้ silicone ที่เป็นวัสดุทำสาย Tenckhoff เป็นอาหาร ได้แก่ เชื้อรา ดังนั้นจึงพบการติดเชื้อที่ช่องทางออกและอุโมงค์ของสายก่อนแล้วจึงติดผิวด้านนอกของสาย Tenckhoff แล้วจึงผ่านเข้าสู่ช่องท้องผู้ป่วย

ค. Enteric route เชื้อก่อโรคอาจผ่านผนังลำไส้ที่ปกติ (transmural migration) หรือผ่านผนังลำไส้ที่มีพยาธิสภาพ ได้แก่ diverticulitis เข้าสู่น้ำยาในช่องท้อง เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Enterobacteriacea) ได้แก่ *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. และ *Proteus* spp. แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Enterococcus* spp. หรือแบคทีเรียชนิดไม่พึ่งออกซิเจนที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ เช่น *B. fragilis* ปัจจัยส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อ ได้แก่ ภาวะท้องผูก การทำหัตถการภายในลำไส้ เช่น การส่องกล้องตรวจ และการได้รับยาลดกรดเป็นระยะเวลานานๆ

ง. Hematogenous spread เชื้อโรคจากส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายเคลื่อนที่ผ่านกระแสเลือดเข้าสู่ช่องท้องผู้ป่วย เช่น การถอนฟัน หรือมีการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่ คือ *Streptococcus* spp. และ *H. influenzae*

จ. Gynecological route เกิดจากการติดเชื้อของช่องคลอดและปากมดลูก ผ่านปีกมดลูกออกมาทางช่องท้อง อาจเกิดจากการทำหัตถการภายในมดลูก แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในช่องคลอด เช่น *Lactobaciilus* หรือเชื้อที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เช่น *Neisseria* spp. และ เชื้อรา

2.2.2 สาเหตุ/ปัจจัยเสี่ยงของภาวะช่องท้องอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ

ก. การอักเสบของอวัยวะภายในช่องท้อง หรือ อวัยวะข้างเคียงช่องท้อง (juxta-peritoneal visceral inflammation)[22] การอักเสบของอวัยวะต่างๆอาจส่งผลให้เกิดเยื่อบุช่องท้องอักเสบได้ รวมทั้งของเหลวต่างๆที่ไม่ได้อยู่ในช่องท้องหากเกิดการรั่วไหลเข้าช่องท้อง องค์ประกอบทางเคมีของของเหลวเหล่านั้น อาจทำให้เกิดการอักเสบชนิดไม่ติดเชื้อขึ้นได้ เช่น ถุงน้ำดีอักเสบ ตับอ่อนอักเสบ เยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดที่ ลำไส้ขาดเลือด ทำให้เยื่อบุช่องท้องอักเสบเฉพาะที่ และหากน้ำย่อย น้ำดี หรือเลือดไหลเข้าสู่ช่องท้องจะทำให้เกิดการอักเสบทั่วช่องท้องได้

ข. ภาวะช่องท้องอักเสบจากสารเคมีและยา การให้ยาทางช่องท้อง (intraperitoneal) อาจทำให้เกิดภาวะช่องท้องอักเสบได้ เมื่อตรวจน้ำยาล้างช่องท้องจะพบว่ามีเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil หรือ eosinophil เด่น ยาที่เคยมีรายงานว่าทำให้เยื่อบุช่องท้องอักเสบได้แก่ amphotericin[23] , vancomycin[24] สาเหตุอาจเกิดจากการสัมผัสกับสารที่ปนเปื้อนในยา และเป็นเหตุให้องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาออกจดหมายเตือนเรื่องการให้ยา vancomycin ทางช่องท้องเมื่อ ค.ศ. 1990[25] ยาอื่นที่มีรายงานได้แก่ gentamicin, cephalothin, cefazolin และ chloramphenicol[26] นอกจากนี้ช่องท้องอักเสบอาจเกิดจากการแพ้สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของ ถุงน้ำยาล้างช่องท้อง สายนำน้ำยา หรือน้ำยาล้างช่องท้อง ซึ่งมักตรวจพบเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil เด่น

ค. ภาวะช่องท้องอักเสบจากโรคเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และหลอดเลือดอักเสบ หากตรวจน้ำยาล้างช่องท้องมักพบว่ามีเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil เด่น[27]

ง. ภาวะช่องท้องอักเสบจากมะเร็ง เมื่อตรวจน้ำยาล้างช่องท้องจะพบเซลล์มะเร็ง มะเร็งที่อาจเป็นสาเหตุ ได้แก่ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (non-Hodgkin's lymphoma)[28, 29] มะเร็งของอวัยวะในช่องท้องหรือที่กระจายมายังช่องท้อง เช่น มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก[30] เป็นต้น

2.3 อาการและอาการแสดงทางคลินิกการติดเชื้อช่องท้อง

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มาด้วยอาการปวดท้อง น้ำยาล้างไตทางช่องท้องขุ่น[31] มีส่วนน้อยที่มีอาการปวดท้องโดยที่น้ำยาล้างช่องท้องไม่ขุ่น จึงควรสงสัยภาวะช่องท้องอักเสบด้วยเสมอ อาการอื่นๆ ได้แก่ ไข้ คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลว ตรวจร่างกายพบ อาการกดเจ็บทั่วช่องท้อง rebound tenderness หรืออาจมีภาวะความดันโลหิตต่ำ เป็นต้น การซักประวัติมักไม่สามารถบอกสาเหตุภาวะช่องท้องอักเสบได้ แต่อาจได้ประวัติการปนเปื้อนระหว่างเปลี่ยนถ่ายน้ำยาล้างช่องท้อง การติดเชื้อของช่องทางออกของสายล้างช่องท้อง ผู้ป่วยที่มีสาเหตุของภาวะช่องท้องอักเสบจากอวัยวะ

ภายในช่องท้องอาจมีประวัติท้องผูก หรือถ่ายเหลว นำมาก่อน ส่วนความรุนแรงของอาการปวดท้องอาจช่วยบอกชนิดของเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของช่องท้องอักเสบ[4] เช่น coagulase-negative *Staphylococci* มักทำให้มีอาการปวดท้องรุนแรงน้อยกว่า *Streptococcus* spp., gram-negative rod bacteria และ *Staphylococcus aureus* บางรายอาจมาด้วยภาวะบวมจากการขาดทุนน้ำยา อาการแสดงได้แก่ การอักเสบติดเชื้อของช่องทางออกของสาย ช่องคลอด ฟัน และปอด เป็นต้น

2.4 นิยามของภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ

จาก International Society of Peritoneal Dialysis (ISPD) พ.ศ. 2553[4] นิยามและแบ่งประเภทของการติดเชื้อ ดังนี้

ก. Recurrent peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดขึ้นซ้ำจากเชื้อก่อโรคตัวใหม่ภายใน 4 สัปดาห์ หลังจากสิ้นสุดการรักษาการติดเชื้อครั้งก่อน

ข. Relapsing peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดขึ้นซ้ำจากเชื้อก่อโรคตัวเดิม หรือไม่ทราบชนิดของเชื้อจากผลการเพาะเชื้อภายใน 4 สัปดาห์ หลังสิ้นสุดการรักษาการติดเชื้อครั้งก่อน

ค. Repeat peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดขึ้นซ้ำจากเชื้อตัวเดิม หลังสิ้นสุดการรักษาครั้งก่อนไปแล้วมากกว่า 4 สัปดาห์

ง. Refractory peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องจากการติดเชื้อที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา หลังจากให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมไปแล้วเกินกว่า 5 วัน

จ. Catheter-related peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่พบร่วมกับการติดเชื้อของช่องทางออกของสายล้างช่องท้อง โดยมีผลเพาะเชื้อตรงกัน หรือมีตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเพาะเชื้อไม่ขึ้น

ฉ. Peritonitis-related death คือ การเสียชีวิตในขณะที่มีภาวะติดเชื้อช่องท้องหรือภายใน 2 สัปดาห์หลังเกิดภาวะติดเชื้อในช่องท้อง หรือขณะที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยภาวะติดเชื้อช่องท้อง

2.5 เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะช่องท้องติดเชื้อ

ภาวะติดเชื้อในช่องท้องของผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้อง สามารถให้การวินิจฉัยโดยการตรวจพบอาการและอาการแสดงทางคลินิก 2 ใน 3 ข้อ คือ

2.5.1 อาการและอาการแสดงที่บ่งชี้ถึงการอักเสบของเยื่อบุผนังช่องท้อง ได้แก่ อาการปวดท้อง กดเจ็บทั่วๆไปของผิวหนังบริเวณหน้าท้อง และการตรวจพบ rebound tenderness

2.5.2 น้ำยาล้างช่องท้องที่ถ่ายออกมาขุ่น (cloudy effluent) หรือมีเม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 เซลล์/มล. ร่วมกับพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil มากกว่าร้อยละ 50 กรณีผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automated peritoneal dialysis; APD) อาจมาพบแพทย์ในเวลากลางคืนระหว่างรอบของการบำบัดทดแทนไต น้ำยาล้างช่องท้องเพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการอาจค้างอยู่ในช่องท้องเป็นระยะเวลาไม่นานเพียงพอ ซึ่งมีผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าที่ควรจะเป็น กรณีนี้ควรใช้เกณฑ์การวินิจฉัยจากร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil มากกว่าจำนวนของ

เม็ดเลือดขาวทั้งหมด ถ้ามากกว่าร้อยละ 50 แม้ว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดจะต่ำกว่า 100 เซลล์/มล. ก็ให้ถือว่ามีภาวะช่องท้องอักเสบ ถ้าผู้ป่วยที่ล้างไตด้วยเครื่องอัตโนมัติมาตรวจในเวลากลางวันซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ไม่มีน้ำยาค้างภายในช่องท้องสำหรับนำไปส่งตรวจได้ กรณีนี้ควรใส่น้ำยาล้างช่องท้องใหม่ปริมาณ 1 ลิตร ค้างในช่องท้องเป็นเวลานานอย่างน้อย 1 ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการตามปกติ และใช้เกณฑ์การวินิจฉัยเช่นเดียวกับผู้ป่วยล้างช่องท้องทั่วไป กรณีที่อาการและอาการแสดงไม่ชัดเจน หรือปวดท้อง แต่น้ำยาล้างช่องท้องมีลักษณะใสเป็นปกติ ควรทำการใส่น้ำยาค้างในช่องท้องใหม่อีกครั้ง ค้างในช่องท้องนานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วนำน้ำยาที่ได้ส่งห้องปฏิบัติการซ้ำอีกครั้ง สามารถแบ่งสาเหตุที่ทำให้น้ำยาขุ่นได้เป็น 2 สาเหตุ คือ จากจำนวนเซลล์ต่างๆที่เพิ่มขึ้น หรือองค์ประกอบอื่นที่ไม่ใช่เซลล์ ดังต่อไปนี้

ก. น้ำยาล้างช่องท้องขุ่นซึ่งเกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ สามารถจำแนกตามชนิดของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นได้ดังต่อไปนี้

1) เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เพิ่มขึ้น พบได้ในภาวะที่มีการอักเสบของอวัยวะภายในหรือข้างเคียงช่องท้อง หรือมีการปนเปื้อนของ endotoxin และภาวะช่องท้องอักเสบจากยา จากรายงานของ Steiner และ Halasz[32] พบได้ในภาวะถุงน้ำดีอักเสบ ไส้เลื่อน และไส้ติ่งอักเสบ ซึ่งอาการและอาการแสดงไม่แตกต่างจากภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ เมื่อตรวจน้ำยาล้างช่องท้องจะพบเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เด่น ซึ่งเม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะเล็ดลอดออกมาจากผนังของอวัยวะที่มีพยาธิสภาพ ภาวะ mesenteric insufficiency ซึ่งเกิดในผู้ป่วยซึ่งล้างไตทางช่องท้องด้วยตนเอง หรือลำไส้ขาดเลือด ก็ทำให้มีอาการ ไข้ ปวดท้อง และน้ำยาขุ่นจากจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เพิ่มได้[33] การอักเสบของอวัยวะข้างเคียงช่องท้อง เช่น ตับอ่อนอักเสบ[32] การอักเสบหรือมะเร็งของไต[34] นอกจากนี้น้ำยาล้างช่องท้องที่มีการปนเปื้อน endotoxin[35, 36]หรือการให้ยาปฏิชีวนะ เช่น amphotericin[23] และ vancomycin[24] ทำให้เกิดภาวะช่องท้องอักเสบลักษณะนี้ได้เช่นเดียวกัน

2) เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil เพิ่มขึ้น โดยมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil สูงกว่าร้อยละ 10 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำยาล้างช่องท้อง[37, 38] สามารถพบได้ในโรคมะเร็งของอวัยวะภายในช่องท้อง[39] การแตกของ hydatid cyst[40] ภาวะหลอดเลือดอักเสบ[39] ภาวะ polyserositis[27] และ eosinophilic peritonitis[41] มีรายงานว่าพบ eosinophil ในน้ำยาล้างช่องท้องได้ร้อยละ 10 ถึง 95 โดยผู้ป่วยอาจไม่มีอาจผิดปกติใดๆ[42] มีการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์กับปริมาณ eosinophil ในเลือด แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ของปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ในช่องท้องกับในเลือด[26] ภาวะนี้อาจเกิดจากการแพ้วัสดุหรือน้ำยาสำหรับล้างไตทางช่องท้อง ซึ่งรวมถึง ถุงน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง สายนำน้ำยา และ สาย Tenckhoff[43] ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบและการเพิ่มของ eosinophil ตามมา[44] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถเกิดได้จากการให้ยาทางช่องท้อง ได้แก่ thrombolytis agents[25, 45] ยาปฏิชีวนะ เช่น vancomycin, gentamicin, cephalothin,

cefazolin, chloramphenicol และ amphotericin เป็นต้น[26, 37] Daugirdas และคณะ[46] ตั้งข้อสันนิษฐานถึงสาเหตุการพบเม็ดเลือดขาว eosinophil มากขึ้นในช่วงแรกของการล้างไตทางช่องท้องว่าอาจเกิดจากการมีลมรั่วเข้าไปในช่องท้องระหว่างการผ่าตัดวางสายล้างช่องท้อง ซึ่งภายหลังการวางสายดังกล่างมักพบว่ามีลมอยู่ใต้กระบังลมเมื่อผู้ป่วยถ่ายเอ็กซ์เรย์ช่องท้องในท่ายืน การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว eosinophil อาจแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง เช่น ลมที่รั่วเข้าไปในช่องท้อง ซึ่งคล้ายกับที่ตรวจพบจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดกรณีที่มีลมรั่วภายในช่องปอด เป็นต้น หลักฐานที่สนับสนุนทฤษฎีนี้ ได้แก่ การศึกษาของ Gokal และคณะ[43] ซึ่งปล่อยลมซึ่งปราศจากเชื้อโรคเข้าสู่ช่องท้องผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องจำนวน 5 คน หลังจากนั้นพบว่าน้ำยาล้างช่องท้องมีลักษณะขุ่น เมื่อนำไปตรวจนับเม็ดเลือดขาว ก็พบว่ามีจำนวนสูงถึง 335 เซลล์/มล. ซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่ภายใน 24 ชั่วโมงแรก และคงอยู่ได้นานถึง 7 สัปดาห์ โดยพบว่าผู้ป่วย 2 คนมีปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte เด่น (ร้อยละ 80 ± 6.5) ในขณะที่อีก 3 คนมีทั้งจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil และ monocyte เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 63 ± 12 และ 30 ± 19 ตามลำดับ) นอกจากนี้เลือดปริมาณเพียงเล็กน้อย รวมทั้งประจำเดือนที่ไหลย้อนเข้าสู่ช่องท้องก็อาจกระตุ้นให้เกิดภาวะช่องท้องอักเสบลักษณะนี้ได้

3) เม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น เช่นการมีเลือดออกช่องท้อง โดยถ้าเลือดที่ออกมีปริมาณมาก การแยกจากน้ำยาล้างช่องท้องขุ่นสามารถทำได้ง่าย แต่ถ้าปริมาณเลือดที่ปนมีน้อย หรือมีปริมาณเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า 105 เซลล์/มล. การแยกด้วยตาเปล่าจะทำได้ยาก พบบ่อยที่สุดในเพศหญิง สาเหตุมักเกิดจาก ถุงน้ำรังไข่แตก มีประจำเดือน และ ช่วงที่ไข่ตก[47] สาเหตุอื่นได้แก่ เลือดออกจากสายล้างช่องท้องเสียดสีกับผนังช่องท้อง หลังออกกำลังกายอย่างหนัก การใช้น้ำยาล้างไตทางช่องท้องซึ่งมีความเข้มข้นสูง การมีพังผืดภายในช่องท้อง[48] หรือการแตกของถุงน้ำของอวัยวะในช่องท้อง เช่น ถุงน้ำในไต หรือในตับ เป็นต้น[49]

4) เซลล์มะเร็ง มีรายงานการตรวจน้ำยาล้างช่องท้องพบเซลล์มะเร็งชนิด non-Hodgkin's lymphoma ซึ่งพบว่าผู้ป่วยมีอาการน้ำยาล้างช่องท้องขุ่นเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีอาการร่วมอื่น โดยมากกว่าร้อยละ 80 ของเซลล์ทั้งหมดเป็นเซลล์มะเร็ง[28] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเกิดจากมะเร็งของอวัยวะภายในช่องท้อง เช่น มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก[30] เป็นต้น

ข. น้ำยาล้างช่องท้องขุ่นซึ่งเกิดจากส่วนที่ไม่ใช่เซลล์ ได้แก่

1) การมีปริมาณไฟบรินเพิ่มขึ้น พบบ่อยในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่เพิ่งเริ่มล้างไตทางช่องท้อง หรือ อาจพบภายหลังจากเกิดภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ ซึ่งมักมีลักษณะเป็นสายของเนื้อเยื่อปนออกมากับน้ำยาล้างช่องท้อง เมื่อตั้งน้ำยาล้างช่องท้องทิ้งไว้อาจพบว่าจับตัวกันเป็นก้อนได้

2) ไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้น น้ำยาล้างช่องท้องจะมีลักษณะสีขาวขุ่นเกิดขึ้นเป็นๆหายๆ สัมพันธ์กับปริมาณไขมันในอาหารที่รับประทาน[50] สาเหตุที่พบบ่อยมักเกิดจากภาวะอุดตันของระบบน้ำเหลืองจากมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งต่อมน้ำเหลือง[29] ตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันทำให้เกิด chylous ascitesได้ แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกสันนิษฐานว่าตับอ่อนที่บวมอาจกดช่องทางเดิน

น้ำเหลืองบริเวณ cisterna chyliโดยตรง[51] Superior vena cava syndrome ทำให้แรงดันของหลอดเลือดดำส่วนกลางและมีผลขัดขวางการไหลเวียนของระบบน้ำเหลือง[52] การวางสายล้างช่องท้องหรือการบาดเจ็บของหลอดน้ำเหลืองภายในช่องท้องซ้ำๆเนื่องจากเสียดสีกับสายล้างช่องท้องอาจทำให้น้ำเหลืองรั่วเข้าสู่ช่องท้องได้ [50]นอกจากนี้ยังมีรายงานภาวะนี้สามารถเกิดจากการใช้ยากลุ่ม dihydropyridine calcium channel blocker เช่น manidipine[53], benidipine, nisodipine และ nifedipine ซึ่งหายได้หลังจากหยุดยา กลไกการเกิดยังไม่ทราบแน่ชัด[54]

อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่มีภาวะช่องท้องอักเสบทุกรายต้องแยกภาวะช่องท้องอักเสบซึ่งสัมพันธ์กับการล้างช่องท้อง (PD-related peritonitis) ออกจากภาวะช่องท้องอักเสบซึ่งเกิดจากการอักเสบของอวัยวะภายในหรือข้างเคียงช่องท้องซึ่งอาจต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด (secondary peritonitis) เสมอ ซึ่งลักษณะที่ช่วยแยกภาวะช่องท้องที่อาจต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดคืออาการกดเจ็บเฉพาะที่ซึ่งแสดงถึงอวัยวะที่มีพยาธิสภาพได้[4] การตรวจพบอวัยวะเลื่อนออกมาอยู่ภายนอกช่องท้อง (hernia) หรือมีอาการของการติดเชื้อในกระแสโลหิตเช่นมีความดันโลหิตตก[55] เป็นต้น

2.5.3 ตรวจพบเชื้อก่อโรคจากการการย้อมสีแกรม หรือ การเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำยาล้างช่องท้อง[4]

ก. การย้อมสีแกรมของน้ำยาล้างช่องท้อง แม้ภาวะช่องท้องอักเสบเกิดจากการติดเชื้อ แต่ก็มักย้อมไม่พบเชื้อ สามารถวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้ร้อยละ 9-40[4] หากย้อมพบแบคทีเรียแกรมบวกอาจเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างเก็บตัวอย่างส่งย้อมหรือเกิดผลบวกลวงจากตะกอนสีแกรม ซึ่งย้อมพบแบคทีเรียแกรมบวกได้ร้อยละ 5-20 การย้อมสีแกรมมีวัตถุประสงค์ที่แท้จริงเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหรือเชื้อรา ทำให้สามารถรักษาภาวะช่องท้องอักเสบที่มีการติดเชื้อราร่วมด้วยได้ทันที ซึ่งต้องได้รับการรักษาด้วยยาฆ่าเชื้อราร่วมกับการเอาสายล้างช่องท้องออกโดยเร็วที่สุดเมื่อได้รับการวินิจฉัย เนื่องจากการย้อมสีแกรมมีข้อจำกัด ดังนั้นการให้ยาปฏิชีวนะเบื้องต้นเพื่อครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียจึงไม่ควรพิจารณาจากผลการย้อมแกรมของน้ำยาล้างช่องท้องเป็นหลัก แต่ควรครอบคลุมเชื้อก่อโรคซึ่งพบได้บ่อยทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก และปรับเปลี่ยนยาปฏิชีวนะภายหลังจากทราบผลเพาะเชื้อและความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ[56]

ข.การเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำยาล้างช่องท้องสามารถเพาะเชื้อก่อโรคขึ้นได้ร้อยละ 70-90 คณะกรรมการเฉพาะกิจ ISPD พ.ศ. 2553[4] แนะนำให้ทำการเพาะเชื้อ 2 วิธีร่วมกัน คือ 1) Large volume culture ทำโดยการนำตะกอน 3-5 มิลลิลิตร ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยาล้างช่องท้องปริมาณ 50-100 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที มาเจือจางในน้ำเกลือนอร์มัลปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นแบ่งไปเพาะเชื้อในวุ้นเลี้ยงเชื้อ (solid media หรือ agar plate) และใส่ใน nutrient liquid media (broth หรือ hemoculture) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2) Bedside culture ในกรณีที่ไม่สะดวกปั่นน้ำยา ให้ดูดตะกอนจากถุงน้ำยาที่แขวนโดยที่ส่วนต่อ

(connecting part) ห้อยลงล่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง แบ่งน้ำยาปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร มาเพาะในขวด nutrient broth จำนวน 2 ขวด อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย media แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

1) วุ้นเลี้ยงเชื้อ (solid media หรือ agar plate)[57-61] เป็น culture media ที่เป็นวุ้นแข็งในหลอดทดลอง ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เหมาะกับการเพาะเลี้ยงทั่วๆไปและการแยกชนิดของเชื้อ (selective agar หรือ differential agar) โดย selective agar หมายถึงวุ้นเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้เพื่อการคัดเลือกเชื้อชนิดที่ต้องการให้เจริญได้เท่านั้น โดยการเติมสารอาหารที่เชื้อต้องการ สามารถใช้ได้ดี ในขณะที่เชื้ออื่นไม่สามารถใช้ได้ หรือการเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ๆ เช่น ใส่สี crystal violet ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีจึงเป็นแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น sodium chloride ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Staphylococcus spp.* เนื่องจากไม่สามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน *Staphylococcus* spp. นอกจากนี้ยังใช้ sodium azide, sodium citrate , sodium tellurite, sodium lauryl sulfate, sodium Selenite, iodine, phenylethanol และยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นการปรับความ เป็นกรดหรือด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่าปรกติ เช่น pH 5.6 ใน sabouraud dextrose agar (SDA) หรือสูงกว่าปกติ เช่น pH 8.8-9.0 ใน alkaline peptone water สำหรับแยกเชื้อ *Vibrio cholera*, MRS agar ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus* spp., Eosin methylene blue agar (EMB agar) ใช้ในการคัดแยกเชื้อ *E. coli* , อาหาร serum-albumin agar (SAA) ใช้แยก *Aeromonas sobria* เป็นต้น ส่วน differential agar หมายถึงวุ้นเพาะเลี้ยงที่จะเกิดการเปลี่ยนสีเมื่อมีเชื้อแบคทีเรียที่จำเพาะเจริญเติบโต แบ่งเป็น 3 ชนิด 1) blood agar เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อแบคทีเรียทั่วๆไป และเชื้อรา เชื้อที่แยกได้ ได้แก่ *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia, Echerichia coli* 2) Chocolate agar เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อที่เจริญเติบโตยาก (fastidious organism) เช่น *Neisseria gonorrhoeae* และ *Haemophilus influenza* 3) MacConkey agar เหมาะสำหรับการเพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Echerichia coli, Proteus mirabilis, Salmonella typhimurium, Enterococcus faecalis* ข้อดีของการเพาะเชื้อลงบน agar คือ เชื้อจะสร้าง colony ทำให้สามารถบอกชนิดของเชื้อได้จากลักษณะของ colony ที่เกิดขึ้น และทำให้ง่ายในการนำไปแยกเพาะเลี้ยง (subculture) เพื่อระบุชนิดของเชื้อต่อไป การส่งตัวอย่างควรส่งภายในเวลา 6 ชั่วโมง หากไม่สามารถทำได้ แนะนำให้เก็บไว้ในอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะส่งตัวอย่าง[62]

2) Liquid media หรือ broth[57-60] เป็น culture media ที่มีคุณสมบัติเหลว มักมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารสกัดจากเนื้อวัวที่มี peptones (broken down proteins) เป็นส่วนประกอบละลายอยู่ในน้ำเพาะเลี้ยง สะดวกต่อการใช้ สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิดทั้งที่ทนและไม่ทนต่อออกซิเจนได้ โดยสังเกตจากลักษณะการเจริญเติบโตใน broth ได้เป็น 5 กลุ่ม คือ

ก. Obligate aerobic bacteria เป็นแบคทีเรียที่จำเป็นต้องพึ่งพาออกซิเจน ดังนั้นเชื้อจะสร้างโคโลนีเฉพาะส่วนบนหรือบนผิวหน้าของ broth

ข. Obligate anaerobic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เสียชีวิตเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน ดังนั้นโคโลนีของเชื้อจะเติบโตเฉพาะส่วนล่างของ broth

ค. Facultative bacteria เป็นแบคทีเรียที่อยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แต่จะเจริญเติบโตไวในสภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากการมีออกซิเจนจะช่วยให้การเผาผลาญพลังงานมีประสิทธิภาพมากกว่าการไม่มีออกซิเจน ดังนั้นจะพบโคโลนีของเชื้อในกลุ่มนี้ได้ทั้ง broth แต่จะพบมากบริเวณส่วนบน

ง. Microaerophiles เป็นแบคทีเรียที่จำเป็นต้องพึ่งพาออกซิเจนแต่ในความเข้มข้นน้อยกว่าในสภาพบรรยากาศปกติ ดังนั้นจะพบโคโลนีเฉพาะส่วนบน แต่ไม่พบบนผิวของ broth

จ. Aerotolerant bacteria เป็นแบคทีเรียที่ไม่พึ่งพาออกซิเจน กระจายตัวสม่ำเสมอทั่ว broth โดยปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายของเชื้อใน broth เช่น เชื้อที่มี flagella สามารถเคลื่อนที่ได้จะพบโคโลนีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้ง broth ต่างจากเชื้อที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะตกตะกอนในหลอด

อย่างไรก็ตามพบว่าความไวในการตรวจพบ Obligate anaerobic bacteria (clostridia) ไมโคแบคทีเรีย และเชื้อราต่ำกว่า aerobic มาก ดังนั้นหากสงสัยเชื้อดังกล่าว ควรเลือกใช้ broth ที่จำเพาะต่อการเพาะเลี้ยง anaerobe ไมโคแบคทีเรียหรือเชื้อราร่วมกับ broth มาตรฐาน นอกจากนี้ยังมีอีกหลายปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อความไวในการพบเชื้อ ได้แก่ ปริมาตรของตัวอย่างที่ส่ง ความเข้มข้นของเชื้อในตัวอย่าง การปนเปื้อนยาปฏิชีวนะก่อนทำการเพาะเชื้อ การเก็บรักษาและความรวดเร็วในการส่งตัวอย่าง วิธีการเพาะเชื้อ และมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ พบว่ายิ่งใช้ปริมาตรตัวอย่างในการเพาะเชื้อมาก ยิ่งเพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้อ

การเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือด พบผลบวกจากการเพาะเชื้อในเลือดต่ำ ดังนั้นไม่แนะนำให้ส่งเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือดในผู้ป่วยทุกรายที่มีภาวะช่องท้องติดเชื้อหากไม่มีอาการ อาการแสดงของการติดเชื้อในกระแสเลือด

2.6 วิธีส่งตรวจน้ำยาล้างช่องท้อง[4]

2.6.1 วิธีส่งตรวจตามมาตรฐาน

ขั้นตอนการเก็บน้ำยาล้างช่องท้องเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการช่วยวินิจฉัยภาวะช่องท้องอักเสบได้ การเพาะเชื้อไม่เพียงแต่ทำให้สามารถให้การรักษาได้อย่างเหมาะสม แต่สามารถบอกสาเหตุของการติดเชื้อได้ด้วย เก็บตัวอย่างโดยนำตะกอน 3 ถึง 5 มิลลิลิตรที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยาล้างช่องท้องปริมาณ 50 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที มาเจือจางในน้ำเกลือนอร์มัล หลังจากนั้นทำการปั่นแยกตะกอนซ้ำ และนำตะกอนที่ได้ไปย้อมแกรมและเพาะเชื้อ บน solid media และใส่ในขวดเพาะเชื้อจากเลือด (hemoculture) ถ้าไม่สะดวกปั่นน้ำยา ให้ดูดตะกอนจากถุงน้ำยาที่แขวนโดยที่ส่วนต่อ (connecting part) ห้อยลงล่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วแบ่งฉีดลงในในขวด hemoculture ขวดละ 10 มิลลิลิตร 2 ขวด

ภาวะติดเชื้อน้ำในช่องท้องในผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายที่ได้รับการบำบัดทดแทนไตด้วยวิธีการล้างไตทางช่องท้องเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้มากขึ้นในปัจจุบัน ตามคำแนะนำของ

International Society of Peritoneal Dialysis (ISPD) พ.ศ. 2553 อัตราการเพาะเชื้อน้ำยาล้างช่องท้องไม่ขึ้นเชื้อควรต่ำกว่าร้อยละ 20 ซึ่งความชุกของผลเพาะเชื้อเป็นลบในต่างประเทศเท่ากับร้อยละ 3-30 [6, 63] ส่วนในประเทศไทยเท่ากับร้อยละ 43.1[64]

2.6.2 นอกจากวิธีการส่งเพาะเชื้อตามมาตรฐานข้างต้นแล้ว ยังมีการศึกษาวิธีการตรวจเชื้อด้วยวิธีอื่น ได้แก่

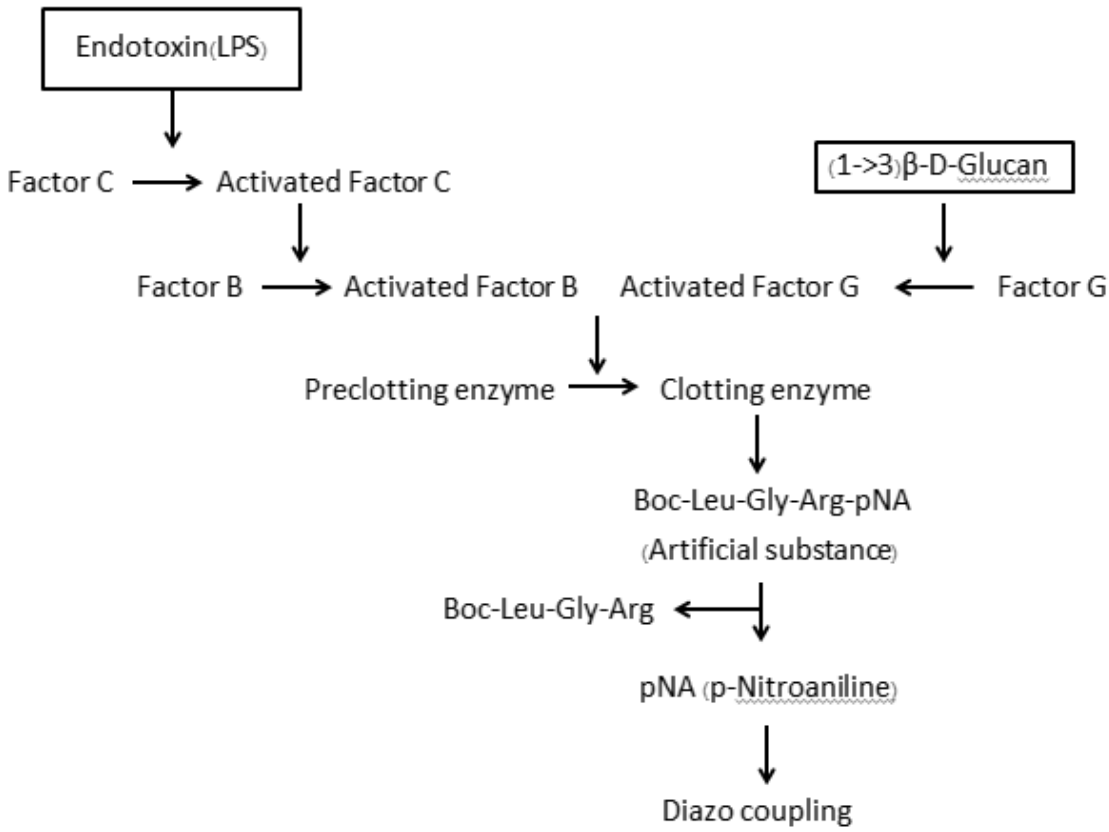
ก. การวิเคราะห์หา endotoxin[65, 66] Endotoxin เป็นสาร lipopolysaccharide บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 300,000-1,000,000 ดาลตัน ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ O-polysaccharide chain, core polysaccharide และ lipid A ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ของเชื้อก่อโรคในขณะที่เซลล์ใกล้เสียชีวิตหรือเสียชีวิตแล้ว เมื่อเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วยจะจับกับ lipopolysaccharide binding protein (LBP) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่ถูกสร้างขึ้นจากตับเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทีคุณสมบัติจับได้ดีกับ CD14 บนผิวของเซลล์หลายชนิดในร่างกาย ได้แก่ macrophage, neutrophil และ endothelial cell ส่งผลให้เซลล์เหล่านี้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองด้วยการผลิต proinflammatory cytokines และ inflammatory mediators หลายชนิด เช่น IL-1, TNF, IL-6 และ IL-8 ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกเรียกว่า pyrogenic reactions ประกอบด้วยอาการไข้ ชีพจรเต้นเร็ว การเพิ่มขึ้นของ cardiac output และ vascular resistance ในรายที่รุนแรงจะมีความดันโลหิตตกและอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ วิธีมาตรฐานในการตรวจหาระดับ endotoxin คือ การฉีดเข้าไปในตัวกระต่าย สังเกตอาการหนาวสั่นภายในระยะเวลา 2-4 วัน หากพบแสดงว่าสารตัวอย่างมีการเจือปนของ endotoxin แต่ข้อเสียคือได้ผลช้า จึงมีการคิดค้นการตรวจด้วยวิธี Limulus amoebocyte lysate (LAL) อาศัยหลักการที่ว่า endotoxin สามารถทำให้เกิดการแข็งตัว (clot) ของโปรตีนในระบบไหลเวียนของแมงดาทะเล (limulus polyphemus) ภายในเวลาไม่เกิน 45 นาทีโดย endotoxin จะทำหน้าที่กระตุ้น proenzyme ในระบบไหลเวียนแมงดาทะเลให้เป็น coagulase ทำให้เกิดการแข็งตัวของโปรตีนในกระแสเลือด โดยปริมาณของโปรตีนสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ endotoxin จึงได้มีการสกัดสาร coagulogen ออกมาจากเซลล์ amoebocyte โดยการทำให้เซลล์แตกในน้ำบริสุทธิ์ แล้วนำสารสกัดนี้มาทำการทดสอบในหลอดทดลอง จึงเป็นที่มาของชื่อเรียกการทดสอบนี้ สามารถทำการวัด endotoxin ได้หลายวิธี เช่น วัดความขุ่นของปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่เกิดจากสาร coagulin โดยอาศัย turbidimetric kinetic machine หรือการวัด endotoxin โดยใช้ gel-clot LAL assay คือการนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ มาทำปฏิกิริยากับ LAL ในหลอดทดลองแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที แล้วอ่านผลการทดสอบ โดยในหลอดทดสอบที่มีปริมาณ endotoxin มากกว่าหรือเท่ากับค่าความไว (sensitivity) ของน้ำยา LAL จะเกิดการแข็งตัวของ gel ซึ่งจะอ่านผลที่ได้เป็น positive ส่วนหลอดที่ไม่เกิดการแข็งตัวของ gel จะอ่านผลเป็น negative

ประโยชน์ของ LAL test คือ สามารถนำมาทดสอบแบคทีเรียแกรมลบได้[67-69] มีรายงานการนำ gel clot LAL assay มาใช้ในการตรวจแบคทีเรียแกรมลบในภาวะติดเชื้อในช่องท้องในต่างประเทศ พบว่า sensitivity เท่ากับร้อยละ 98 และ specificity เท่ากับร้อยละ 74[67] อีกทั้งสามารถรายงานผลได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง

ข.การใช้แถบสีจุ่มเพื่อทดสอบปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (Leukocyte esterase reagent strip) ซึ่งเป็นแถบจุ่มสำเร็จรูปที่ใช้ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ leukocyte esterase โดยแถบบรรจุ substrate ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ (3-hydroxy-5-phenyl-pyrrole) และ indicator (diazodium salt) ที่จะทำให้แถบเปลี่ยนสีเป็นสีม่วง เมื่อเกิดอนุพันธ์จากการย่อยด้วยเอนไซม์ leukocyte esterase รายงานผลเป็น semi-quantitattion ซึ่งเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับปริมาณของ neutrophil คือ 0 (0 PMN/มล.), 1+ (25 PMN/มล.), 2+ (75 PMN/มล.), 3+ (250 PMN/มล.), และ 4+ (500 PMN/มล.) พบว่ามีความไวและความแม่นยำสูงในการวินิจฉัยภาวะช่องท้องอักเสบ แต่อาจพบผลบวกลวงได้จากยาปฏิชีวนะบางประเภทหรือในภาวะตับอ่อนอักเสบ[70, 71] ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีแถบตรวจเชื้อจำหน่ายหลายชนิดเพื่อใช้สำหรับการวินิจฉัยภาวะช่องท้องอักเสบ แต่มีรายงานประสิทธิภาพแตกต่างกันมาก จึงยังไม่มีคำแนะนำให้ใช้วิธีนี้ในทางปฏิบัติ[72]

ค. การตรวจเชื้อราโดยใช้เบตากลูแคน (β-D-glucan)

β-D-Glucan (BDG) เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อยีสต์และโมลด์ที่สามารถตรวจพบในซีรัม ยกเว้น Zygomycetes เช่น *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp. และ Cryptococci[73, 74] เป็นการตรวจทางอ้อมที่เป็นที่ยอมรับ เพื่อช่วยวินิจฉัยโรคติดเชื้อราแบบลุกลามตามเกณฑ์ของ EOSTC/MSG6 (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group) หลักการตรวจแสดงในรูปที่ 3 ใช้หลักการของ Limulus amoebocyte lysate (LAL) ซึ่งสกัดมาจากเลือด (amoebocyte) ของแมงดาทะเล (Limulus polyphemus หรือ Tachypleus tridentatus) โดยทั่วไป endotoxin (หรือ lipopolysacchride, LPS) และ BDG สามารถกระตุ้น coagulation cascade ของ LAL ได้ผ่านทาง Factor C และ Factor G และตรวจปฏิกิริยาการเกิดสีหรือความขุ่น แต่หลักการของสองชุดตรวจนี้มีการกำจัด Factor C ใน LAL ทำให้ปฏิกิริยา ที่เกิดขึ้นจำเพาะสำหรับ BDG เท่านั้นที่สามารถกระตุ้น Factor G (รูปที่ 1) และวัดปฏิกิริยาการเกิดสีใน 96-well plate ค่าที่ได้แสดงเป็นหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิลิตรของซีรัม (พก./มล.) โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 1 แสดงหลักการการตรวจโดยใช้ β-D-Glucan

อย่างไรตามมีรายงานว่าการตรวจ BDG เพื่อวินิจฉัย Invasive aspergillosis ให้ผลบวกปลอมในผู้ป่วยที่ฟอกเลือดโดยผ่านเซลลูโลสเมมเบรน ผู้ป่วยที่ได้รับอิมมูโนกลอบูลิน อัลบูมิน หรือส่วนประกอบของเลือดที่ผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสที่มี β-glucan และการได้รับยาปฏิชีวนะ amoxicillin-clavulanic acid ทางหลอดเลือดดำ[75] ดังนั้นการผลการตรวจที่ได้จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยดังกล่าวด้วย

ง. การตรวจเชื้อราโดยใช้ galactomanan Galactomanan (GM) เป็น heat-stable heteropolysaccharide ที่พบในผนังเซลล์ของเชื้อ *aspergillus* spp. และ *penicillium* spp. ซึ่งจะปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมขณะที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ[73] ในปี พ.ศ.2546 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาได้เริ่มการใช้ double-sandwish galactomanan enzyme immunoassay (EIA) หลักการตรวจแสดงในรูปที่ 4 มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี EB-A2 จากหนูซึ่งจำเพาะกับ β(1,5)-linked galactofuranoside side-chain ของ GM เป็นตัวจับกับ GM แอนติเจนที่พบในซีรัมซึ่งติดอยู่ใน microplate หากในซีรัมมี GM จะถูกจับไว้และอีกด้านถูกจับไว้ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เชื่อมกับเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) หลังจากเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์สามารถวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นได้ เพื่อวินิจฉัย invasive aspergillosis[76] ซึ่ง double-sandwich ELISA สำหรับตรวจ galactomanan มีความไวและความจำเพาะ สูงเมื่อใช้ค่า cut-off ที่ 0.8 นก./มล.[77] ข้อจำกัด คือ การตรวจด้วยวิธีนี้ไม่สามารถบอกสปีชีส์ของเชื้อได้และมีรายงานว่า ให้ผลบวกปลอมใน

ผู้ป่วยที่ได้รับยา amoxicillin-clavulanic acid, piperacillintazobactam [78, 79] และในกลุ่มผู้ป่วยเด็ก[80]

การติดเชื้อราพบได้ไม่บ่อยแต่ว่าอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 22-33 และอัตราการหยุดฟอกไตทางช่องท้องสูงถึงร้อยละ 50-85[81] มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *aspergillus niger* โดยใช้ β-glucan และ galactomanan ตรวจในน้ำล้างไตทางช่องท้องและเลือด

จ. การตรวจโดยใช้ Polymerase chain reaction (PCR) และ 16S rDNA gene sequencing[82-84]เป็นการจำแนกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยการแสดงลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characterization) อาศัยคุณสมบัติการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence) ซึ่ง ribosomal DNA เป็น DNA ส่วนที่ทำหน้าที่ encode ribosomal RNA เป็น ribosome ที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนปกติมี 2 ยูนิต คือ 30S และ 50S โดย 16S เป็นส่วนประกอบย่อยของ 30S ซึ่งมีการศึกษาการใช้ยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ในการวิเคราะห์แยกชนิดของ prokaryotes (แบคทีเรีย, ไมโคแบคทีเรีย, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*) ได้มากกว่า 250 ชนิด และใช้ 18S rDNA ในการวิเคราะห์แยกชนิดเชื้อราซึ่งเป็น eukaryotic cell นอกจากนี้ยังนำ 16S rDNA มาใช้ในงาน phylogenetic study เนื่องจากเป็นยีนที่มีโครงสร้างทั้งส่วนของ highly conservative region เพื่อให้ universal primer จับ และส่วนของ hypervariable regions ที่มีความจำเพาะ สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ด้วยเทคนิค DNA sequencing ประโยชน์ที่ได้จากการทำ DNA sequence ได้แก่

1) เพื่อใช้ค้นหาเชื้อที่เพาะขึ้นยาก (factitious หรือ anaerobic) หรือใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน เช่น ไมโคแบคทีเรีย, รา, HACEK เป็นต้น

2) ช่วยในการวินิจฉัยเชื้อที่พบการปนเปื้อนได้สูง เช่น coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม CoNS มีมากกว่า 51 ชนิด และส่วนใหญ่พบเป็น normal flora ของผิวหนังซึ่งอาจปนเปื้อนขณะเก็บตัวอย่างส่งเพาะเชื้อ การวิเคราะห์ species สามารถช่วยประกอบการพิจารณารักษาได้ง่ายขึ้น เช่น เชื้อ *S. haemolyticus และ S. capitis* มีอัตราการก่อโรคต่ำ (ร้อยละ 11-21) ต่างจาก *S. lugdunensis* และ *S. saprophyticus* (ร้อยละ 88-91)[84]

3) ช่วยในการค้นพบเชื้อ species ใหม่

4) ช่วยในการวิเคราะห์ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ทำลายยาปฏิชีวนะ เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่มีประวัติใช้หรือกำลังได้รับยาปฏิชีวนะขณะเก็บตัวอย่างส่งตรวจ PCR เป็นเทคนิคที่มักใช้ในงานวิจัยทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (*in vitro* DNA amplification) ในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารเคมีดังต่อไปนี้

ก. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ มี 4 ชนิด ได้แก่ dATP (A-adenine) , dCTP (C-cytosine) , dGTP (G-guanine) และ dTTP(T-thymine)

ข. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

ค. ดีเอ็นเอสายตั้งต้น (DNA primer) เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆเป็น single strand ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์จับคู่ได้กับปลายของ template ทั้งสองด้าน โดยจะมีด้าน 3' เป็น hydroxyl group ที่จะสามารถต่อกับ nucleotides อื่นได้ ดังนั้นในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพเมอร์จำเพาะ

ง. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียมอยู่ด้วย

จ. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะสารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก ซึ่งในปฏิกิริยาการทำ PCR 1 รอบ (cycle) จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

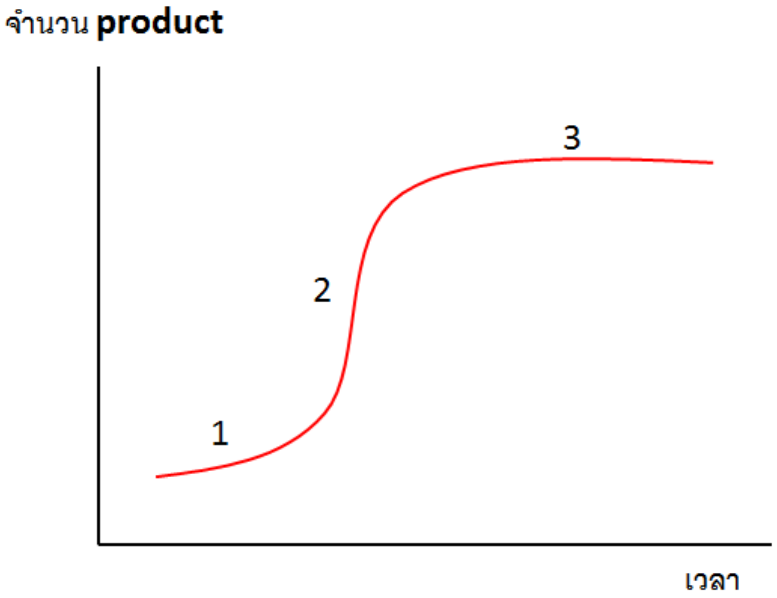
1) Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) แยกออกเป็นสายเดี่ยว (single strand DNA)

2) Primer annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆและใส่ไพร์เมอร์ (primer) ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (complementary base pair) ระหว่างไพร์เมอร์ กับ Template DNA โดยจะทำการลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 35-60 องศาเซลเซียส

3) Primer extention เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่โดยใช้ Taq DNA polymerase ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ Taq DNA polymerase โดยเอนไซม์จะนำ dNTP มาเชื่อมต่อกันด้วย phosphodiester bond จะทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่มีเบสคู่สมกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ[85]

ในการทำปฏิกิริยา PCR 1 รอบจะทำให้ได้ดีเอ็นเอ (PCR product) มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นแบบ exponential คือได้ product ใน n cycle เป็น 2^n คู่และเมื่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆรอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ทำให้มีความไวในการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้น ปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้นเมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot

เทียบกับเวลาจะได้เป็นรูปตัว S ดังรูปที่ 5 ในช่วงแรก product จะเพิ่มจำนวนทีละไม่มาก เรียกว่า lag phase (1) แต่เมื่อมีจำนวนมากขึ้นถึงระดับหนึ่ง จำนวน product จึงจะเพิ่มแบบทวีคูณ เรียกว่า exponential phase (2) จนกระทั่งไม่มี polymerase หรือ nucleotides เหลืออยู่ ทำให้ปริมาณคงที่เป็นระยะที่เรียกว่า plateau phase (3)



รูปที่ 2 แสดงจำนวนของ product ที่เกิดจาก PCR เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประยะเวลาหนึ่ง

หลังจากได้ PCR product แล้วต้องนำมาทดสอบยืนยันว่าเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบจริง โดยวิธีต่างๆ เช่น agarose gel electrophoresis, DNA hybridization, DNA sequencing , real time PCR เป็นต้น เทคนิค PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) มีข้อจำกัดหลายประการ ดังนี้

1) เทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองด้วยเครื่อง Thermal Cycler และต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ทำให้รู้ผลช้าเกินกว่าที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการที่ต้องการผลเร่งด่วนได้ นอกจากนี้เทคนิค agarose gel electrophoresis ยังทำให้เกิดการฟุ้งกระจายและการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วไปทั่วบริเวณ (carry over contamination) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้

2) การตรวจสอบความแม่นยำและถูกต้องของกระบวนการ PCR ทำโดยใช้วิธี dot blot เช่น Southern blot hybridization วิธีนี้ต้องใช้ดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ที่ติดฉลากด้วยสาร

รังสี เข้า hybridize กับ ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้ว ซึ่งต้องใช้เวลานานประมาณ 2-3 วัน ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายและปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว

3) กระบวนการ PCR แบบดั้งเดิมสามารถบอกได้เพียงว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ในสิ่งส่งตรวจหรือไม่เท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นได้

ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคโนโลยี PCR ขึ้นไปอีกระดับหนึ่งชื่อว่า real time PCR ซึ่งสามารถแก้ไขข้อจำกัดต่างๆเหล่านี้ได้ โดยสามารถตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมได้ด้วยการใช้ SYBR Green I Dye และตรวจสอบด้วย probe ที่ติดฉลากด้วย Fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งส่งตรวจได้และวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ได้ในเวลาหลังจากกระบวนการเพียงไม่กี่วินาที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน

ข้อดีของ real time PCR

1) สามารถติดตามผลได้ในขณะที่เกิดขึ้นจริง
2) ไม่ต้องมีขั้นตอนหลัง PCR (ได้ผลลัพธ์มากขึ้น ลดโอกาสการปนเปื้อน)
3) การทำงานแต่ละรอบมักจะเร็วกว่าแบบธรรมดา
4) วัดได้มากขึ้นจนถึง 10^{10} เท่า (wider dynamic range)
5) สามารถตรวจยืนยัน product ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting point

ข้อด้อยของ real time PCR

1) ยังไม่ ideal สำหรับ multiplexing
2) เครื่องมือราคาสูง
3) มี intra- และ inter- variation สูงเพราะวัดได้ละเอียด

จากการศึกษาของ Kim และคณะ[7] ได้ศึกษาการใช้ broad range PCR ในการตรวจแบคทีเรียตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนกันยายนปี พ.ศ. 2552 จากน้ำล้างไตทางช่องท้องที่ฉีดลงไปในขวดเพาะเชื้อ 100 ตัวอย่าง พบว่า 53 ตัวอย่างเพาะเชื้อขึ้นและ PCR ได้ผลบวก มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่ PCR ได้ผลบวกเป็นเชื้อ *Bacillus cirlucans* ส่วนกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่ขึ้นและ PCR ได้ผลลบมี 44 ตัวอย่าง และมีเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่ผลเพาะเชื้อขึ้นแต่ PCR ได้ผลลบ ได้แก่ *Candida albicans* นอกจากนี้ PCR ยังสามารถระบุ species ของเชื้อได้โดยใช้ 16S rDNA sequencing 16S rDNA sequencing สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ โดยสามารถระบุ genus ได้มากกว่าร้อยละ 90 และระบุ species ได้ร้อยละ 65-83 สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่พบยาก แบคทีเรียที่เพาะเชื้อขึ้นช้า หรือการติดเชื้อที่เพาะเชื้อแล้วไม่ขึ้นเชื้อ (culture-negative infections) ที่เกิดจากการได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน ทำให้สามารถตัดสินใจเลือกยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาต่อไปได้ โดยมีรายงานการใช้ 16S rDNA sequencing ในการตรวจผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยที่ผลการเพาะเชื้อเป็นลบในโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ[86] ฝีในสมอง การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ข้ออักเสบ ภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต เป็นต้น โดยข้อจำกัดการใช้คือหากตรวจพบ

แบคทีเรียที่ต่าง species กันในตำแหน่ง sequence เดียวกัน จะทำให้แยกเชื้อกันได้ยาก และหากมีแบคทีเรียที่ไม่ได้อยู่ในฐานข้อมูล (database) ก็จะทำให้ระบุเชื้อไม่ได้[87]

จากการศึกษาของ Johnson และคณะ[83] ได้เปรียบเทียบการตรวจการติดเชื้อของน้ำในช่องท้องด้วยวิธี qualitative PCR โดยใช้ 16S rDNA กับวิธีเพาะเชื้อแบบทั่วไป โดยรวบรวมผู้ที่ติดเชื้อในช่องท้องทั้งหมด 12 ราย นำน้ำในช่องท้องมาเพาะเชื้อพบว่า 9 รายเพาะเชื้อขึ้น และนำมาตรวจต่อด้วยวิธี PCR พบว่า 6 รายได้ผลบวก และ 3 รายได้ผลลบ ส่วนกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น 3 รายนั้น นำมาตรวจด้วย PCR พบว่าได้ผลลบทั้งหมด โดย sensitivity เท่ากับร้อยละ 67, specificity เท่ากับร้อยละ 79 ส่วนน้ำในช่องท้องที่เป็นกลุ่มควบคุมพบว่าตรวจ PCR ได้ผลบวก 2 ราย และได้ผลลบ 11 ราย ต่อมาเมื่อใช้ PCR ตรวจติดตามผลวันที่ 5 หลังจากการรักษา โดยรวบรวมผู้ที่ติดเชื้อในช่องท้องทั้งหมด 9 ราย ซึ่งอาการหายปกติมี 7 รายและติดเชื้อซ้ำใน 30 วันมี 2 ราย ในกลุ่มที่อาการหายปกติ 7 รายนั้น พบว่า PCR ได้ผลบวก 1 ราย ส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อซ้ำ 2 รายนั้นตรวจ PCR วันที่ 5 หลังการรักษาได้ผลบวก 2 ราย ข้อจำกัดของการศึกษา คือ การตรวจด้วย PCR คือ อาจมีการปนเปื้อนจากสายล้างไตทางหน้าท้องได้

จากการศึกษาของ Collier และคณะ[88] ในปี พ.ศ. 2552 ได้ศึกษาการตรวจน้ำในช่องท้องด้วยวิธี PCR โดยนำน้ำในช่องท้อง 71 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 24 รายมาศึกษา และมี 21 ตัวอย่างที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ นำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี real-time 16S rDNA PCR assay พบว่า 21 ตัวอย่างที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อนั้น 13 ตัวอย่างเพาะเชื้อขึ้น อีก 8 ตัวอย่างเพาะเชื้อไม่ขึ้น โดย 13 ตัวอย่างที่เพาะเชื้อขึ้นนั้น นำมาตรวจด้วยวิธี PCR ต่อ ผลพบว่า ได้ผลบวก 9 ตัวอย่าง และได้ผลลบ 4 ตัวอย่าง ส่วนอีกกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น 8 ตัวอย่างนำมาตรวจด้วยวิธี PCR ต่อ ผลพบว่า ได้ผลบวก 3 ตัวอย่าง และได้ผลลบ 5 ตัวอย่างสรุปการใช้ PCR 16S rDNA ในการตรวจการติดเชื้อน้ำในช่องท้องมี sensitivity ร้อยละ 69, specificity ร้อยละ 63 , positive predictive value ร้อยละ 75 และ negative predictive value ร้อยละ 56 ต่อมาเมื่อใช้ PCR ตรวจติดตามผลหลังจากการรักษา โดยรวบรวมผู้ที่ติดเชื้อในช่องท้องทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ในจำนวนผู้ป่วย 24 ราย นำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียพบว่าทั้งหมดไม่ขึ้นเชื้อ และตรวจต่อด้วยวิธี PCR พบว่าได้ผลบวก 21 ตัวอย่าง ได้ผลลบ 29 ตัวอย่าง sensitivity ร้อยละ 0, specificity ร้อยละ 58, positive predictive value ร้อยละ 0 และ negative predictive value ร้อยละ 100

มีการศึกษาประโยชน์ของ real-time PCR โดยใช้ 16S rDNA ในการตรวจสารคัดหลั่ง เช่น หนอง น้ำไขสันหลัง น้ำเจาะข้อ น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด เสมหะ เลือด พบว่าการเปลี่ยน variable region ของ primers ทำให้ระบุเชื้อได้แตกต่างกัน ผลการศึกษานี้สามารถระบุเชื้อได้ 18 สายพันธุ์ ซึ่งร้อยละ 73 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ร้อยละ 27 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Streptococcus* spp. พบร้อยละ 26 ของเชื้อทั้งหมด ส่วน *Staphylococcus* พบร้อยละ 14 และ *Bacillus* spp. พบร้อยละ 15 [89]

การใช้ board-spectrum PCR ร่วมกับ RNA sequencing[82] และ quantitative bacterial DNA PCR assays[83] อาจใช้ร่วมกับการเพาะเชื้อในผู้ป่วยที่กำลังได้รับหรือมีประวัติเคยได้ยาปฏิชีวนะมาก่อน โดยเฉพาะวิธี quantitative bacterial DNA PCR assays อาจช่วยบอกแนวโน้มการเกิดภาวะช่องท้องอักเสบซ้ำจากเชื้อชนิดเดิมหลังจากได้รับยาปฏิชีวนะจนหายแล้ว นอกจากนี้ยังมีวิธี matrix metalloproteinase-9 test และ in situ hybridization อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานสนับสนุนการตรวจเหล่านี้เพียงพอเพื่อใช้เป็นการตรวจมาตรฐานในเวชปฏิบัติ

2.7 การรักษาภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ

2.7.1 การให้ยาปฏิชีวนะเบื้องต้น (Empirical antibiotic)

การรักษาเป็นการให้ยาปฏิชีวนะในช่องท้อง ตาม ISPD ปี พ.ศ. 2553[4] แนะนำว่าการให้ยาปฏิชีวนะที่ครอบคลุมทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุการติดเชื้อภายในช่องท้องในครั้งนี้ก่อนทราบผลเพาะเชื้อที่แน่ชัด และควรเริ่มยาทันทีหลังจากเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อเสร็จ ยาปฏิชีวนะที่ให้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่พบบ่อยและความไวต่อยาปฏิชีวนะของแต่ละสถานพยาบาล

สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก ควรให้ยากลุ่ม cephalosporin รุ่นแรก เช่น cefazolin หรือ cephalothin หรือใช้ยา vancomycin[90, 91] ในสถาบันที่มีอัตราการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งดื้อยา methicillin สูง ควรใช้ vancomycin เพื่อครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในเบื้องต้น และให้ยาปฏิชีวนะเพื่อครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะ *pseudomonas* spp. อาจเลือกใช้ยากลุ่ม aminoglycoside, ceftazidime, cefepime หรือ carbapenem ส่วน quinolone แนะนำให้ใช้เฉพาะในสถาบันที่มีอัตราการดื้อต่อยากลุ่มนี้ต่ำ ถ้าผู้ป่วยแพ้ยากลุ่ม cephalosporins อาจเลือกใช้ aztreonam แทน ceftazidime หรือ cefepime และเฝ้าระวังการใช้ยากับเชื้อที่ไวต่อการดื้อยา

การใช้ยาในกลุ่ม aminoglycoides เป็นระยะเวลานานมีผลให้เกิด vestibular และ ototoxicity แต่การใช้เพียงระยะสั้นมีความปลอดภัยไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไตที่เหลืออยู่ (residual renal function: RRF)[92, 93] และมีฤทธิ์คลอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้ยาซ้ำหลายครั้งหรือให้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน เช่น นานกว่า 2 สัปดาห์

สูตรของยาปฏิชีวนะที่ใช้ร่วมกันในเบื้องต้นมีหลายชนิด ในทางปฏิบัติอาจเลือกให้ IP cefazolin ร่วมกับ ceftazidime หรือ IP cefazolin ร่วมกับ netilmicin เนื่องจากประสิทธิภาพในการรักษาเบื้องต้นเท่ากัน และมีผลกระทบต่อปริมาณปัสสาวะที่เหลืออยู่ไม่แตกต่างกัน[94, 95] กรณีสงสัยเชื้อดื้อยาอาจพิจารณาเลือก iv vancomycin ร่วมกับ ciprofloxacin รับประทาน[96] หรือ cefazolin ร่วมกับ ciprofloxacin[97] หรือ meropenem ร่วมกับ tobramycin แล้วตามด้วยการให้ meropenem ร่วมกับ vancomycin[98] ส่วนสูตรการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวให้ครอบคลุมทั้ง

แบคทีเรียแกรมบวกและลบ ที่มีรายงานการศึกษาแบบสุ่ม เช่น imipenem/cilastin[99]หรือ cefepime[100] เป็นต้น

หากต้องการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว อาจเลือกใช้ imipenem/cilastin 500 มิลลิกรัม IP ค้างท้อง 6 ชั่วโมง ตามด้วย IP 100 มิลลิกรัม/2 ลิตร[99] พบว่าประสิทธิภาพเท่ากับ cefazolin ร่วมกับ ceftazidime หรือให้ cefepime 2 กรัม IP ค้างท้องนานมากกว่า 6 ชั่วโมง ตามด้วย IP 1 กรัม/วัน เป็นเวลา 9 วันติดกัน สำหรับยาปฏิชีวนะในรูปแบบรับประทาน ได้แก่ กลุ่ม quinolones ขนาดที่ให้คือ levofloxacin 250 มก. หรือ ciprofloxacin 400 มิลลิกรัม รับประทานวันละหนึ่งครั้ง สามารถใช้เพื่อครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแทนยากลุ่ม aminoglycosides ได้[101-103]) Chan และคณะ[104]ทำการศึกษาแบบสุ่มเปรียบเทียบพบว่าการให้ ciprofloxacin 400 มิลลิกรัม รับประทาน 1 ครั้ง แล้วตามด้วย ciprofloxacin 300 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 1 ครั้ง ก็มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับการรักษาด้วย cephalothin และ tobramycin ที่ผสมและให้ร่วมกันในน้ำยาล้างช่องท้องทุกถุง อย่างไรก็ตาม ciprofloxacin ไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นยาปฏิชีวนะเดี่ยวสำหรับรักษาการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* เนื่องจากเชื้อมีอัตราตอบสนองต่อยาช้า[105]

2.7.2 การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหลังทราบผลเพาะเชื้อ[4] (specific antibiotic)

เป็นการปรับยาปฏิชีวนะให้จำเพาะและตามความไวของเชื้อภายหลังที่บริหารด้วยยา empirical antibiotic ส่วนใหญ่ทราบผลเพาะเชื้อหลัง 24-48 ชั่วโมงไปแล้ว

1) แบคทีเรียแกรมบวก แบ่งการรักษาออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

ก. Coagulase-negative *Staphylococcus* (*CoNS*)[106, 107]

เชื้อที่พบบ่อยได้แก่ *S. epidermidis* สาเหตุการติดเชื้อมักเกิดจากการปนเปื้อนขณะเปลี่ยนถ่ายน้ำยาหรือร่วมกับการติดเชื้อของช่องทางออกของสาย ควรซักประวัติเหล่านี้และตรวจดูช่องทางออกของสายเสมอ มักก่อให้เกิดอาการทางคลินิกไม่รุนแรง และตอบสนองดีต่อยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามมักทำให้เกิดช่องท้องอักเสบกลับเป็นซ้ำในภายหลังเนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง biofilm ได้ ควรเลือกยาปฏิชีวนะตามความไวของเชื้อ การรักษาเป็นการให้ยากลุ่ม cephalosporins ได้แก่ cefazolin แนะนำให้ยาทางช่องท้องและควรผสมในน้ำยาทุกถุง หากมีอัตราการดื้อต่อยา methicillin สูง ให้การรักษาด้วย vancomycin และตรวจหาการดื้อยา พร้อมทั้งหาระดับยาต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimal inhibitory concentration) ด้วย ระยะเวลาการให้ยาปฏิชีวนะ คือ 14 วัน แต่ถ้ามีการติดเชื้อของช่องทางออกของสายล้างช่องท้องร่วมด้วย ควรพิจารณาผ่าตัดสายล้างช่องท้องออก และให้ยาปฏิชีวนะนาน 14 วัน ถ้าภายหลังจากหายแล้วและมีเกิดภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อนี้ซ้ำอีก แสดงถึงการมีเชื้อเกาะอยู่บริเวณสายล้างช่องท้องจำเป็นต้องผ่าตัดเอาสายล้างช่องท้องออก การเอาสายล้างช่องท้องเดิมออกสามารถทำพร้อมกับวางสายใหม่ได้ใน

การผ่าตัดครั้งเดียวกันในขณะที่ได้รับยาปฏิชีวนะและจำนวนเม็ดเลือดขาวในน้ำยาล้างช่องท้องลดลงแล้ว

ข. *Corynebacterium* spp.[108]

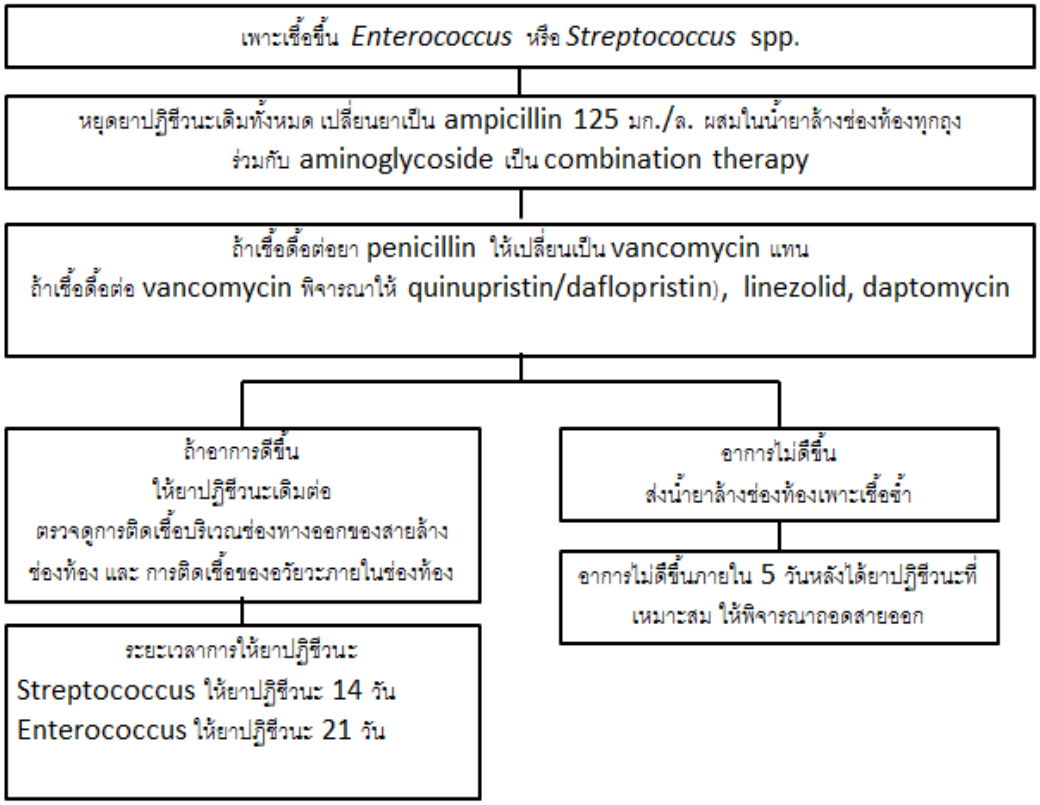
เป็นเชื้อที่มักพบบริเวณผิวหนังเช่นเดียวกับ coagulase-negative *Staphylococcus* การรักษาพิจารณาตามความไวต่อยาปฏิชีวนะ และให้ยาเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ แต่หากเชื้อกลับเป็นซ้ำ พิจารณาให้ IP vancomycin เป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์ หากดื้อต่อการรักษาให้ถอดสายออก จากข้อมูลประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์[108, 109] พบว่าผลการรักษาของเชื้อกลุ่มนี้มีอัตราการหายโดยรวม ร้อยละ 67 และพบว่าเป็นสาเหตุของการกลับเป็นซ้ำหลังจากสิ้นสุดการรักษาภายใน 4 สัปดาห์ ร้อยละ 18 กลับเป็นซ้ำภายหลัง 4 สัปดาห์ ร้อยละ 15 อัตราการนอนโรงพยาบาล ร้อยละ 70 อัตราการเอาสายล้างช่องท้องออก ร้อยละ 21 เปลี่ยนวิธีบำบัดทดแทนไต ร้อยละ 15 และเสียชีวิต ร้อยละ 2

ค. *Enterococcus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทรงกลมไม่พึ่งออกซิเจน เชื้อที่พบบ่อยได้แก่ *E. faecalis* และ*E. faecium* เชื้อชอบอาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร ภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อกลุ่มนี้มักมีอาการปวดท้องรุนแรง ไม่ค่อยกลับมาเป็นซ้ำ ควรค้นหาแหล่งของการติดเชื้อนอกเหนือจากทางเดินอาหาร เช่น ในช่องปาก และสายที่ใส่ในตัวผู้ป่วย (catheter-related route) มักจะตอบสนองดีต่อการรักษา มีอัตราการเอาสายล้างช่องท้องออกร้อยละ 37 และเสียชีวิตร้อยละ 4[110, 111] ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมคือ ampicillin บริหารยาทางช่องท้องโดยผสมในน้ำยาล้างช่องท้องทุกถุง ความเข้มข้น 125 มก./ลิตร ร่วมกับให้ gentamicin 20 มก./ลิตร ผสมค้างในช่องท้องวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ ถ้าไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลังได้รับยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมไปแล้ว 5 วัน การเอาสายล้างช่องท้องออกภายใน 1 สัปดาห์สามารถลดความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนวิธีบำบัดทดแทนไตด้วยการฟอกเลือดอย่างถาวรได้[112] แนวทางการรักษาการติดเชื้อกลุ่มนี้แสดงในแผนภูมิที่ 2

Chulalongkorn University

แผนภูมที่ 2 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อกลุ่ม *Enterococcus* และ *Streptococcus* spp



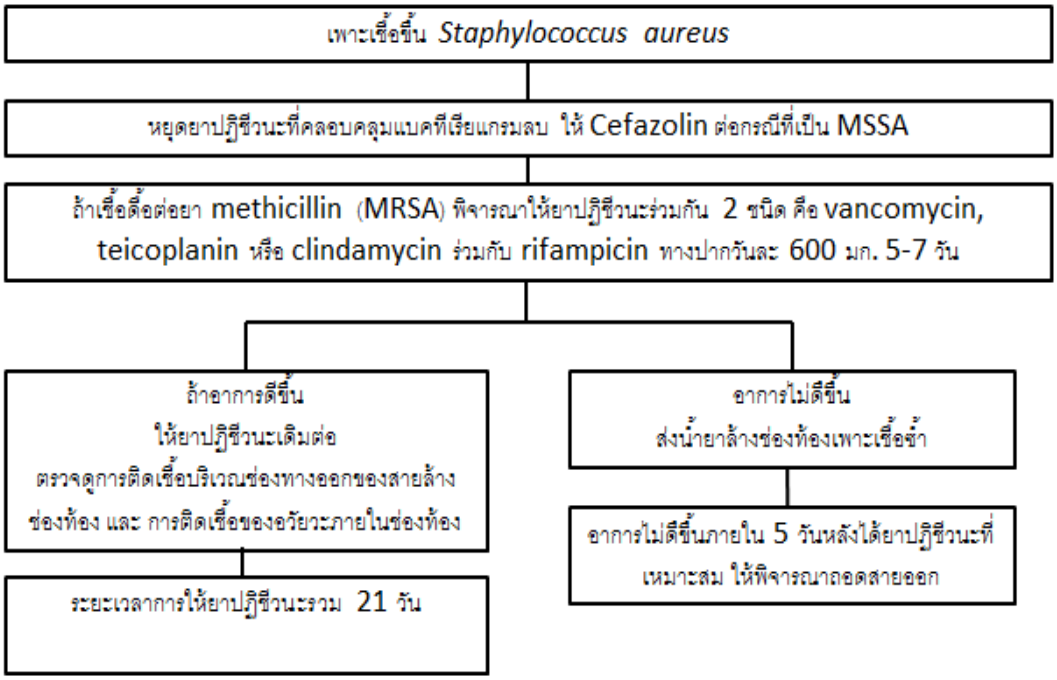
ง. Non-enterococci *streptococcus*

มักก่อให้เกิดอาการปวดท้องอย่างรุนแรง ตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย cephalosporin และ vancomycin มีอุบัติการณ์การเกิดเป็นซ้ำน้อย ยกเว้น *viridians streptococcus* [113] แนะนำให้ยา cefazolin 2 สัปดาห์ และค้นหาแหล่งของการติดเชื้อโดยเฉพาะการติดเชื้อในช่องปาก และควรตรวจ echocardiogram และ colonoscope เพื่อหาหลักฐานการติดเชื้อที่สัมพันธ์กับ infective endocarditis และ colorectal cancer

จ. *Staphylococcus aureus*

อาจเกิดร่วมกับการติดเชื้อบริเวณช่องทางออกของสายล้างช่องท้อง แนะนำรักษาด้วยยา cefazolin บริหารยาทางช่องท้องเป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์ ซึ่งถ้ามีการติดเชื้อของช่องทางออกของสายล้างช่องท้องร่วมด้วยจำเป็นต้องผ่าตัดเอาสายล้างช่องท้องออกด้วย เนื่องจากมักไม่ตอบสนองต่อการรักษา หลังจากเอาสายล้างช่องท้องออกควรพักช่องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นสามารถวางสายล้างช่องท้องใหม่ แนวทางการรักษาการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* แสดงในแผนภูมิที่ 3

แผนภูมที่ 3 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อจาก *Staphylococcus aureus*



ถ้าเชื้อดื้อต่อยา methicillin (MRSA) ให้พิจารณาใช้ยา vancomycin[114, 115] และในกรณี vancomycin-resistant *S. aureus* ควรพิจารณาให้ linezolid, daptomycin หรือ quinupristin/dalfopristin การให้ rifampicin สามารถให้เพื่อเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะหลักได้ แต่ในประเทศที่มีความชุกของเชื้อวัณโรคสูง เช่น ประเทศไทย ไม่แนะนำให้ใช้เนื่องจากอาจทำให้เกิดภาวะเชื้อวัณโรคดื้อยาได้

2) แบคทีเรียแกรมลบ แบ่งการรักษาออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

ก. *Pseudomonas aeruginosa* [4, 116]

ภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อ *Pseudomonas* spp. มีอัตราการนอนโรงพยาบาลสูง เสี่ยงต่อการเอาสายล้างช่องท้องออกและการเปลี่ยนวิธีบำบัดทดแทนไต[116] การรักษาควรให้ยาปฏิชีวนะซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกันสองชนิดร่วมกันเป็นระยะเวลานาน 21 วัน ยาปฏิชีวนะที่ครอบคลุมเชื้อนี้ได้แก่ quinolone, ceftazidime, cefoperazone/sulbactam, cefepime, tobramycin, piperacillin, amikacin

ภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อชนิดนี้มักสัมพันธ์กับการติดเชื้อกับของสายล้างช่องท้อง ถ้ามีการติดเชื้อของสายล้างช่องท้องนำมาก่อนเกิดภาวะช่องท้องอักเสบควรผ่าตัดเอาสายล้างช่องท้องออก พักช่องท้องและให้ยาปฏิชีวนะต่อ 2 สัปดาห์ นอกจากกรณีข้างต้นแล้ว ยังควรเอาสายล้างช่องท้อง

ออกในกรณีมีการติดเชื้อบริเวณช่องทางออกของสายล้างช่องท้องจากเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อการรักษาหรือกลับเป็นซ้ำ

ข. แบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *pseudomonas* spp. (Enterobacteriaceae) [117, 118] ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. หรือ *Proteus* spp. การติดเชื้ออาจเกิดได้จากการปนเปื้อนขณะเปลี่ยนถ่ายน้ำยาล้างช่องท้อง การติดเชื้อของช่องทางออกของสาย หรือเชื้อแทรกตัวออกมาจากผนังของอวัยวะภายในช่องท้องในขณะที่ผู้ป่วยมีอาการท้องผูก ลำไส้อักเสบ เป็นต้น การรักษาเลือกยาปฏิชีวนะตามความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ แต่ถ้าเชื้อมีการสร้าง biofilm อาจทำให้ดื้อต่อการรักษาทั้งๆที่ผลทางห้องปฏิบัติการแสดงว่าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ให้[44, 119] เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม SPICE organisms ซึ่งประกอบด้วย *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., indol-positive organism เช่น *Providentia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้เพิ่มโอกาสติดเชื้อซ้ำ และผลการรักษาด้อยกว่าภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

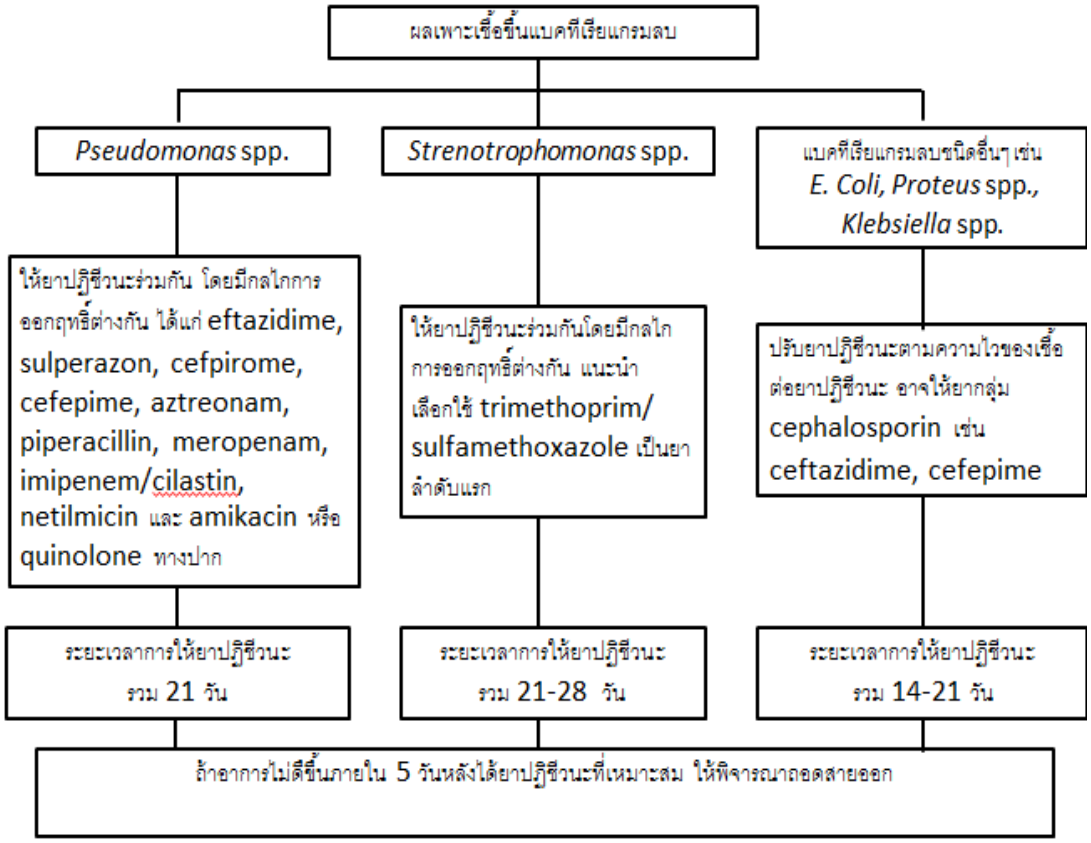
ภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อ *Stenotrophomomas* spp. แม้ว่าได้พบไม่บ่อย แต่ควรให้ความสำคัญ เนื่องจากมักดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั่วไป[120, 121] การติดเชื้อไม่รุนแรงเท่าเชื้อ *Pseudomonas* spp. และไม่สัมพันธ์กับการติดเชื้อบริเวณช่องทางออกของสายล้างช่องท้อง ยาปฏิชีวนะที่ให้ขึ้นอยู่กับผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ ยาปฏิชีวนะที่แนะนำคือ trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ minocycline บริหารยาโดยการรับประทาน หรือให้ ticarcillin/clavulanate ทางช่องท้อง ควรให้ยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน 3 ถึง 4 สัปดาห์

ค. *Pasteurella multocida*[122, 123]

เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิด coccobacilli ชอบอาศัยอยู่ในโพรงจมูก เหงือกและทอนซิลของสุนัขและแมว จึงปนเปื้อนเข้าไปในช่องท้องโดยการกัดหรือขีดข่วนที่สายและอุปกรณ์การเปลี่ยนถ่าย มักตอบสนองได้ดีต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิด amoxiciilin, tetracycline, fluoroquinolones และtrimethoprim/sulfamethoxazole โดยให้ยาเป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 2-3 สัปดาห์

แนวทางการรักษาภาวะช่องท้องอักเสบจากแบคทีเรียกลุ่มนี้แสดงดังแผนภูมิที่ 4

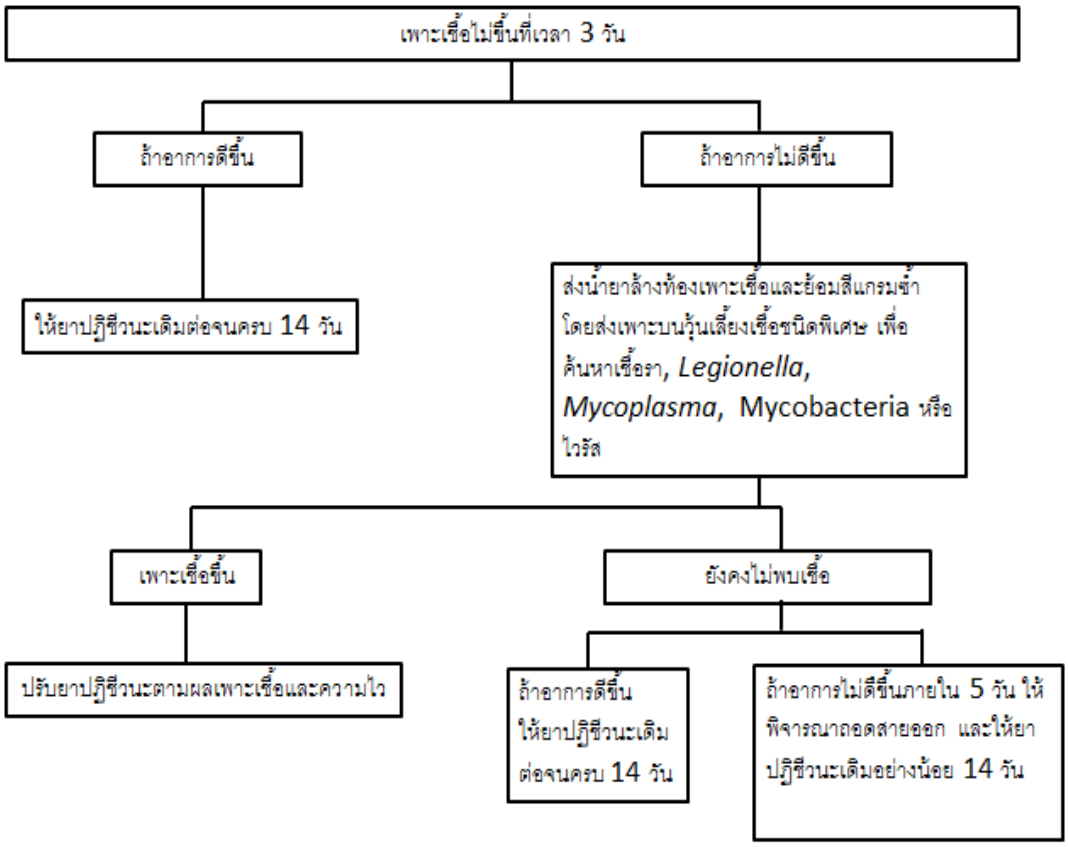
แผนภูมที่ 4 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ



3) เพาะไม่ขึ้นเชื้อ (Culture-negative peritonitis)[4]

ภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ แต่เพาะไม่ขึ้นเชื้อเกิดได้จากหลายสาเหตุ อาจเกิดจากขั้นตอนหรือวิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจรวมไปถึงการเคยได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน[6] หลังจากส่งเพาะเชื้อไปแล้ว 3 วัน ถ้าเชื้อไม่ขึ้นและผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษา ควรติดต่อห้องปฏิบัติการเพื่อส่งน้ำยาล้างช่องท้องเพาะเชื้อซ้ำ โดยเพาะเชื้อกลุ่มที่เพาะขึ้นได้ยากหรือเจริญเติบโตช้า เช่น เชื้อแบคทีเรียซึ่งมีอัตราการเติบโตช้า *Legionella* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp. เชื้อราและไมโคแบคทีเรีย กรณีที่ผู้ป่วยตอบสนองต่อการรักษา ควรให้ยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดต่อจนครบ 2 สัปดาห์ กรณีตอบสนองไม่ดีหลังให้การรักษาไปแล้วเป็นเวลา 5 วัน ควรพิจารณาผ่าตัดเอาสายล้างช่องท้องออกและให้ยาปฏิชีวนะต่ออย่างน้อย 14 วัน ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อในช่องท้องชนิดผลเพาะเชื้อเป็นลบนั้นมีความสำเร็จสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงอัตราการเสียชีวิต[124, 125] และเปลี่ยนวิธีการรักษาเป็นการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม คำแนะนำการรักษาภาวะช่องท้องอักเสบชนิดเพาะไม่ขึ้นเชื้อแสดงในแผนภูมิที่ 5

แผนภูมที่ 5 แสดงแนวทางการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อชนิดเพาะไม่ขึ้นเชื้อ



4) เพาะเชื้อพบแบคทีเรียร่วมกันหลายชนิด[4, 112, 126]

ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae, anaerobic coccobacilli หรือ *Bacteroides* ภาวะที่พบได้แก่ ลำไส้อักเสบ ลำไส้ขาดเลือด ถุงน้ำดีอักเสบ ไส้ติ่งอักเสบ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีความดันโลหิตต่ำ ภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต เลือดมีความเป็นกรดสูง และ/หรือ มีระดับ amylase ในน้ำยาล้างช่องท้องสูง ควรคิดถึงสาเหตุช่องท้องอักเสบที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดก่อนสาเหตุอื่นเสมอ[127] การย้อมสีแกรมของน้ำยาล้างช่องท้องพบแบคทีเรียหลายชนิดอาจมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยภาวะนี้ตั้งแต่ต้น การส่งเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ช่องท้องอาจช่วยค้นหาตำแหน่งที่มีพยาธิสภาพได้ ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม คือ metronidazole ร่วมกับ ampicillin และ ceftazidime หรือ aminoglycoside โดยให้ทางหลอดเลือดดำ และจำเป็นต้องผ่าตัดเอาสายล้างช่องท้องออก

5) เชื้อรา

อาจเกิดจากเชื้อราชนิดเซลล์เดียว (yeast) หรือราสาย (mold) เชื้อที่พบบ่อยที่สุด คือ *Candida* spp.[128-130] แบ่งเป็น *C. albicans* (ร้อยละ 14-35)[131, 132] และ non-albicans *Candida* (ร้อยละ 34-60)[133, 134] เช่น *C. glabrata, C. parasilosis*, *C. tropicalis* และ *C. krusei* เป็นการติดเชื้อที่รุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูง (ร้อยละ 15-50) ปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ ได้แก่ เคยได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน เคยติดเชื้อแบคทีเรียในช่องท้องมาก่อน[135] ผ่านการทำหัตถการทางลำไส้ เป็นต้น โดยเชื้อราสามารถเข้าสู่ช่องท้องได้หลายช่องทาง ได้แก่ จากการปนเปื้อน จากเชื้อราที่เพิ่มจำนวนขึ้นในลำไส้แทรกผ่านผนังเข้าสู่ช่องท้องเมื่อมีท้องผูกหรือมีการแตกทะลุของลำไส้ หรือตามหลังการติดเชื้อในช่องคลอดจากเชื้อรา[136] เนื่องจากการรักษาด้วยยาฆ่าเชื้อราให้ผลสำเร็จต่ำ มีอัตราการเสียชีวิตและการกลับเป็นซ้ำสูง จึงแนะนำถอดสายล้างช่องท้องออกและให้ยา amphotericin B ทางหลอดเลือดดำร่วมกับ flucytosine รับประทาน เป็นระยะเวลานาน 4-6 สัปดาห์[4] ส่วนการให้ยาป้องกันการเกิดภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อรา ควรให้การป้องกันด้วยยาฆ่าเชื้อราเฉพาะในสถาบันที่มีอัตราการเกิดภาวะนี้สูง[137-139] ยาฆ่าเชื้อราที่ใช้สำหรับป้องกัน คือ nystatin หรือ fluconazole โดยให้แก่ผู้ป่วยทุกรายตลอดระยะเวลาที่ได้รับ broad-spectrum antibiotics

6) เชื้อไมโคแบคทีเรียหรือวัณโรค

ควรสงสัยเมื่อทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียหลายครั้งแล้วไม่พบเชื้อหรือพบเชื้อแต่ดื้อต่อการรักษาที่จำเพาะ มักไม่ได้ประโยชน์จากการถ่ายภาพรังสีปอดเพื่อค้นหาวัณโรค แต่อาจจะได้ประโยชน์จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุช่องท้องและ omentum เพื่อตรวจหาพยาธิสภาพ เช่น caceous necrosis, granuloma และการย้อม acid-fast[140, 141] การรักษาแนะนำให้เริ่มรักษาด้วยยา 4 ชนิด คือ isoniazid, rifampin, pyrazinamide และ ofloxacin นาน 3 เดือน หลีกเลี่ยง streptomycin และ ethambutol เนื่องจากมีผลข้างเคียงต่อระบบการได้ยินและการมองเห็น (optic neuritis) ตามลำดับ หลังจากนั้นลดยาเหลือเพียง isoniazid และ rifampin ร่วมกับ pyridoxine 50-100 มก./วัน รวมเป็นระยะเวลา 12 เดือน หนึ่งในสามของผู้ป่วยสามารถรักษาให้หายขาดโดยไม่จำเป็นต้องถอดสาย มีรายงานอัตราการเสียชีวิตถึงร้อยละ 40[140]

2.7.3 คำแนะนำการใช้และขนาดของยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาภาวะช่องท้องอักเสบจากเชื้อแบคทีเรีย

ควรให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องที่สงสัยว่ามีภาวะช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อโดยเร็วที่สุดเท่าที่ทำได้หลังจากเก็บสิ่งส่งตรวจเพาะเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยไม่ต้องรอผลเพาะเชื้อ และการบริหารยาปฏิชีวนะทางช่องท้องให้ผลการรักษาดีกว่าการให้ยาทางหลอดเลือดดำ ส่วนการผสมยาปฏิชีวนะในน้ำยาล้างช่องท้องทุกถุงมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการให้ยาปฏิชีวนะวันละหนึ่งครั้งโดยค้างในช่องท้องนานอย่างน้อย 6 ชั่วโมง[91] การให้ยาปฏิชีวนะร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดแม้ว่าบางชนิดสามารถผสมร่วมในน้ำยาล้างช่องท้องถุงเดียวกันได้ แต่ไม่ควรผสมยาปฏิชีวนะใน

หลอดฉีดยาเดียวกัน ยา vancomycin, aminoglycosides และ cephalosporins สามารถผสมร่วมในน้ำยาล้างช่องท้องถุงเดียวกันได้โดยไม่สูญเสียประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แต่ห้ามผสม aminoglycoside ร่วมกับยาในกลุ่ม penicillins เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีไม่เข้ากัน ส่วน vancomycin และ ceftazidime ผสมในน้ำยาล้างช่องท้องถุงเดียวกันได้แต่ต้องมีปริมาณน้ำยาอยู่ในถุงมากกว่า 1 ลิตรขึ้นไป

การบริหารยาปฏิชีวนะทางช่องท้องแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ 1) การบริหารแบบต่อเนื่อง (continuous dosing) คือ การบริหารยาในทุกรอบของการเปลี่ยนถ่ายน้ำยา โดย loading dose ในครั้งแรกที่บริหารยาด้วยการผสมยาในขนาดที่สูงกว่าขนาดมาตรฐาน 2-4 เท่า แล้วต่อด้วยขนาดยาที่ปกติในรอบถัดๆไป (maintenance dose) 2) การบริหารแบบครั้งคราว (intermittent dosing) คือ การบริหารยาลงในถุงน้ำยาวันละ 1 รอบโดยให้ยาในรอบที่ค้างน้ำยาในช่องท้องนานที่สุดของวัน (อย่างน้อย 6 ชั่วโมง)[4] เพื่อให้ยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดมากที่สุด

ขนาดของยาปฏิชีวนะที่บริหารทางช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องด้วยตนเองแสดงในตารางที่ 1 ส่วนขนาดของยาปฏิชีวนะที่บริหารทางช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องด้วยเครื่องอัตโนมัติแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของยาปฏิชีวนะสำหรับบริหารทางช่องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องด้วยตนเอง

ยาปฏิชีวนะ	Intermittent dosing (1 ถุง/วัน)	Continuous dosing (มก./ลิตร)
Aminoglycosides		
Amikacin	2 มก./กก.	LD 25, MD 12
Gentamicin, Netilmicin, tobramycin	0.6 มก./กก.	LD 8, MD 4
Cephalosporins	15 มก./กก.	LD 500, MD 125
Cefazolin, Cephalothin, Cephradine	1,000 มก.	LD 500, MD 125
	1,000 – 1,500 มก.	LD 500, MD 125
Cefepime	1,000 มก.	LD 250, MD 125
Ceftazidime		
Ceftizoxime	ND	LD 250–500, MD 50
Penicillins	ND	MD 125
Amoxicillin Azlocillin	ND	LD 500, MD 250
Ampicillin, oxacillin, or	ND	LD 50000 ยูนิต , MD

ยาปฏิชีวนะ	Intermittent dosing (1 ถุง/วัน)	Continuous dosing (มก./ลิตร)
nafcillin		25000 ยูนิต
Azlocillin	ND	LD 50, MD 25
Penicillin G		
Quinolones	ND	LD 1000, MD 250
Ciprofloxacin	ND	LD 100, MD 20
Others	รับประทาน 200–300 มก.	รับประทาน 200–300
Aztreonam	q.d.	มก. q.d.
Daptomycin	15 มก./กก.	LD 400, MD 20
Linezolid	15–30 มก./กก.ทุก 5–7 วัน	LD 1000, MD 25
Teicoplanin		
Vancomycin	NA	1.5
Antifungals	200 มก. IP ทุก 24–48 ชั่วโมง	
Amphotericin		
Fluconazole hours	2 ก. ทุก 12 ชั่วโมง	LD 1000, MD 100
Combinations	1 ก. b.i.d.	LD 250, MD 50
Ampicillin/sulbactam	25 มก./ล. in alternate bags	
Imipenem/cilastin	รับประทาน 960 มก. b.i.d.	รับประทาน 960 มก.
Quinupristin/dalfopristin		b.i.d.
Trimethoprim/sulfamethoxaz		
ole		

ND คือ ไม่มีข้อมูล, q.d. คือ ทุกวัน, b.i.d.คือ วันละ 2 ครั้ง, IP คือ การบริหารยาทางช่องท้อง, LD (Loading dose) คือ ขนาดยาที่ให้เป็นครั้งแรก, MD (Maintenance dose) คือ ขนาดยาที่ให้ต่อจากครั้งแรก

ถ้าผู้ป่วยมีปริมาณปัสสาวะมากกว่า 100 มล.ต่อวัน ควรเพิ่มขนาดยาขึ้นร้อยละ 25

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของยาปฏิชีวนะที่บริหารทางช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องด้วยเครื่องอัตโนมัติ

ยาปฏิชีวนะ	ขนาด intermittent IP dosing ที่แนะนำ
Cefazolin	20 มก./กก.วันละครั้ง
Cefepime	1 กรัม วันละครั้ง
Fluconazole	200 มก. ทุก 24–48 ชั่วโมง
Tobramycin	LD 1.5 มก./กก.ตามด้วย 0.5 มก./กก.
Vancomycin	LD 30 มก./กก. ตามด้วย 15 มก./กก. ทุก 3–5 วัน (รักษาให้พลาสมา trough levels ≥ 15 มก./ดล.)

คำย่อ IP = intraperitoneal; LD (Loading dose) คือ ขนาดยาที่ให้เป็นครั้งแรก, MD (Maintenance dose) คือ ขนาดยาที่ให้ต่อจากครั้งแรก

ควรผสมยาปฏิชีวนะในถุงที่ค้างช่องท้องนานที่สุดจากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นจะเห็นได้ว่า ภาวะติดเชื้อในช่องท้องมีอัตราการกลับเป็นซ้ำ การถอดสายออก การเปลี่ยนวิธีการบำบัดทดแทนไต และการเสียชีวิตได้ ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการเพาะเชื้อไม่ถึงร้อยละ 40[5] ก็ตาม ซึ่งสาเหตุที่ผลการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจไม่ขึ้น อาจเกิดจากปริมาณน้ำในช่องท้องที่ส่งตรวจมีปริมาณน้อย วิธีการเก็บส่งตรวจไม่ได้มาตรฐาน ปริมาณเชื้อน้อยเกินไป ตัวเชื้อเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตยาก (fastidious microorganism) อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อด้วยวิธีอื่นกับการเพาะเชื้อซึ่งเป็นการตรวจมาตรฐาน จึงเป็นเหตุผลให้ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยนี้เพื่อหาวิธีการตรวจน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาภาวะช่องท้องติดเชื้อ โดยอยู่บนแนวคิดที่ว่าการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) อาจนำมาช่วยวิเคราะห์แยกเชื้อร่วมกับการเพาะเชื้อ เพื่อให้ทราบเชื้อโดยเร็วและถูกต้อง เพื่อนำไปสู่การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ทำให้ภาวะติดเชื้อหายได้ภายในระยะเวลาอันสั้น นำไปสู่การลดการเสื่อมของผนังหน้าท้องผู้ป่วยสามารถใช้การบำบัดทดแทนไตทางหน้าท้องได้ยาวนานขึ้น ลดอัตราการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ตลอดจนลดอัตราการเสียชีวิตและงบประมาณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย (Procedure)

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

Diagnostic test, interventional study

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

3.2.1 ประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง

3.2.2 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population) คือ ผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องจาก 5 โรงพยาบาล ดังต่อไปนี้ คือ

1) โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร
2) โรงพยาบาลบ้านแพ้ว องค์การมหาชน สาขาพร้อมมิตร กรุงเทพมหานคร
3) โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ.อุบลราชธานี
4) โรงพยาบาลพิจิตร จ.พิจิตร
5) โรงพยาบาลพระพุทธบาท จ.สระบุรี

โดยรวบรวมข้อมูล ตั้งแต่ เม.ย. 2556 ถึง ธ.ค. 2556

3.2.3 เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1) ผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องที่อายุมากกว่า 18 ปี
2) มีลักษณะทางคลินิกบ่งชี้การติดเชื้อในช่องท้อง ได้แก่ ปวดท้อง ไข้
3) พบน้ำยาขุ่นหรือตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 ตัว/ไมโครลิตร และมากกว่าร้อยละ 50 เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil

3.2.4 เกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

ไม่มี

3.2.5 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size determination)

ขนาดตัวอย่างจะได้มาจากการคำนวณโดยใช้สูตร $n = Z_{\alpha/2}^2 pq/d^2$

โดย α = 0.5 (two-tail) , Z = 1.96 เมื่อกำหนดความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

p = Sensitivity PCR ในการตรวจพบเชื้อเท่ากับร้อยละ 67(83)

q = 1-p = 1-0.67= 0.33

d = Acceptable error คิดเป็นร้อยละ 10

$n = (1.96)^2(0.67)(0.33)/(0.1)^2 = 84.9$

ผู้ที่เพาะเชื้อขึ้นเป็น 0.8

ดังนั้นผู้ทำวิจัยวางแผนจะใช้ขนาดตัวอย่างในการศึกษาประมาณ 106 คน

3.3 คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational definitions)

1) Infected continuous ambulatory peritoneal dialysis หมายถึง ภาวะติดเชื้อในช่องท้องของผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้อง สามารถให้การวินิจฉัยโดยการตรวจพบอาการและอาการแสดงทางคลินิก 2 ใน 3 ข้อ คือ

ก. อาการและอาการแสดงที่บ่งชี้ถึงการอักเสบของเยื่อบุผนังช่องท้อง ได้แก่ อาการปวดท้อง กดเจ็บทั่วๆไปของผิวหนังบริเวณหน้าท้อง และการตรวจพบ rebound tenderness

ข. น้ำยาล้างไตที่ถ่ายออกมาขุ่น (cloudy effluent) หรือมีเม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 ตัว/ไมโครลิตร หรือลูกบาศก์มิลลิเมตร ร่วมกับพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil มากกว่าร้อยละ 50

ค. ตรวจพบเชื้อก่อโรคจากการการย้อมสีแกรม หรือ การเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำยาล้างไตทางช่องท้องผลเพาะเชื้อขึ้น คือ การเพาะเชื้อในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อและมีเชื้อจุลชีพเจริญภายหลังการบ่มครบ 7 วัน

ผลเพาะเชื้อไม่ขึ้น คือ การเพาะเชื้อในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่มีเชื้อจุลชีพเจริญภายหลังการบ่มครบ 7 วัน

2) การหายจากการติดเชื้อ (Cure) คือ การที่ผู้ป่วยไม่มีอาการทางคลินิกของภาวะช่องท้องอักเสบและเพาะเชื้อแล้วไม่พบเชื้อจากน้ำยาล้างช่องท้อง

3) Refractory peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องจากการติดเชื้อที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา หลังจากให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมไปแล้วเกินกว่า 5 วัน

4) การกลับเป็นซ้ำ มี 3 ลักษณะ ได้แก่

ก. Recurrent peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดขึ้นซ้ำจากเชื้อก่อโรคตัวใหม่ภายใน 4 สัปดาห์ หลังจากสิ้นสุดการรักษาการติดเชื้อครั้งก่อน

ข. Relapsing peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดขึ้นซ้ำจากเชื้อก่อโรคตัวเดิมหรือไม่ทราบชนิดของเชื้อจากผลการเพาะเชื้อภายใน 4 สัปดาห์ หลังสิ้นสุดการรักษาการติดเชื้อครั้งก่อน

ค. Repeat peritonitis คือ ภาวะติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดขึ้นซ้ำจากเชื้อตัวเดิม หลังสิ้นสุดการรักษาครั้งก่อนไปแล้วมากกว่า 4 สัปดาห์

5) Polymerase chain reaction (PCR) คือ วิธีการตรวจทางอณูชีววิทยา (molecular technique) โดยการตรวจหาดีเอ็นเอ PCR ได้ผลบวก หมายถึง ถ้าความแตกต่างระหว่างค่า Crossing point (Cp) ของสารตัวอย่างและสารควบคุม (negative control) น้อยกว่า 3 cycles และ melting temperature (Tm) มี peak แยกกันชัดเจน แปลผลว่ามีเชื้อ PCR ได้ผลลบ หมายถึง ถ้าความแตกต่างระหว่างค่า Crossing point (Cp) ของสารตัวอย่างและสารควบคุม (negative control) น้อยกว่า 3 cycles แต่ melting temperature (Tm) มี peak แยกกันไม่ชัดเจนหรือติดกัน แปลผลว่ามีการปนเปื้อน

6) 16S rDNA คือ ยีนที่ควบคุมรหัสการสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA : rRNA) ซึ่งลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนนี้จะเป็นส่วนที่มีการอนุรักษ์ไว้ (conserved sequence)

3.4 การดำเนินการวิจัย

3.4.1 วิธีวิจัย

ผู้วิจัยทบทวนประวัติ การตรวจร่างกายและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง เมื่อเข้าเกณฑ์ที่เข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยให้ข้อมูลเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย เปิดโอกาสให้ผู้เข้าร่วมการวิจัยได้ทำความเข้าใจ ซักถามข้อสงสัย และตัดสินใจโดยอิสระ เมื่อผู้เข้าร่วมวิจัยตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย จึงลงนามหนังสือรับรองเข้าร่วมการศึกษา หลังจากนั้นรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง และเก็บน้ำยาในช่องท้องในผู้ป่วยที่ติดเชื้อส่งตรวจ PCR ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และนำผล PCR มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

3.4.2 เครื่องมือและวิธีการศึกษา

วิธีเก็บน้ำยาส่งตรวจ

- ให้ผู้ป่วยนำน้ำยามาทั้งถุง น้ำยาถุงแรกที่พบว่าขุ่นเป็นตัวอย่างที่ดีที่สุด เก็บสิ่งส่งตรวจและนำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด โดยน้ำยาต้องค้างในช่องท้องอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ถ้าไม่ได้น้ำยามาด้วยให้ใส่น้ำยาใหม่ปริมาณอย่างน้อย 1 ลิตร ค้างในช่องท้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำน้ำยาที่ได้มาเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยไม่ให้ยาปฏิชีวนะก่อนทำการเก็บสิ่งส่งตรวจ

การเก็บตัวอย่างน้ำยาเพื่อส่งตรวจ Cell diff/count แสดงในรูปที่ 3

- วางถุงน้ำยาบนโต๊ะสะอาดที่เช็ดด้วย 70% alcohol ซึ่งรอให้แห้งสนิทแล้ว
- ผู้เก็บสิ่งส่งตรวจสวม mask และล้างมือ หลังล้างมือแล้วไม่ควรจับสิ่งของอื่นอีก รวมทั้งเสื้อผ้า
- กลับถุงน้ำยา 2-3 ครั้ง เพื่อให้ตะกอนภายในถุงน้ำยากระจายตัว เช็ดจุกยางที่ปากถุงด้วย 10% povidone iodine ทิ้งไว้ 1 นาทีและตามด้วย 70% alcohol และรอให้แห้ง จากนั้นดูดน้ำยาจากถุง เพื่อส่ง cell diff/count/gram stain
- ควรส่งตัวอย่างน้ำยาไปยังห้องปฏิบัติการทันที และควรได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งเพาะเชื้อ แสดงในรูปที่ 4

- หลังจากส่ง cell diff/count ห้อยถุงน้ำยาที่ถ่ายให้ sampling port ลงต่ำ ตั้งทิ้งให้น้ำยาตกตะกอนอย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นส่งเพาะเชื้อ โดยการเปลี่ยนหัวเข็ม ป้ายจุกปิดขวดด้วย 10% povidone iodine รอให้แห้ง นำตะกอน 3 ถึง 5 มิลลิลิตรที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยาล้างช่องท้องปริมาณ 50 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที มาเจือจางในน้ำเกลือนอร์มัล ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการปั่นแยกตะกอนซ้ำ และนำตะกอนที่ได้ไปย้อมแกรมและเพาะเชื้อบน solid media และใส่ในขวด hemoculture ถ้าไม่สะดวกปั่นน้ำยา ให้ดูดตะกอนจากถุงน้ำยาที่แขวนโดยที่ส่วนต่อ (connecting part) ห้อยลงล่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วแบ่งฉีดลงในในขวด hemoculture ขวดละ 10 มิลลิลิตร 2 ขวด ถ้าไม่สามารถนำส่งห้องเพาะเชื้อได้ทันที ควรเก็บสิ่งส่งตรวจไว้ใน incubator ซึ่งตั้งอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

- นำส่งถุงน้ำยาทั้งถุงที่เหลือจากการเก็บน้ำยาส่งตรวจมาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทันทีโดยบรรจุในภาชนะอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส (ใส่ cold pack 2 อัน) เพื่อส่งตรวจเพาะเชื้อและส่ง PCR ที่ห้องปฏิบัติการ

- การส่งตรวจเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จะส่งตรวจเพาะเชื้อแบคทีเรีย ไมโคแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเก็บน้ำยาด้วยวิธีปลอดเชื้อใน sterile hood (class II cabinet) ใช้ syringe ขนาด 20 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างน้ำยาจากถุง ใส่ใน tube sterile ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยน้ำยา 3 หลอดแรกจะนำไปส่งเพาะเชื้อที่ห้องเพาะเชื้อรา ไมโคแบคทีเรีย และแบคทีเรีย ดังนี้

1) สำหรับเพาะเชื้อรา หลังจากปั่นตกตะกอนให้เท supernatant ออกโดยให้เหลือในหลอดประมาณ 4-5 มิลลิลิตร

2) สำหรับเพาะเชื้อไมโคแบคทีเรีย หลังจากปั่นตกตะกอนให้เท supernatant ออกโดยให้เหลือในหลอดประมาณ 1-2 มิลลิลิตร

3) สำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย หลังจากปั่นตกตะกอนให้เท supernatant ออกโดยให้เหลือในหลอดประมาณ 10 มิลลิลิตร แบ่งมา 1-2 มิลลิลิตรใส่ในขวดเพาะเชื้อ Bactec ที่เหลือแบ่งใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียแอโรบส์ ได้แก่ Sheep blood agar, chocolate agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่มีสารอาหารครบถ้วน และ MacConkey agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือกและแยกเชื้อ

4) สำหรับขวดเพาะเชื้อจะบ่มขวดอาหารในตู้บ่ม (incubator) ชนิดบรรยากาศปกติที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แต่สามารถดูผลเพาะเชื้อได้ภายใน 48 ชั่วโมงโดยสังเกตจากความขุ่น ถ้าขุ่นจะนำสารตัวอย่างมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป ถ้าไม่ขุ่นจะรายงานผลวันที่ 5 ว่าไม่ขึ้นเชื้อ (No growth)

5) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ถ้าขึ้นเชื้อจะจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยดูลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ขนาด รูปร่าง ลักษณะสี และความโปร่งแสงหรือทึบแสงของโคโลนี ลักษณะการติดสีแกรม (gram stain) ดูรูปร่าง ขนาด และการเรียงตัวของเซลล์ และการทดสอบชีวเคมี (biochemical test) แต่ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นจะบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ้าไม่มีเชื้อขึ้นอีกจะรายงานผลว่าไม่ขึ้นเชื้อ

1. อุปกรณ์ในการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจ **Dialysate cell count**	**2.** นำถุงน้ำยาล้างไตทางช่องท้องที่ปล่อยออกมาเขย่าให้ตะกอนกระจายตัว	**3.** ใช้ **10% Providone iodine** ทาฆ่าเชื้อบริเวณที่จะเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องทิ้งให้แห้งจึงเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง

รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจเซลล์

1. อุปกรณ์ในการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจเพาะเชื้อ	**2.** นำถุงน้ำยาล้างไตทางช่องท้องที่ปล่อยออกมาแขวนให้ตกตะกอน **30** นาที	**3.** ใช้ **10% Providone iodine** ทาฆ่าเชื้อบริเวณที่จะเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องทิ้งให้แห้งจึงเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้อง

รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการเก็บน้ำยาล้างไตทางช่องท้องส่งตรวจเพาะเชื้อ

น้ำยาอีก 4 หลอดเก็บตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) และ การทำ PCR ดังนี้

1) เก็บ supernatant ใน tube eppendorf หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด

2) เก็บ pullet 1 มิลลิลิตรที่ได้จากการปั่นตกตะกอน เก็บใส่ใน tube eppendorf 1 หลอด เพื่อสกัดดีเอ็นเอเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) การสกัด DNA เริ่มต้นด้วยการนำตัวอย่างน้ำยามาทำให้เซลล์แตก (cell lysis) เป็นการ

ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาวให้แตกออกและปล่อยสารพันธุกรรมออกมาละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์โดยใช้ lysis buffer คือ 5.0M NaCl 15 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 48 ไมโครลิตร และ10% SDS ปริมาณ 60 ไมโครลิตรหลังจากนั้นทำการย่อยโปรตีนด้วยน้ำยา proteinase K ความเข้มข้น 100 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงแยก DNA ด้วย phenol หรือ phenol-chloroform extraction โดยผสม cell lysate 1 มิลลิลิตรกับ phenol-chloroform ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมกันโดยใช้เครื่อง vortex mixer จากนั้นดูดแบ่งใส่ tube 2 หลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำให้แยกออกจากกันเป็น 2 ชั้นโดย phenol จะอยู่ชั้นล่างพร้อมกับโปรตีน ส่วน DNA จะละลายอยู่ในน้ำที่อยู่ชั้นบน จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่ tube ใหม่ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร นำมาเติม Absolute ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และ Sodium acetate ปริมาณ 60 ไมโครลิตร แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาเติม 70% ETOH ปริมาณ 500 ไมโครลิตรเพื่อเพิ่มความเข้มข้น ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง เหลือส่วนตะกอนวางทิ้งให้แห้ง เติมน้ำ 50 ไมโครลิตรในหลอดเพื่อ stock DNA ไว้ ตรวจดูความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยการวัด optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วย spectrophotometer โดย 1 OD ที่ 260 nm จะเป็น DNA 20 มก./มล. และ DNA ที่บริสุทธิ์ไม่มีสิ่งเจือปนควรมีอัตราส่วน OD260/OD280 เท่ากับ1.8[142-144]

4) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยวิธี real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ variable regions 528 base pairs และใช้ Primer ได้แก่ Reverse(536R) 5'-GTATTACCGCTGCTG-3' และ Forward(8F)5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' V1-3[89] เครื่องมือที่ใช้ในการทำ PCR คือ LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) เป็นเครื่องมือที่สามารถทำ PCR ได้ในปริมาตรน้อยมากใน glass capillary tubes ที่ถูกเสียบเข้าตามช่องใน carousel จำนวน 32 ช่อง ที่มี air stream ร้อนและเย็นผ่าน ทำให้เวลาที่ใช้ต่อหนึ่ง cycle ลดลงเหลือแค่เพียง 10 วินาที แต่ละรอบของ PCR สัญญาณ Fluorescence จะถูกอ่านจาก carousel ผ่าน light-emitting diode และ มี photo (detection) diode จำนวน 3 ตัว ทำให้สามารถอ่าน Fluorescent probe ที่ให้สัญญาณคลื่นที่ต่างกันได้

สารที่ต้องเตรียมสำหรับการทำ real-time PCR (LightCycler 2.0)[89, 145, 146] ได้แก่

Master Mix: TaKaRa SYBR® Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (Cat.RR420A)

สาร	ปริมาณ(ไมโครลิตร)	
SYBR Green Premix Ex Taq	10	
10 uM primer 8F	0.8	(ความเข้มข้น = 0.4 uM)
10 uM primer 536R	0.8	(ความเข้มข้น = 0.4 uM)
DNase-RNase free water	6.4	
Template DNA	2	
รวม	20	

ลำดับการทำ PCR

1. Denaturation	98 องศาเซลเซียส		2นาที
2. Amplification	95 องศาเซลเซียส		วินาที 10
	54 องศาเซลเซียส	40 cycles	15 วินาที
	72องศาเซลเซียส		
3. Melting	95องศาเซลเซียส		20วินาที
	60องศาเซลเซียส		5วินาที
	95องศาเซลเซียส		1วินาที
	(continuous, ramp rate = 0.2 องศาเซลเซียส/วินาที)		

Product size 528 base pairs

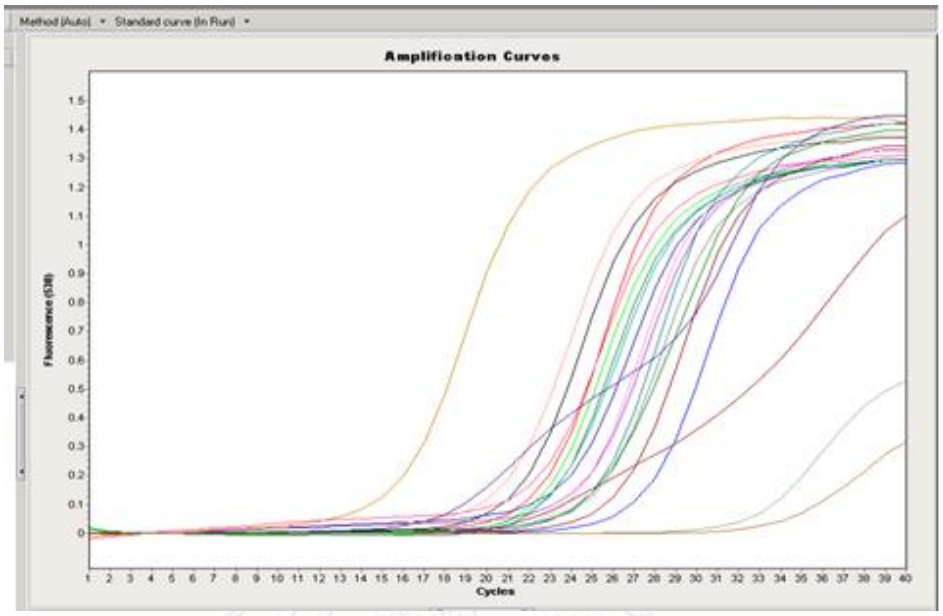
การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดย SYBR Green I Dye

ในช่วงของการ denature เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวนั้น SYBR Green I จะยังไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ SYBR Green I จะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV เมื่อรอบของ PCR กลับมาถึงช่วงการ denature อีกครั้ง SYBR Green I ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง ในกรณีที่มีดีเอ็นเอหลายชนิดปนกันอยู่ในตัวอย่าง เราสามารถแยกสัญญาณของ fluorescence ได้จากการเปรียบเทียบค่า Tm (melting temperature เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอที่มีหมู่เบสเป็นคู่สมกัน) เพราะ Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย ซึ่งแปรผันตรงกับเปอร์เซ็นต์ของเบส G และ C ที่อยู่ในสายดีเอ็นเอ (% GC content)

การวิเคราะห์ผล real-time PCR แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

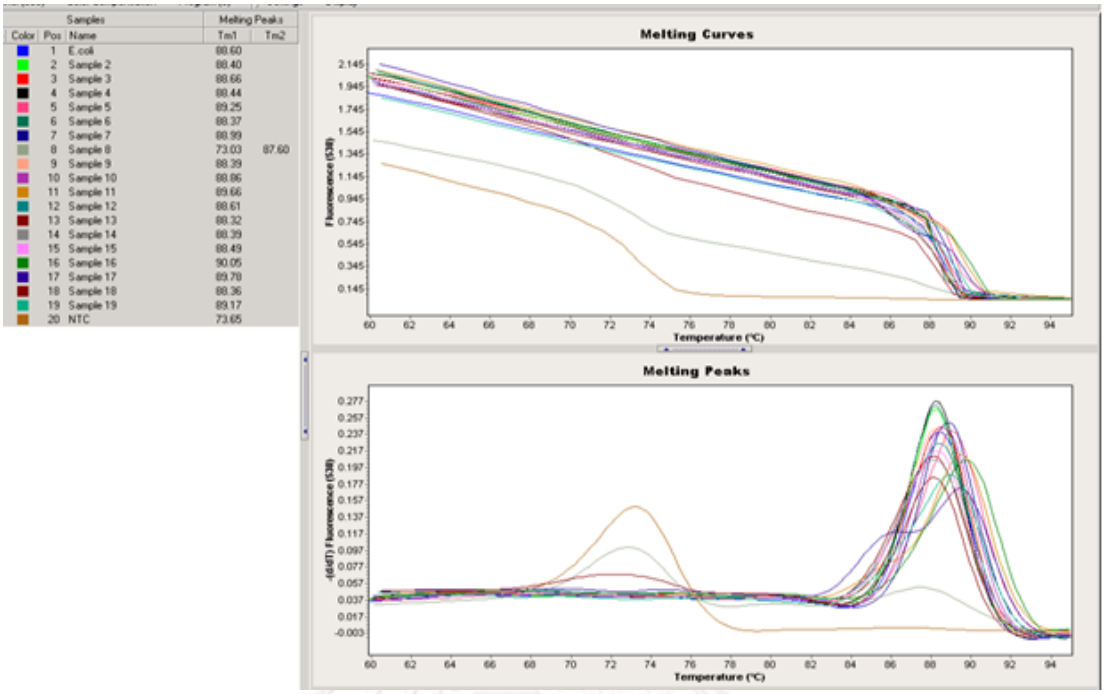
ก. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantification analysis) มีพื้นฐานที่การวัด fluorescence ของตัวเปล่งแสง (fluorophore) ในปฏิกิริยาในเชิงปริมาณ เราจะสามารถมองเห็นการเพิ่มของ product ได้ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในทุกรอบระหว่าง PCR (รูป S shape ของสัญญาณจะค่อยๆปรากฏเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบที่ทำ) และการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่

ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆทำโดยใช้คอมพิวเตอร์ทั้งหมด สัญญาณในช่วง exponential phase จะสัมพันธ์กับปริมาณตั้งต้นของ target template ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดง product DNA และจำนวนรอบ จากการทำ PCR

ข. การวิเคราะห์ Melting curve analysis เป็นการใช้เพื่อวิเคราะห์ PCR product ที่เกิดขึ้นหลังจากจบการทำ PCR โดย set ให้มีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆจนถึง 95 องศาเซลเซียส และวัดสัญญาณ fluorescence ตลอดเวลา ซึ่งสัญญาณจะค่อยๆลดลงเนื่องจาก PCR product ที่เป็นสายคู่แยกตัวออกจากกัน และ DNA จาก product แต่ละชนิด จะมี melting temperature เฉพาะตัว คือจุดที่คู่ base pair ของ nucleotide จะแยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด ทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างฉับพลัน ณ จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G และ C ที่มีใน DNA แต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้เพื่อแยก PCR product ออกจาก product ที่ปนเปื้อนได้ ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 9 เมื่อ software นำสัญญาณ fluorescence ที่วัดได้ที่แต่ละอุณหภูมิมาเปลี่ยนให้เป็นกราฟระหว่าง dF/dT กับอุณหภูมิดังในกรอบล่างของรูปที่ 6 จะได้เป็นรูป peak สำหรับ product แต่ละตัว ซึ่ง PCR product ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส) ในขณะที่ non-specific product หรือ primer-dimer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่าดังนั้น melting curve analysis ของ PCR product จึงมักใช้เพื่อยืนยันว่าเป็น product ที่ต้องการ ทำให้ไม่ต้อง run gel electrophoresis หลังจากการทำ PCR



รูปที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ Melting curve analysis

การแปลผล

- ถ้าความแตกต่างระหว่างค่า Crossing point (Cp) ของสารตัวอย่างและสารควบคุม (negative control) น้อยกว่า 3 cycles และ melting temperature (Tm) มี peak แยกกันชัดเจน แปลผลว่ามีเชื้อ
- ถ้าความแตกต่างระหว่างค่า Crossing point (Cp) ของสารตัวอย่างและสารควบคุม (negative control) น้อยกว่า 3 cycles แต่ melting temperature (Tm) มี peak แยกกันไม่ชัดเจนหรือติดกัน แปลผลว่ามีการปนเปื้อน ควรทำ PCR ซ้ำ

3.4.3 ตัวแปรในงานวิจัย

- ผลเพาะเชื้อ
- ผลการตรวจด้วยวิธี real time PCR

3.4.4 การวัดผล

เปรียบเทียบการตรวจด้วย real time PCR กับการเพาะเชื้อเพื่อวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง

3.5 การรวบรวมข้อมูล)Data collection(

รวบรวมข้อมูลผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง โดยเก็บข้อมูล

ทั่วไป ได้แก่ อายุ, เพศ ประวัติการติดเชื้อในช่องท้อง ประวัติการได้ยาปฏิชีวนะ และเก็บน้ำยาในช่องท้องส่งตรวจการเพาะเชื้อแบคทีเรีย และทำ PCR ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล)Data Analysis(

- ข้อมูลทั่วไปของประชากรการวิจัย ได้แก่ อายุ วัดผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพศจะคำนวณออกมาเป็นสัดส่วนร้อยละ
- ปริมาณเซลล์ของน้ำยาในช่องท้องก่อนให้ยาปฏิชีวนะวัดผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- เปรียบเทียบผลของ real time PCR กับการเพาะเชื้อโดยนำเสนอเป็น sensitivity และ specificity ในรูปตาราง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลของการวิจัย

4.1 ผู้ที่เข้าร่วมการศึกษา

เริ่มดำเนินการวิจัยตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน พ.ศ.2556 และสิ้นสุดเมื่อ วันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ.2556 โดยมีศูนย์ล้างไตทางช่องท้องในโรงพยาบาลที่เข้าร่วม 5 แห่งทั่วประเทศ มีจำนวนผู้ป่วยที่สามารถเข้าร่วมวิจัยได้ทั้งหมด 146 ราย

4.2 ข้อมูลของผู้ป่วยทั้งหมด

4.2.1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด

มีผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายเข้าร่วมวิจัยทั้งสิ้น 146 ราย เป็นเพศชายร้อยละ 51.4 เพศหญิงร้อยละ 48.6 อายุเฉลี่ยประมาณ 59±14 ปี สาเหตุของโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายที่พบมากที่สุด คือ ความดันโลหิตสูงร้อยละ 47.9 สาเหตุรองลงไป คือ เบาหวานร้อยละ 40.4 ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่เริ่มล้างไตทางช่องท้องถึงติดเชื้อในช่องท้องเท่ากับ 760±1,717 วัน อาการ/อาการแสดงทางคลินิกของภาวะช่องท้องอักเสบที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ น้ำยาล้างช่องท้องขุ่น ปวดท้อง ไข้ ถ่ายเหลว ตามลำดับ เซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำยาล้างช่องท้องเท่ากับ3,881±4,459 เซลล์/มล. มีประวัติเคยเป็นช่องท้องอักเสบติดเชื้อมาก่อน คิดเป็นร้อยละ 41.8 และร้อยละ 7.5 ของผู้ป่วยทั้งหมดเคยได้รับยาปฏิชีวนะภายใน 4 สัปดาห์ก่อนมีช่องท้องอักเสบครั้งนี้

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยทั้งหมด

ข้อมูลพื้นฐาน	จำนวน(ร้อยละ)
จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด	146 (100)
เพศ ชาย	75 (51.4)
หญิง	71 (48.6)
อายุเฉลี่ย (ปี)	59±14
สาเหตุของโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย	
ความดันโลหิตสูง	70 (47.9)
เบาหวาน	59 (40.4)
นิ่วในไต	1 (0.7)
โรคลูปัส	1 (0.7)
ไม่ทราบสาเหตุ	15 (10.3)
มีประวัติเคยติดเชื้อช่องท้อง	61 (41.8)
ได้รับยาปฏิชีวนะภายใน 4 สัปดาห์ก่อนมีภาวะช่องท้องอักเสบ	11 (7.5)
อาการ/อาการแสดงแรกรับ	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

น้ำยาขุ่น	146 (100)
ปวดท้อง	87 (59.6)
ท้องเสีย/ถ่ายเหลว	37 (25.3)
ไข้	35 (24)
ท้องผูก	15 (10.3)
บวม	12 (8.2)
คลื่นไส้/อาเจียน	9 (6.2)
ขาดดุลน้ำยา	3 (2.1)
ไฟบรินปนในน้ำยาล้างช่องท้อง	2 (1.4)
คราบดำเกาะสาย	2 (1.4)
หอบเหนื่อย	1 (0.7)

4.2.2 ข้อมูลผลเพาะเชื้อของผู้ป่วยทั้งหมด

ผลเพาะเชื้อไม่ขึ้นเชื้อคิดเป็นร้อยละ 24.7 พบเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 66.5 แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกร้อยละ 37 และแบคทีเรียแกรมลบร้อยละ 29.5 พบเชื้อราร้อยละ 6.8 และเชื้อไมโคแบคทีเรียร้อยละ 2 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลเพาะเชื้อทั้งหมด

ผลการเพาะเชื้อ	จำนวน(ร้อยละ)
ไม่พบเชื้อ	37 (25.4)
เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก	53 (36.3)
เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	43 (29.5)
เชื้อรา	10 (6.8)
เชื้อไมโคแบคทีเรีย	3 (2.0)

โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของช่องท้องติดเชื้อเรียงตามลำดับ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus* group D *nonenterococci, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis, Esherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus* group A, *Corynebacterium* spp. และอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลเพาะเชื้อที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวน(ร้อยละ)
Staphylococcus epidermidis	14 (14.4)
Streptococcus group D *nonenterococci*	12 (12.4)
Klebsiella pneumoniae	8 (8.2)
Enterococcus faecalis	8 (8.2)
Esherichia coli	8 (8.2)
Staphylococcus aureus	6 (6.2)
Streptococcus group A	5 (5.2)
Corynebacterium spp.	4 (4.1)
Salmonella group D	3 (3.1)
อื่นๆ	29 (30)

ผลเพาะเชื้อเป็นเชื้อรา 10 ราย ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลเพาะเชื้อที่เป็นเชื้อรา

เชื้อรา	จำนวน(ร้อยละ)
Candida albicans	3 (2)
Candida tropicalis	2 (1.4)
Candida glabrata	1 (0.7)
Candida not albicans	1 (0.7)
Stephanoascus ciferrii	1 (0.7)
Aspergillus flavus	1 (0.7)
Mold	1 (0.7)
รวม	10 (6.9)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.3 ข้อมูลผลการรักษาของผู้ป่วยทั้งหมด

โดยรวมมีอัตราการรักษาหาย ร้อยละ 71.9 เอาสายล้างช่องท้องออกร้อยละ 24 และเสียชีวิตร้อยละ 4.1 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลผลการรักษาของผู้ป่วยทั้งหมด

ผลการรักษา	จำนวน (ร้อยละ)
รักษาหาย	105 (71.9)
การกลับเป็นซ้ำทั้งหมด	16 (11.0)
ภายใน 4 สัปดาห์หลังรักษาหาย	
เกิดจากเชื้อชนิดเดิมหรือไม่ขึ้นเชื้อ (relapsing peritonitis)	6 (4.1)
เกิดจากเชื้อชนิดใหม่ (recurrent peritonitis)	4 (2.7)
ภายหลัง 4 สัปดาห์	
เกิดจากเชื้อเดิมหรือไม่ขึ้นเชื้อ (repeated peritonitis)	6 (4.1)
ชนิดของเชื้อที่กลับเป็นซ้ำ	
เพาะไม่ขึ้นเชื้อ	4 (2.7)
Staphylococcus epidermidis	4 (2.7)
Corynebacterium spp.	2 (1.4)
Enterococcus faecalis	2 (1.4)
Escherichia coli ESBL	2 (1.4)
Klebsiella oxytoca	1 (0.7)
Salmonella group D	1 (0.7)
ถอดสายล้างช่องท้องออก	35 (24.0)
เสียชีวิต	6 (4.1)

4.2.4 ผลการตรวจด้วย real time PCR

จากจำนวนผู้ติดเชื้อในช่องท้อง 146 ราย ได้นำน้ำยาล้างช่องท้องมาตรวจ real time PCR ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจด้วย real time PCR

Real time PCR	ผลเพาะเชื้อ		รวม (ราย)
	พบเชื้อ (ราย)	ไม่พบเชื้อ (ราย)	
ผลบวก	84	11	95
ผลลบ	25	26	51
รวม	109	37	146

ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย real time PCR ในการศึกษานี้มี sensitivity ร้อยละ 77, specificity ร้อยละ 70.3, positive predictive value ร้อยละ 88.4 และ negative predictive value ร้อยละ 51 โดยจำแนกผลการตรวจได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Real time PCR ได้ผลบวกและผลเพาะเชื้อพบเชื้อมีทั้งหมด 84 รายแบ่งเป็น เชื้อแบคทีเรีย 76 ราย เชื้อรา 6 ราย และเชื้อไมโคแบคทีเรีย 2 ราย โดยจำแนกเชื้อแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 9

กลุ่มที่ 2 Real time PCR ได้ผลบวกแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้นมีทั้งหมด 11 ราย

กลุ่มที่ 3 Real time PCR ได้ผลลบแต่เพาะเชื้อพบเชื้อมีทั้งหมด 25 รายแบ่งเป็น เชื้อแบคทีเรีย 20 ราย
เชื้อรา 4 ราย และเชื้อไมโคแบคทีเรีย 1 ราย โดยจำแนกเชื้อแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 10

กลุ่มที่ 4 Real time PCR ได้ผลลบและเพาะเชื้อไม่ขึ้นมีทั้งหมด 26 ราย

ตารางที่ 9 แสดงผลการตรวจด้วย real time PCR เฉพาะเชื้อแบคทีเรีย

Real time PCR	ผลเพาะเชื้อ		รวม (ราย)
	พบเชื้อ (ราย)	ไม่พบเชื้อ (ราย)	
ผลบวก	76	11	87
ผลลบ	20	26	46
รวม	96	37	133

หากนำผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย real time PCR ที่ไม่มีการติดเชื้อไมโคแบคทีเรียและเชื้อราามารวมจะเพิ่ม sensitivity เป็นร้อยละ 79.2, specificity ร้อยละ 70.3, positive predictive value ร้อยละ 87.4 และ negative predictive value ร้อยละ 56.5

ตารางที่ 10 แสดงกลุ่มที่ real time PCR ได้ผลบวกและพบเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก	**จำนวน (ราย)**
Staphylococcus epidermidis	11
Streptococcus group D *nonenterococci*	7
Enterococcus faecalis	6
Streptococcus group A	5
Staphylococcus aureus	4
Corynebacterium spp.	4
Coagulase-negative *staphylococcus*	2
Streptococcus group D *enterococci*	2
Streptococcus viridans	2
Enterococcus spp.	1
รวม	44
เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	
Klebsiella pneumoniae	9
Esherichia coli	6
Esherichia coli ESBL	5
Klebsiella oxytoca	2
Salmonella group D	2
Pseudomonas aeruginosa	2
Klebsiella spp.	2
Morganella morganii	1
Enterobacter spp.	1
Acinetobacter baumannii	1
Serratia marcescens	1
รวม	32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 แสดงกลุ่มที่ real time PCR ได้ผลลบแต่เพาะเชื้อพบเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก	**จำนวน (ราย)**
Streptococcus group D *nonenterococci*	4
Staphylococcus epidermidis	3
Staphylococcus aureus	2
Corynebacterium spp.	2
Enterococcus faecalis	1
รวม	12
เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	
Esherichia coli	2
Klebsiella pneumoniae	2
Pseudomonas spp.	2
Acinetobacter baumannii	1
Salmonella group D	1
รวม	8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
การอภิปรายผล (Discussion)

ภาวะติดเชื้อช่องท้องจากเชื้อแบคทีเรียมีความรุนแรง การติดเชื้อรุนแรงในช่องท้องเป็นระยะเวลานานส่งผลให้สูญเสียหน้าที่ของผนังช่องท้อง (peritoneal membrane) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การล้างไตทางช่องท้องล้มเหลวและต้องเปลี่ยนวิธีการบำบัดทดแทนไตเป็นวิธีอื่น จากข้อมูลการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้อุบัติการณ์ช่องท้องอักเสบสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดยคณะทำงานทวิภาคีเอเชีย-แปซิฟิก และยังพบว่ามีอัตราการเพาะเชื้อไม่ขึ้นสูงถึงร้อยละ 40 และในทางเวชปฏิบัติการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาภาวะช่องท้องอักเสบในกรณีผลเพาะเชื้อไม่ขึ้นนั้นก็อาจเกิดความล้มเหลวจนต้องถอดสายออก หรือเสียชีวิตได้ ซึ่งหากมีการตรวจที่ไวกว่าการเพาะเชื้อซึ่งเป็นมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยแล้วก็สามารถที่จะช่วยลดอัตราการรักษาล้มเหลว อัตราการถอดสายและอัตราการเสียชีวิตได้ ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยถึงการใช้ PCR เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อ การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกเพื่อเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์แยกเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้อง ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลของการศึกษานี้จะช่วยให้ภาวะช่องท้องติดเชื้อหายได้ภายในระยะเวลาอันสั้น นำไปสู่การลดการเสื่อมของผนังหน้าท้องผู้ป่วยสามารถใช้การบำบัดทดแทนไตทางหน้าท้องได้ยาวนานขึ้น ลดอัตราการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ตลอดจนลดอัตราการเสียชีวิตและงบประมาณ ซึ่งเป็นการช่วยเสริมนโยบายของรัฐบาลในการปรับปรุงคุณภาพชีวิตผู้ป่วย และพัฒนาคุณภาพการล้างไตทางช่องท้องของประเทศให้มีมาตรฐานสูงขึ้น

จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของภาวะติดเชื้อในช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องมีร้อยละ 66.5 โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกร้อยละ 37 และแบคทีเรียแกรมลบร้อยละ 29.5 ซึ่งแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus* group D *nonenterococci, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis และ Esherichia coli* เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของนพ.เถลิงศักดิ์และคณะ[5] ซึ่งทำการรวบรวมอุบัติการณ์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุของภาวะช่องท้องอักเสบของผู้ป่วยในประเทศไทยและรายงานเมื่อ พ.ศ. 2554 พบว่าอัตราการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมบวกในการศึกษานี้สูงกว่า ส่วนอัตราการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบใกล้เคียงกัน แต่ผลเพาะเชื้อไม่ขึ้นเชื้อในการศึกษานี้มีอยู่ 36 รายคิดเป็นร้อยละ 24.7 ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาในประเทศไทยที่ผ่านมาซึ่งเท่ากับร้อยละ 34.5 โดย 36 รายที่เพาะเชื้อไม่ขึ้นมีเพียง 2 รายที่ได้รับยาปฏิชีวนะมาในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนการติดเชื้อ ส่วนอีก 34 รายที่เชื้อไม่ขึ้นอาจจะเกิดจากน้ำยาล้างช่องท้องมีปริมาณเชื้อที่น้อยเกินไป หรือเกิดจากเทคนิคการเพาะเชื้อ ซึ่งหลังจากนำน้ำยาล้างช่องท้องมาตรวจด้วย real-time PCR โดย 16S rDNA พบว่ามี sensitivity เท่ากับร้อยละ 77 specificity ร้อยละ 70.3, positive predictive value ร้อยละ 88.4 และ negative predictive value ร้อยละ 51 แต่หากนำน้ำยาที่ติดเชื้อเฉพาะแบคทีเรียมาตรวจด้วย real time PCR พบว่ามี sensitivity เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 79.2 specificity ร้อยละ 70.3 โดยเชื้อ

แบคทีเรียที่ผลเพาะเชื้อขึ้นและ real time PCR ที่มีผลบวก ได้แก่ *Streptococcus* group A, coagulase-negative *staphylococcus, Streptococcus* group D *enterococci, Streptococcus viridians, Enterococcus* spp., *Esherichia coli ESBL, Klebsiella oxytoca, Klebsiella* spp., *Pseudomonas aruginosa, Morganella morganii, Enterobacter* spp. และ *Serratia marcescens* ส่วนกลุ่มที่เพาะเชื้อขึ้นแต่ real time PCR ได้ผลลบได้แก่เชื้อ *Pseudomonas* spp. ซึ่งถ้าเปรียบเทียบดูระหว่าง เชื้อ 2 กลุ่มนี้พบว่าเชื้อต่างกัน เมื่อนำกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่ขึ้นทั้งหมด 37 รายมาตรวจด้วย real time PCR พบว่าได้ผลบวก 11 ราย ซึ่งเพิ่มความไวจากการเพาะเชื้ออีกคิดเป็นร้อยละ 29.7 ซึ่งใน 11 รายนี้มี 2 รายได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อนภายใน 4 สัปดาห์ มีอยู่ 2 รายถอดสายออกเนื่องจากมี refractory peritonitis ส่วนอีก 26 รายที่เพาะเชื้อไม่ขึ้นและ real time PCR ได้ผลลบร้อยละ 70.3 มี 1 รายได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อนภายใน 4 สัปดาห์ มี 1 รายเสียชีวิตจากการติดเชื้อ มี 2 รายถอดสายออกเนื่องจากมี refractory peritonitis ซึ่งหากเปรียบเทียบในกลุ่มเพาะเชื้อไม่ขึ้นระหว่าง real time PCR ได้ผลบวกกับได้ผลลบพบว่าผลการรักษาใกล้เคียงกัน ซึ่งผล real time ที่คลาดเคลื่อนอาจเกิดจากการปนเปื้อนสารตัวอย่างขณะสกัดดีเอ็นเอหรือขณะทำ real time PCR หรือวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ phenol-chloroform อาจทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอ การเลือกใช้ชนิดของ primer ทั้ง variable regions และความยาว base pairs ไม่จำเพาะต่อเชื้อ และเกิดจากการปนเปื้อนของสารตัวอย่างขณะสกัดดีเอ็นเอหรือขณะทำ real time PCR และจากการศึกษานี้ตรวจ real time PCR ได้ผลบวกในเชื้อไมโคแบคทีเรีย 2 ใน 3 ราย และ ตรวจได้ผลบวกในเชื้อรา 6 ใน 10 ราย ซึ่งตามปกติแล้ว 16S rDNA ไม่สามารถตรวจเชื้อราได้ โดยสาเหตุอาจเกิดจาก real time PCR มีความไวในการตรวจแบคทีเรียมากในกรณีที่มีการติดเชื้อร่วมกัน เช่น แบคทีเรียร่วมกับเชื้อรา เกิดจากการปนเปื้อนของสารตัวอย่างขณะสกัดดีเอ็นเอหรือขณะทำ real time PCR

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Collier และคณะ[88] ในปี พ.ศ. 2552 ซึ่งศึกษาการตรวจน้ำในช่องท้องด้วยวิธี real time PCR โดยนำน้ำในช่องท้อง 71 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 24 รายมาศึกษา และมี 21 ตัวอย่างที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ นำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี real-time 16S rDNA PCR assay พบว่า sensitivity ร้อยละ 69 specificity ร้อยละ 63, positive predictive value ร้อยละ 75 และ negative predictive value ร้อยละ 56 ซึ่ง sensitivity และ specificity ต่ำกว่าการศึกษาของคณะผู้วิจัย แต่การศึกษานี้มีการใช้ PCR ตรวจติดตามผลหลังจากการรักษา โดยรวบรวมผู้ที่ติดเชื้อในช่องท้องทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ในจำนวนผู้ป่วย 24 ราย นำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียพบว่าทั้งหมดไม่ขึ้นเชื้อ และตรวจต่อด้วยวิธี PCR พบว่าได้ผลบวก 21 ตัวอย่าง ได้ผลลบ 29 ตัวอย่าง sensitivity ร้อยละ 0, specificity ร้อยละ 58, positive predictive value ร้อยละ 0 และ negative predictive value ร้อยละ 100

ผลการรักษามีอัตราการหายเพียงร้อยละ 71.9 และผลรวมของผลลัพธ์การรักษาที่ไม่ดี ซึ่งได้แก่ การเอาสายล้างช่องท้องออกและการเสียชีวิต สูงถึงเกือบหนึ่งในสามของทั้งหมด (ร้อยละ 28.1) ซึ่งในอนาคตหากมีการปรับวิธีการตรวจ PCR ก็อาจมีประโยชน์ในแง่การวิเคราะห์เชื้อ และเป็นแนวทางการให้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมได้ ดังนั้น การตรวจน้ำยาล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อด้วยวิธี real time PCR ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่ออีกในการระบุเชื้อ (DNA sequencing) เพื่อที่จะเพิ่ม sensitivity และ specificity และนำมาช่วยเสริมการตรวจเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

จากการศึกษานี้จึงสรุปผลว่าการตรวจด้วยวิธี real time PCR เพื่อวิเคราะห์แยกเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องยังไม่สามารถนำมาใช้เสริมหรือทดแทนการเพาะเชื้อซึ่งเป็นมาตรฐานในประเทศไทยได้

ข้อดีของการศึกษานี้ คือ เป็นการศึกษาในรูปแบบ conventional multicenter study จึงสามารถลดความลำเอียงที่เกิดจากการศึกษาในสถาบันแห่งเดียวได้ ส่วนข้อด้อยของการศึกษาคือ อาจมีการปนเปื้อนของสารตัวอย่างในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและการทำ real time PCR ซึ่งต้องใช้ความชำนาญและความละเอียดอย่างสูง และการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจ real time PCR ซ้ำหลังการรักษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

1. เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของภาวะติดเชื้อในช่องท้องในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้องจากการศึกษานี้มีร้อยละ 66.5 โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกร้อยละ 37 และแบคทีเรียแกรมลบร้อยละ 29.5 ซึ่งแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus* group D *nonenterococci, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis และ Esherichia coli*

2. อุบัติการณ์ของการเพาะเชื้อไม่ขึ้นเชื้อจากการศึกษานี้คิดเป็นร้อยละ 24.7 ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาในประเทศไทยที่ผ่านมาซึ่งเท่ากับร้อยละ 34.5 และใกล้เคียงเกณฑ์ขั้นต่ำที่กำหนดโดยสมาคมล้างไตทางช่องท้องโลก (International Society For Peritoneal Dialysis) พ.ศ. 2553 คือไม่เกินร้อยละ 20

3. การตรวจด้วย real time PCR เพื่อวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่ติดเชื้อในช่องท้องยังไม่สามารถนำมาใช้เสริมหรือทดแทนการเพาะเชื้อซึ่งเป็นมาตรฐานในประเทศไทยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Praditpornsilpa K, Lekhyananda S, Premasathian N, Kingwatanakul P, Lumpaopong A, Gojaseni P, et al. Prevalence trend of renal replacement therapy in Thailand: impact of health economics policy. J Med Assoc Thai. 2011;94 Suppl 4:S1-6.
2. Siriwong T. Why PD get in trend and why everyone love it? Cardiovascular & Metabolic (Thailand). 2011;24:43-4.
3. Szeto C. Reaching Standards of Care in Peritoneal Dialysis. ISPD Asian Pacific Newsletter. International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD). 2010;8:2-3.
4. Li PK, Szeto CC, Piraino B, Bernardini J, Figueiredo AE, Gupta A, et al. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. Perit Dial Int. 2010;30(4):393-423.
5. Kanjanabuch T, Chancharoenthana W, Katavetin P, Sritippayawan S, Praditpornsilpa K, Ariyapitipan S, et al. The incidence of peritoneal dialysis-related infection in Thailand: a nationwide survey. J Med Assoc Thai. 2011;94 Suppl 4:S7-12.
6. Fahim M, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Culture-negative peritonitis in peritoneal dialysis patients in Australia: predictors, treatment, and outcomes in 435 cases. Am J Kidney Dis. 2010;55(4):690-7.
7. Kim SH, Jeong HS, Kim YH, Song SA, Lee JY, Oh SH, et al. Evaluation of DNA extraction methods and their clinical application for direct detection of causative bacteria in continuous ambulatory peritoneal dialysis culture fluids from patients with peritonitis by using broad-range PCR. Ann Lab Med. 2012;32(2):119-25.
8. Boeschoten EW. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. In: Gokal R, Klanna R, Krediet RT, Nolph KD, editors. Textbook of peritoneal dialysis. 2nd ed. Great Britain: Kruwer Academic Publishers; 2000. p. 387-417.
9. Dobbie JW. Textbook of peritoneal dialysis. In: Gokal R, Khanna R, Krediet RT, Nolph KD, editors. Ultrastructure and pathology in peritoneal dialysis. 2nd ed. Great Britain: Kluwer Academic Publishers 2000. p. 145-52.
10. Blake PG, Duugirdus JT. Physiology of peritoneal dialysis. Handbook of dialysis. 3rd ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 281-96.
11. Gotloib L. Anatomy of the peritoneal membrane. In: La Greca G, Biasioli G, Ronco G, editors. Peritoneal dialysis. Milan: Wichtig Editore; 1982. p. 17-30.
12. Garosi G, Di Paolo N. Recent advances in peritoneal morphology: the milky spots in peritoneal dialysis. Adv Perit Dial. 2001;17:25-8.

13. Nagy JA. Peritoneal membrane morphology and function. Kidney Int Suppl. 1996;56:S2-11.

14. Hills BA, Burke JR, Thomas K. Surfactant barrier lining peritoneal mesothelium: lubricant and release agent. Perit Dial Int. 1998;18(2):157-65.

15. Ronco C. Limitations of peritoneal dialysis. Kidney Int Suppl. 1996;56:69-74.

16. Ronco C, Brendolan A, La Greca G. The peritoneal dialysis system. Nephrol Dial Transplant. 1998;13 Suppl 6:94-9.

17. Nolph KD. The peritoneal dialysis system. Contrib Nephrol. 1979;17:44-50.

18. Rippe B. A three-pore model of peritoneal transport. Perit Dial Int. 1993;13 Suppl 2:S35-8.

19. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. The mesothelium and its reactions: a review. Crit Rev Toxicol. 1982;10(2):81-144.

20. Norbert L, Mehta R. Complications of dialysis. New York: Marcel Dekker Inc; 2000.

21. Lamiere N, Mehta R. Complications of Dialysis. New York: Marcel Dekker Inc; 2000.

22. Rocklin MA, Teitelbaum I. Noninfectious causes of cloudy peritoneal dialysate. Semin Dial. 2001;14(1):37-40.

23. Charney DI, Gouge SF. Chemical peritonitis secondary to intraperitoneal vancomycin. Am J Kidney Dis. 1991;17(1):76-9.

24. Piraino B, Bernardini J, Johnston J, Sorkin M. Chemical peritonitis due to intraperitoneal vancomycin (Vancoled) Perit Dial Int. 1987;7:156-9.

25. Freiman JP, Graham DJ, Reed TG, McGoodwin EB. Chemical peritonitis following the intraperitoneal administration of vancomycin. Perit Dial Int. 1992;12(1):57-60.

26. Piraino BM, Silver MR, Dominguez JH, Puschett JB. Peritoneal eosinophils during intermittent peritoneal dialysis. Am J Nephrol. 1984;4(3):152-7.

27. Swarts JM, Young JM. Primary infiltrative eosinophilic gastritis, enteritis and peritonitis; clinical and pathological manifestations of hypersensitivity. Gastroenterology. 1955;28(3):431-52.

28. Vlahakos D, Rudders R, Simon G, Canzanello VJ. Lymphoma-mimicking peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Perit Dial Int. 1990;10(2):165-7.

29. Bargman JM, Zent R, Ellis P, Auger M, Wilson S. Diagnosis of lymphoma in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient by peritoneal fluid cytology. Am J Kidney Dis. 1994;23(5):747-50.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

30. Bagnis C, Gabella P, Bruno M, Cosseddu D, Marangella M, Yacha GM, et al. Cloudy dialysate due to adenocarcinoma cells in a CAPD patient. Perit Dial Int. 1993;13(4):322-3.

31. Oliveira LG, Luengo J, Caramori JC, Montelli AC, Cunha Mde L, Barretti P. Peritonitis in recent years: clinical findings and predictors of treatment response of 170 episodes at a single Brazilian center. Int Urol Nephrol. 2012;44(5):1529-37.

32. Steiner RW, Halasz NA. Abdominal catastrophes and other unusual events in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Am J Kidney Dis. 1990;15(1):1-7.

33. Prischl FC, Wallner M, Schauer W, Balon R, Kramar R. An important differential diagnosis in CAPD patients with sudden onset of fever, vomiting, abdominal pain, and cloudy dialysate. Perit Dial Int. 1999;19(1):81-4.

34. Streather CP, Carr P, Barton IK. Carcinoma of the kidney presenting as sterile peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Nephron. 1991;58(1):121.

35. Karanicolas S, Oreopoulos DG, Izatt S, Shimizu A, Manning RF, Sepp H, et al. Epidemic of aseptic peritonitis caused by endotoxin during chronic peritoneal dialysis. N Engl J Med. 1977;296(23):1336-7.

36. Mangram AJ, Archibald LK, Hupert M, Tokars JI, Silver LC, Brennan P, et al. Outbreak of sterile peritonitis among continuous cycling peritoneal dialysis patients. Kidney Int. 1998;54(4):1367-71.

37. de Freitas DG, Gokal R. Sterile peritonitis in the peritoneal dialysis patient. Perit Dial Int. 2005;25(2):146-51.

38. Oh SY, Kim H, Kang JM, Lim SH, Park HD, Jung SS, et al. Eosinophilic peritonitis in a patient with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Korean J Intern Med. 2004;19(2):121-3.

39. Rolleston HD. A Case of Eosinophile Ascites: With Remarks. Br Med J. 1914;1(2770):238-9.

40. Harkavy J. Vascular allergy. Clinics. 1946;5(2):504-49.

41. Harley JB, Glushien AS, Fisher ER. Eosinophilic peritonitis. Ann Intern Med. 1959;51:301-8.

42. Spinowitz BS, Golden RA, Rascoff JH, Charytan C. Eosinophilic peritonitis. Clin Exp Dial Apheresis. 1982;6(4):187-91.

43. Gokal R, Ramos JM, Ward MK, Kerr DN. "Eosinophilic" peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Clin Nephrol. 1981;15(6):328-30.

44. Sepandj F, Ceri H, Gibb A, Read R, Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. Perit Dial Int. 2004;24(1):65-7.

45. Murphy G, Tzamaloukas AH, Eisenberg B, Gibel LJ, Avasthi PS. Intraperitoneal thrombolytic agents in relapsing or persistent peritonitis of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Int J Artif Organs. 1991;14(2):87-91.

46. Daugirdas JT, Leehey DJ, Popli S, Hoffman W, Zayas I, Gandhi VC, et al. Induction of peritoneal fluid eosinophilia and/or monocytosis by intraperitoneal air injection. Am J Nephrol. 1987;7(2):116-20.

47. Harnett JD, Gill D, Corbett L, Parfrey PS, Gault H. Recurrent hemoperitoneum in women receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann Intern Med. 1987;107(3):341-3.

48. Golper TA, Burkart JM, Piraino BM. Peritoneal dialysis In: Schrier R, Gottschalk C, editors Diseases of the kidney 6th ed Boston: Little Brown; 1997. p. 2771-806.

49. Lew SQ. Hemoperitoneum: bloody peritoneal dialysate in ESRD patients receiving peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2007;27(3):226-33.

50. Porter J, Wang WM, Oliveira DB. Chylous ascites and continuous ambulatory peritoneal dialysis. Nephrol Dial Transplant. 1991;6:659-61.

51. Goldfarb JP. Chylous effusions secondary to pancreatitis: case report and review of the literature. Am J Gastroenterol 1984;79:133-5.

52. Rocklin MA, Quinn MJ, Teitelbaum I. Cloudy dialysate as a presenting feature of superior vena cava syndrome. Nephrol Dial Transplant. 2000;15(9):1455-7.

53. Yoshimoto K, Saima S, Echizen H, Nakamura Y, Ishizaki T. A drug-induced turbid peritoneal dialysate in five patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Nephrol. 1993;40(2):114-7.

54. Yoshimoto K, Saima S, Nakamura Y, Nakayama M, Kubo H, Kawaguchi Y, et al. Dihydropyridine type calcium channel blocker-induced turbid dialysate in patients undergoing peritoneal dialysis. Clin Nephrol. 1998;50(2):90-3.

55. Shrestha BM, Brown P, Wilkie M. Surgical peritonitis in patients on peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2008;28(4):331-4.

56. Keane WF, Bailie GR, Boeschoten E, Gokal R, Golper TA, Holmes CJ, et al. Adult peritoneal dialysis-related peritonitis treatment recommendations: 2000 update. Perit Dial Int. 2000;20(4):396-411.

57. Washington J. Principles of diagnosis. In: Baron S, editor. Baron's Medical Microbiology. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

58. Madigran MT, Martinko JM. Brock Biology of Microorganisms 11th ed Upper Saddle River NJ:Prentice Hall; 2006.

59. Cappucino JG, Sherman N. Microbiology a Laboratory Manual 3rd ed. The Benjamin: Cummings Publishing Company, Inc; 1992. p. 63-81.

60. Pratt PW. Diagnostic Microbiology. Laboratory Proceedures For Veterinary Technicians. 3rd ed. Mosby: Year Book ,Inc; 1997. p. 119-258.

61. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed. London, England: Wolfe Publising; 1994. p. 6-345.

62. สุวรรณพินิจ น, สุวรรณพินิจ ป. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3 ed: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.; 2554. p. 42-73.

63. Muhammed KO, Ozener Q, Akoglu E. Diagnostic value of effluent endotoxin level in gram-negative peritonitis in CAPD patients. Perit Dial Int. 2001;21(2):154-7.

64. Pattanachaiwit N, Gojaseni P, Junrak J, Riengchan P, Pajareya T, Chittinandana A. The changing profile of PD-related peritonitis in Thailand: a single centers experience. J Med Assoc Thai. 2011;94 Suppl 4:S44-51.

65. Williams K. Limulus Amebocyte Lysate Discovery, Mechanism and Application. In: Williams K, editor. Endotoxin: . 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2007. p. 191-220.

66. Eli L. Endotoxin pyrogens, LAL Testing and depyrogenation. In: Williams K, editor. Endotoxins. 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2007. p. 211-60.

67. Hausmann MJ, Yulzari R, Lewis E, Saisky Y, Douvdevani A. Gel clot LAL assay in the initial management of peritoneal dialysis patients with peritonitis: a retrospective study. Nephrol Dial Transplant. 2000;15(5):680-3.

68. Ishizaki M, Oikawa K, Miyashita E. Usefulness of the endotoxin test for assessing CAPD peritonitis by gram-negative organisms. Adv Perit Dial. 1996;12:199-202.

69. Smalley DL, Baddour LM, Kraus AP, Jr. Rapid detection of gram-negative bacterial peritonitis by the Limulus amoebocyte lysate assay. J Clin Microbiol. 1986;24(5):882-3.

70. Park SJ, Lee JY, Tak WT, Lee JH. Using reagent strips for rapid diagnosis of peritonitis in peritoneal dialysis patients. Adv Perit Dial. 2005;21:69-71.

71. Akman S, Uygun V, Guven AG. Value of the urine strip test in the early diagnosis of bacterial peritonitis. Pediatr Int. 2005;47(5):523-7.

72. Nguyen-Khac E, Cadranel JF, Thevenot T, Nousbaum JB. Review article: the utility of reagent strips in the diagnosis of infected ascites in cirrhotic patients. Aliment Pharmacol Ther. 2008;28(3):282-8.

Chulalongkorn University

73. Hsu JL, Ruoss SJ, Bower ND, Lin M, Holodniy M, Stevens DA. Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients. Crit Rev Microbiol. 2011;37(4):277-312.
74. Preuner S, Lion T. Towards molecular diagnostics of invasive fungal infections. Expert Rev Mol Diagn. 2009;9(5):397-401.
75. Marty FM, Koo S. Role of (1-->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. Med Mycol. 2009;47 Suppl 1:S233-40.
76. Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Piscitelli S, Candelario M, et al. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):857-69.
77. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. Br J Haematol. 2004;126(6):852-60.
78. Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R. False-positive results by the platelia Aspergillus galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(7):1132-3.
79. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. Clin Infect Dis. 2004;38(6):913-6.
80. Steinbach WJ, Addison RM, McLaughlin L, Gerrald Q, Martin PL, Driscoll T, et al. Prospective Aspergillus galactomannan antigen testing in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. Pediatr Infect Dis J. 2007;26(7):558-64.
81. Bren A. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17(12):839-43.
82. Yoo TH, Chang KH, Ryu DR, Kim JS, Choi HY, Park HC, et al. Usefulness of 23S rRNA amplification by PCR in the detection of bacteria in CAPD peritonitis. Am J Nephrol. 2006;26(2):115-20.
83. Johnson G, Wilks M, Warwick S, Millar MR, Fan SL. Comparative study of diagnosis of PD peritonitis by quantitative polymerase chain reaction for bacterial DNA vs culture methods. J Nephrol. 2006;19(1):45-9.
84. Ota K, Maruyama H, Iino N, Nakamura G, Shimotori M, Tanabe Y, et al. Rapid detection of causative pathogen of peritonitis using in-situ hybridization in a patient with continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Infect Chemother. 2007;13(4):273-5.
85. Nolte FS. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22th ed2011.

86. Chakrabarti P, Das BK, Kapil A. Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. Indian J Med Res. 2009;129(2):182-8.

87. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: Use of 16sDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery or novel bacteria in clinical microbiology laboratories Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008;14:908-34.

88. Collier SE, Ciesielczuk HL, Shorten RJ, Davenport A, Kandil H, Carpenter JE, et al. The role of 16s rDNA PCR in the diagnosis of peritoneal dialysis-associated peritonitis J Med Microb Diag 2012;1:1-5.

89. Edwards KJ, Logan JM, Langham S, Swift C, Gharbia SE. Utility of real-time amplification of selected 16S rRNA gene sequences as a tool for detection and identification of microbial signatures directly from clinical samples. J Med Microbiol. 2012;61(Pt 5):645-52.

90. Gucek A, Bren AF, Hergouth V, Lindic J. Cefazolin and netilmycin versus vancomycin and ceftazidime in the treatment of CAPD peritonitis. Adv Perit Dial. 1997;13:218-20.

91. Zelenitsky S, Barns L, Findlay I, Alfa M, Ariano R, Fine A, et al. Analysis of microbiological trends in peritoneal dialysis-related peritonitis from 1991 to 1998. Am J Kidney Dis. 2000;36(5):1009-13.

92. Badve SV, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Boudville NC, Wiggins KJ, et al. Use of aminoglycosides for peritoneal dialysis-associated peritonitis does not affect residual renal function. Nephrol Dial Transplant. 2012;27(1):381-7.

93. Baker RJ, Senior H, Clemenger M, Brown EA. Empirical aminoglycosides for peritonitis do not affect residual renal function. Am J Kidney Dis. 2003;41(3):670-5.

94. Wiggins KJ, Craig JC, Johnson DW, Strippoli GF. Treatment for peritoneal dialysis-associated peritonitis. Cochrane Database Syst Rev. 2008(1):1-120.

95. Lui SL, Cheng SW, Ng F, Ng SY, Wan KM, Yip T, et al. Cefazolin plus netilmicin versus cefazolin plus ceftazidime for treating CAPD peritonitis: effect on residual renal function. Kidney Int. 2005;68(5):2375-80.

96. Goffin E, Herbiet L, Pouthier D, Pochet JM, Lafontaine JJ, Christophe JL, et al. Vancomycin and ciprofloxacin: systemic antibiotic administration for peritoneal dialysis-associated peritonitis. Perit Dial Int. 2004;24(5):433-9.

97. Lima RC, Barreira A, Cardoso FL, Lima MH, Leite M, Jr. Ciprofloxacin and cefazolin as a combination for empirical initial therapy of peritoneal dialysis-related peritonitis: five-year follow-up. Perit Dial Int. 2007;27(1):56-60.

98. Kobayashi K, Nakamoto H, Okada S, Hoshitani K, Uchida K, Arima H, et al. Efficacy and safety of meropenem plus tobramycin followed by meropenem plus vancomycin for treating peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Adv Perit Dial. 2006;22:65-8.

99. Leung CB, Szeto CC, Chow KM, Kwan BC, Wang AY, Lui SF, et al. Cefazolin plus ceftazidime versus imipenem/cilastatin monotherapy for treatment of CAPD peritonitis--a randomized controlled trial. Perit Dial Int. 2004;24(5):440-6.

100. Wong KM, Chan YH, Cheung CY, Chak WL, Choi KS, Leung SH, et al. Cefepime versus vancomycin plus netilmicin therapy for continuous ambulatory peritoneal dialysis-associated peritonitis. Am J Kidney Dis. 2001;38(1):127-31.

101. Cheng IK, Fang GX, Chau PY, Chan TM, Tong KL, Wong AK, et al. A randomized prospective comparison of oral levofloxacin plus intraperitoneal (IP) vancomycin and IP netromycin plus IP vancomycin as primary treatment of peritonitis complicating CAPD. Perit Dial Int. 1998;18(4):371-5.

102. Lye WC, Lee EJ, van der Straaten J. Intraperitoneal vancomycin/oral pefloxacin versus intraperitoneal vancomycin/gentamicin in the treatment of continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis. Perit Dial Int. 1993;13 Suppl 2:S348-50.

103. Yeung SM, Walker SE, Tailor SA, Awdishu L, Tobe S, Yassa T. Pharmacokinetics of oral ciprofloxacin in continuous cycling peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2004;24(5):447-53.

104. Chan MK, Cheng IK, Ng WS. A randomized prospective trial of three different regimens of treatment of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis. 1990;15(2):155-9.

105. Perez-Fontan M, Rosales M, Fernandez F, Moncalian J, Fernandez-Rivera C, Alonso A, et al. Ciprofloxacin in the treatment of gram-positive bacterial peritonitis in patients undergoing CAPD. Perit Dial Int. 1991;11(3):233-6.

106. Shin JH, Kim SH, Jeong HS, Oh SH, Kim HR, Lee JN, et al. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid using 16S ribosomal RNA, tuf, and SodA gene sequencing. Perit Dial Int. 2011;31(3):340-6.

107. Szeto CC, Kwan BC, Chow KM, Lau MF, Law MC, Chung KY, et al. Coagulase negative staphylococcal peritonitis in peritoneal dialysis patients: review of 232 consecutive cases. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3(1):91-7.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

108. Szeto CC, Chow KM, Chung KY, Kwan BC, Leung CB, Li PK. The clinical course of peritoneal dialysis-related peritonitis caused by Corynebacterium species. Nephrol Dial Transplant. 2005;20(12):2793-6.

109. Ghali JR, Bannister KM, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, Johnson DW, et al. Microbiology and outcomes of peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients. Perit Dial Int. 2011;31(6):651-62.

110. Perez-Fontan M, Rodriguez-Carmona A, Rodriguez-Mayo M. Enterococcal peritonitis in peritoneal dialysis patients: last name matters. Perit Dial Int. 2011;31(5):513-7.

111. Rosman JB, Johnson DW. Enterococcal peritonitis in peritoneal dialysis: the danger from within? Perit Dial Int. 2011;31(5):518-21.

112. Edey M, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Enterococcal peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients: predictors, treatment and outcomes in 116 cases. Nephrol Dial Transplant. 2010;25(4):1272-8.

113. Shukla A, Abreu Z, Bargman JM. Streptococcal PD peritonitis--a 10-year review of one centre's experience Nephrol Dial Transplant. 2006;21(12):3545-9.

114. Szeto CC, Chow KM, Kwan BC, Law MC, Chung KY, Yu S, et al. Staphylococcus aureus peritonitis complicates peritoneal dialysis: review of 245 consecutive cases. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2(2):245-51.

115. Govindarajulu S, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Staphylococcus aureus peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients: predictors, treatment, and outcomes in 503 cases. Perit Dial Int. 2010;30(3):311-9.

116. Siva B, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Pseudomonas peritonitis in Australia: predictors, treatment, and outcomes in 191 cases. Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4(5):957-64.

117. Jarvis EM, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Predictors, treatment, and outcomes of non-Pseudomonas Gram-negative peritonitis. Kidney Int. 2010;78(4):408-14.

118. Lee JY, Park JS, Oh SH, Kim HR, Lee JN, Shin JH. Acute infectious peritonitis caused by Vibrio fluvialis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(2):216-8.

119. Valdes-Sotomayor J, Cirugeda A, Bajo MA, del Peso G, Escudero E, Sanchez-Tomero JA, et al. Increased severity of Escherichia coli peritonitis in peritoneal dialysis patients independent of changes in in vitro antimicrobial susceptibility testing. Perit Dial Int. 2003;23(5):450-5.

120. Szeto CC, Li PK, Leung CB, Yu AW, Lui SF, Lai KN. Xanthomonas maltophilia peritonitis in uremic patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis. 1997;29(1):91-5.

121. Tzanetou K, Triantaphillis G, Tsoutsos D, Petropoulou D, Ganteris G, Malamou-Lada E, et al. Stenotrophomonas maltophilia peritonitis in CAPD patients: susceptibility to antibiotics and treatment outcome: a report of five cases. Perit Dial Int. 2004;24(4):401-4.

122. Schiller B, Alcaraz M, Hadley K, Moran J. Peritonitis and zoonosis: your best friend sometimes isn't! Perit Dial Int. 2011;31(2):127-30.

123. Castellano I, Marin JP, Gallego S, Mora M, Rangel G, Suarez MA, et al. Pasteurella canis peritonitis in a peritoneal dialysis patient. Perit Dial Int. 2011;31(4):503-4.

124. Piraino B. Insights on peritoneal dialysis-related infections. Contrib Nephrol. 2009;163:161-8.

125. Perez Fontan M, Rodriguez-Carmona A, Garcia-Naveiro R, Rosales M, Villaverde P, Valdes F. Peritonitis-related mortality in patients undergoing chronic peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2005;25(3):274-84.

126. Barraclough K, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Polymicrobial peritonitis in peritoneal dialysis patients in Australia: predictors, treatment, and outcomes. Am J Kidney Dis. 2010;55(1):121-31.

127. Faber MD, Yee J. Diagnosis and management of enteric disease and abdominal catastrophe in peritoneal dialysis patients with peritonitis. Adv Chronic Kidney Dis. 2006;13(3):271-9.

128. Nagappan R, Collins JF, Lee WT. Fungal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis--the Auckland experience. Am J Kidney Dis. 1992;20(5):492-6.

129. Michel C, Courdavault L, al Khayat R, Viron B, Roux P, Mignon F. Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis. Am J Nephrol. 1994;14(2):113-20.

130. Goldie SJ, Kiernan-Tridle L, Torres C, Gorban-Brennan N, Dunne D, Kliger AS, et al. Fungal peritonitis in a large chronic peritoneal dialysis population: a report of 55 episodes. Am J Kidney Dis. 1996;28(1):86-91.

131. Wang AY, Yu AW, Li PK, Lam PK, Leung CB, Lai KN, et al. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. Am J Kidney Dis. 2000;36(6):1183-92.

132. Prasad KN, Prasad N, Gupta A, Sharma RK, Verma AK, Ayyagari A. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis: a single centre Indian experience. J Infect. 2004;48(1):96-101.

133. Bibashi E, Memmos D, Kokolina E, Tsakiris D, Sofianou D, Papadimitriou M. Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during an 11-year period: report of 46 cases. Clin Infect Dis. 2003;36(7):927-31.

134. Kaitwatcharachai C. Candida parapsilosis peritonitis in patients on CAPD. Mycopathologia. 2002;154(4):181-4.

135. Chou CY, Kao MT, Kuo HL, Liu JS, Liu YL, Huang CC. Gram-negative and polymicrobial peritonitis are associated with subsequent fungal peritonitis in CAPD patients. Perit Dial Int. 2006;26(5):607-8.

136. Castillo AA, Lew SQ, Smith A, Whyte R, Bosch JP. Vaginal candidiasis: a source for fungal peritonitis in peritoneal dialysis? Perit Dial Int. 1998;18(3):338-9.

137. Zaruba K, Peters J, Jungbluth H. Successful prophylaxis for fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis: six years' experience. Am J Kidney Dis. 1991;17(1):43-6.

138. Robitaille P, Merouani A, Clermont MJ, Hebert E. Successful antifungal prophylaxis in chronic peritoneal dialysis: a pediatric experience. Perit Dial Int 1995;15:77-9.

139. Thodis E, Vas SI, Bargman JM, Singhal M, Chu M, Oreopoulos DG. Nystatin prophylaxis: its inability to prevent fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 1998;18:583-9.

140. Hung YM, Chan HH, Chung HM. Tuberculous peritonitis in different dialysis patients in Southern Taiwan. Am J Trop Med Hyg. 2004;70(5):532-5.

141. White R, Abreo K, Flanagan R, Gadallah M, Krane K, el-Shahawy M, et al. Nontuberculous mycobacterial infections in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Am J Kidney Dis. 1993;22(4):581-7.

142. Leonard D. Molecular Pathology in Clinical Practice. 1st ed. New York: Springer; 2007.

143. McMurry J. Organic Chemistry. 6th ed: Brooks Cole; 2003.

144. O'Neil M. The Merck Index. 14th ed. New Jersey: Merck & Co; 2006.

145. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

146. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239(4839):487-91.

Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายกิตติศักดิ์ ตั้งจิตตรง

วัน เดือน ปี เกิด 5 สิงหาคม พ.ศ. 2525

ภูมิลำเนา จังหวัดชลบุรี

ประวัติการศึกษา

ชั้นมัธยมศึกษา โรงเรียนชลราษฎรอำรุง จ.ชลบุรี

พ.ศ. 2537-2542

แพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2542-2548

วุฒิบัตรสาขาอายุรศาสตร์ทั่วไป จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2551-2554

ประวัติการปฏิบัติงาน

แพทย์เพิ่มพูนทักษะโรงพยาบาลชลบุรี จ.ชลบุรี พ.ศ.2548-2549

แพทย์เวชปฏิบัติทั่วไปโรงพยาบาลบางละมุง จ.ชลบุรี พ.ศ.2549-2551

ตำแหน่งการทำงานปัจจุบัน

แพทย์ประจำบ้านต่อยอดอายุรศาสตร์อนุสาขาโรคไต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University