

DEVELOPMENT OF BACTERIAL DIAGNOSTIC METHOD USING 16S rDNA FOR PD-
RELATED PERITONITIS PATIENTS

Miss Kwanta Petphuak



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.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

การพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในช่องท้องโดยใช้ 16S rDNA ในผู้ป่วยไตวายที่
ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในช่องท้องโดยใช้ 16S rDNA ในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง
โดย	นางสาวขวัญตา เพชรเผือก
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไชยภรณ์ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์ พิสุทธิ กตเวทิน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(แพทย์หญิง ปิยะธิดา จึงสมาน)

ขวัญตา เพชรเผือก : การพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในช่องท้องโดยใช้ 16S rDNA ในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง (DEVELOPMENT OF BACTERIAL DIAGNOSTIC METHOD USING 16S rDNA FOR PD-RELATED PERITONITIS PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ, หน้า.

ความเป็นมา: ภาวะเยื่อช่องท้องอักเสบ (peritonitis) เป็นปัญหาที่สำคัญที่เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยต้องยุติการล้างไตทางช่องท้อง การเพาะเลี้ยงเชื้อใช้ระยะเวลา 3-5 วันจึงจะทราบผลการเพาะเชื้อว่าเป็นเชื้อชนิดใด และอาจส่งผลต่อการเลือกยาปฏิชีวนะรักษาผู้ป่วย จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคโดยใช้ 16S rDNA ในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยเยื่อช่องท้องอักเสบเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยต่อไป

วิธีการศึกษา ตัวอย่างน้ำยาล้างไตทางช่องท้องจากผู้ป่วยเยื่อช่องท้องอักเสบจำนวน 102 ตัวอย่าง นำไปปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที 15 นาที นำไปสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ตรวจวินิจฉัยโดยใช้ 16S rDNA ด้วยวิธี conventional PCR และ Real-time PCR โดยมีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น gold standard

ผลการศึกษา: ตัวอย่าง 102 ตัวอย่าง นำไปตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี conventional PCR ได้ผลเป็นบวกร้อยละ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีค่าความไว ความจำเพาะร้อยละ 26.09 และ 96.97 ตามลำดับ มีค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบร้อยละ 94.74 และ 38.55 ตามลำดับ การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้ผลเป็นบวกร้อยละ 66 มีค่าความไวความจำเพาะร้อยละ 73.91 และ 51.52 ตามลำดับ มีค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบร้อยละ 76.12 และ 48.57ตามลำดับ

สรุป: จากผลการศึกษาพบว่าวิธี Real-time PCR มีค่าความไวดีกว่า conventional PCR แต่มีค่าความจำเพาะต่ำกว่า conventional PCR แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเทคนิคเพื่อให้มีค่าความไว ความจำเพาะที่เพิ่มมากขึ้นเพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเยื่อผนังช่องท้อง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5474108130 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: PERITONITIS / 16S RDNA / POLYMERASE CHAIN REACTION

KWANTA PETPHUAK: DEVELOPMENT OF BACTERIAL DIAGNOSTIC METHOD USING 16S rDNA FOR PD-RELATED PERITONITIS PATIENTS. ADVISOR: ASSOC. PROF. TALERNGSAK KANJANABUCH, CO-ADVISOR: SUPAPORN WACHARAPLUESADEE, pp.

Introduction and Objective: Peritonitis is a significant problem that causes patients to discontinue peritoneal dialysis. And culture technique take time around 3-5 days to know result and its effect to treatment patients. Now, has been developed by using 16s rDNA techniques to help in the diagnosis of bacterial infections in peritonitis patients for maximum efficiency in treatment.

Methods: 102 peritoneal dialysis fluid samples from 4 hospitals were collected and spin at 3,000 rpm 15 minutes. DNA extraction by phenol-chloroform technique and evaluated used 16S rDNA primer by PCR technique, Real-time PCR technique and sequencing. Compared result with culture as gold standard.

Results: 102 peritoneal dialysis fluids. The PCR method has positive rate 19%, sensitivity and specificity compared to culture was calculated as 26.09% and 96.97%, respectively. The positive predictive Value and Negative Predictive Value were calculated as 94.74% and 38.55%, respectively. Real-time PCR method had positive rate 66%, sensitivity and specificity compared to culture were calculated as 73.91% and 51.52%, respectively. The positive predictive Value and Negative Predictive Value were calculated as 76.12% and 48.57%, respectively. PCR result has low sensitivity because low amount of DNA concentration in peritoneal dialysis samples.

Conclusion: Real-time has sensitivity better than PCR technique but specificity lower than PCR technique. Further study needs to improve more sensitivity and specificity in diagnostic peritonitis.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาติที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ขอขอบคุณความช่วยเหลือ คำแนะนำและคำปรึกษาอันมีประโยชน์มีคุณค่ายิ่ง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรวบรวมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งหมด ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของเจ้าหน้าที่ แพทย์พยาบาล โรงพยาบาลบ้านแพ้ว (สาขาพร้อมมิตร) โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร และโรงพยาบาลพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน โดยเฉพาะคณาจารย์สังกัดคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัยจนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญาโทมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ต็อกเตอร์ ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำและคำปรึกษาอันมีประโยชน์ยิ่ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์วิจัยโรคไตและความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางสาวพรทิพย์สุวรรณ นวลทอง นายวศิน มนุประเสริฐ นางสาวณัฐนิชา ห่วงงาม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งข้อมูลความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ อันมีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว “เพชรผ็อก” และนายทวีชัย นันทศรีนนท์ ที่เหน็ดเหนื่อยเพื่อให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรัก และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	12
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
2.1 การติดเชื้อของเยื่อพุงผนังช่องท้อง (Peritonitis).....	17
2.2 Bacterial Taxonomy.....	27
2.3 การวิเคราะห์ 16S rDNA.....	31
2.4 Polymerase chain reaction (PCR).....	33
2.5 Real-Time PCR.....	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	58
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย สรุป และข้อเสนอแนะ.....	80
รายการอ้างอิง.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	95

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงนิยาม true positive, true negative, false positive และ false negative	44
ตารางที่ 2	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออก ของ 16S rDNA gene	50
ตารางที่ 3	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา conventional PCR เพื่อตรวจหาการ แสดงออกของ 16S rDNA gene	51
ตารางที่ 4	แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	52
ตารางที่ 5	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา Real-time PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออกของ 16S rDNA.....	54
ตารางที่ 6	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออก ของ 16S rDNA gene	55
ตารางที่ 7	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออก ของ GAPDH gene	56
ตารางที่ 8	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา conventional PCR เพื่อตรวจหาการ แสดงออกของ GAPDH gene.....	57
ตารางที่ 9	แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	58
ตารางที่ 10	แสดงชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างน้ำยา PD.....	65
ตารางที่ 11	แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ PCR.....	69
ตารางที่ 12	แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและ PCR sequencing	71
ตารางที่ 13	แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ real-time PCR.....	74
ตารางที่ 14	แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่าง PCR และ real-time PCR.....	77

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ broad-range PCR ของ CAPD culture fluid โดย Kim SH และคณะ 78

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาในครั้งนี้กับผลการศึกษาโดย Kim SH และคณะ 78

ตารางที่ 17 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาในครั้งนี้ กับผลการศึกษาโดย Ciesielczuk HL และคณะ โดยวิธี real-time PCR 79



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย.....	15
รูปที่ 2 แสดงผลการย้อมสีแกรมของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ[22].....	21
รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างของวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ blood agar (ก), chocolate agar (ข) และ MacConkey agar (ค).....	23
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ 16S rRNA.....	32
รูปที่ 5 แสดงการทำงานของ SYBR Green I dye.....	37
รูปที่ 6 แสดงการทำงานของ Hybridization probe.....	38
รูปที่ 7 แสดงการทำงานของ Taqman Probe.....	39
รูปที่ 8 แสดงการทำงานของ molecular beacons.....	39
รูปที่ 9 แสดงการทำงานของ Scorpion probes.....	40
รูปที่ 10 แสดงการให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis.....	43
รูปที่ 11 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16s rDNA โดยวิธี conventional PCR โดยที่ (1) คือ 10^{-1} และ (10) คือ 10^{-10}	59
รูปที่ 12 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR สกัด DNAโดยวิธี boiling spike เชื้อ <i>E. coli</i> โดยที่ (1) คือ 10^8 และ (8) คือ 10^8	60
รูปที่ 13 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี boiling spike เชื้อ <i>S. aureus</i> โดยที่ (1) คือ 10^8 และ (8) คือ 10^8	61
รูปที่ 14 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR โดยการเติม lysozyme spike เชื้อ <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> โดยที่ (1) คือ 10^8 <i>E. coli</i> , (7) คือ 10^2 <i>E. coli</i> , (8) คือ 10^8 <i>S. aureus</i> และ (13) คือ 10^3 <i>S. aureus</i>	62
รูปที่ 15 แสดง amplification curves ของการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี real-time PCR โดยที่ (1) คือ 10^{-1} , (2) คือ 10^{-2} และ (3) คือ 10^{-3}	63

รูปที่ 16 แสดง melting peaks ของการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี real-time PCR 63

รูปที่ 17 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างน้ำยา PD จากผู้ป่วย..... 64

รูปที่ 18 แสดงเชื้อชนิดต่างๆ ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากน้ำยา PD..... 66

รูปที่ 19 แสดงผลการทดสอบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย 16S rDNA โดยที่ (1) คือ 60°C, (2) คือ 59°C, (3) คือ 57°C, (4) คือ 54.3°C, (5) คือ 50.9°C, (6) คือ 48.1°C, (7)คือ 46.1°C, (8) คือ 45°C 67

รูปที่ 20 แสดงผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR 68

รูปที่ 21 แสดงตัวอย่างผลการตรวจหา PCR product โดยวิธี gel electrophoresis 68

รูปที่ 22 แสดงตัวอย่างผลที่ได้จากการ sequencing 71

รูปที่ 23 แสดงผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR 73

รูปที่ 24 แสดงตัวอย่างกราฟของ melting peaks จากปฏิกิริยา real-time PCR 73

รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างกราฟของ amplification curves จากปฏิกิริยา real-time PCR 74

รูปที่ 26 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ PCR และ real-time PCR 77

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย เป็นภาวะที่ไตไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ไตสูญเสียหน้าที่การทำงานอย่างเรื้อรังเป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดการสะสมของน้ำ ของเสีย และสารพิษในร่างกาย เกิดโรคความดันโลหิตสูง เลือดเป็นกรด (acidosis) ความผิดปกติของกรดไขมันและคอเลสเตอรอล เป็นต้น ผู้ป่วยจะเริ่มต้นจากการมีอาการบวมตามบริเวณแขน ขา รู้สึกอ่อนเพลีย หอบเหนื่อย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน รู้สึกง่วงซึม สับสน จนถึงชัก หมดสติ และเสียชีวิตได้ จำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนทางไตเพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้[1] หนึ่งในวิธีการบำบัดทดแทนไตคือ การล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis: PD) ซึ่งเป็นการพอกของเสียและขจัดของเหลวส่วนเกินออกจากร่างกายโดยผ่านเยื่อผนังช่องท้อง (peritoneal membrane)[2] พบว่าการติดเชื้อของเยื่อผนังช่องท้อง (peritonitis) เป็นปัญหาสำคัญทำให้ผู้ป่วยต้องยุติการทำ PD และการติดเชื้อที่รุนแรงหรือเรื้อรังยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อผนังช่องท้อง (membrane failure) หรือทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต จากการสำรวจศูนย์การล้างไตทางช่องท้องทั่วประเทศในช่วงระหว่าง วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2552 ถึง 30 กันยายน พ.ศ.2553[3] พบว่าประเทศไทยมีอุบัติการณ์การอักเสบของเยื่อช่องท้อง เฉลี่ย 25.5 เดือนต่อ 1 อุบัติการณ์

สมาคมการล้างไตทางช่องท้องนานาชาติ (International Society for Peritoneal Dialysis: ISPD) พ.ศ. 2553[4] แนะนำให้ใช้เกณฑ์การวินิจฉัยทางคลินิก 2 ใน 3 ข้อเพื่อบ่งชี้ภาวะ peritonitis ดังนี้ 1) น้ำยา PD ที่ปล่อยออกมาจากช่องท้องมีความขุ่น หรือมีอาการทางคลินิกของการติดเชื้อ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ หรืออาเจียน 2) ตรวจพบเม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 cell/mm^3 และในจำนวนนี้เป็น polymorphonuclear neutrophils (PMN) มากกว่าร้อยละ 50 3) พบเชื้อจุลินทรีย์จากการเพาะเลี้ยงเชื้อหรือย้อมสีแกรม ซึ่งในที่ประชุมคณะกรรมการเฉพาะกิจของที่ประชุม ISPD ได้แนะนำให้มีการเพาะเชื้อ 2 วิธีร่วมกันคือ large volume culture โดยการนำน้ำตะกอน 3-5 ml ที่ได้จากการปั่นแยกตัวอย่างน้ำยา PD ปริมาตร 50-100 ml ด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา

15 นาที มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาตร 3-5 ml แบ่งไปเพาะเลี้ยงในวุ้นเลี้ยงเชื้อ (solid media หรือ agar plate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนวิธีที่สองคือ Bedside culture โดยการนำน้ำยาปริมาตร 5-10 ml มาแบ่งเพาะในขวด nutrient broth จำนวน 2 ขวด ในกรณีที่ไม่สามารถปั่นตะกอนน้ำยา PD ได้ อาจอนุโลมเหลือแต่เพียงวิธี bedside nutrient broth เท่านั้น แต่อาจทำให้อุบัติการณ์การเพาะเชื้อขึ้นลดลงเหลือเพียงร้อยละ 80 จากการสำรวจศูนย์การล้างไตทางช่องท้องทั่วประเทศในช่วงระหว่าง วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2553 พบว่ามีผลการเพาะเชื้อเป็นลบถึง 34.5%[3] โดยอาจมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดของขั้นตอนในกระบวนการเก็บตัวอย่างส่งตรวจของความไวของกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ การได้รับยาปฏิชีวนะก่อนทำการส่งเพาะเชื้อ หรือความล่าช้าในการส่งตรวจ ก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้ป่วยหลายประการ ทำให้แพทย์ให้ยาปฏิชีวนะไม่ตรงกับเชื้อ ให้ยาไม่เพียงพอและอาจให้ยามากจนเหนียวนำไปเกิดเชื้อดื้อยา

การใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยเป็นวิธีที่รวดเร็วที่สามารถตรวจวัดและสามารถแบ่งแยกชนิดของการติดเชื้อแบคทีเรียได้ โดยการใช้ยีน 16S rDNA ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนที่ใช้ transcribe สาย ribosomal RNA และ ribosomal RNA เพื่อควบคุมและใช้เป็นกลจักรในการสร้างโปรตีนของเซลล์โพรคาริโอต ได้แก่ แบคทีเรีย chlamydic, *Rickettsia* และ *Mycobacterium* เนื่องจากเป็นกลุ่มยีนที่มีทั้ง highly conservative structure ทำให้สามารถหา common primer ในการทำ PCR ได้ทั้งกลุ่ม และ highly variable region จึงทำให้สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ species ของเชื้อด้วยขบวนการ sequencing ได้[5, 6] มีงานวิจัยหลายงานที่นำ 16S rDNA มาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งในตัวอย่างจากกลุ่มโรคอื่นๆ[7-9] หรือจากผู้ป่วย PD ที่มีอาการเยื่อช่องท้องอักเสบด้วยวิธี PCR โดยใช้ 16S rDNA เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ[10] ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการเยื่อช่องท้องอักเสบมีค่า sensitivity, specificity และค่า negative predictive value เท่ากับร้อยละ 69, 63 และ 100 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า sensitivity และ specificity ที่น้อยเกินไป ทำให้ไม่นิยมนำเทคนิค PCR มาใช้ในการวินิจฉัยภาวะ peritonitis ในผู้ป่วย PD

จากที่กล่าวมาข้างต้น แม้การเพาะเลี้ยงเชื้อจัดได้ว่าเป็นมาตรฐานในการวิเคราะห์ชนิดของเชื้อก่อโรคในปัจจุบัน แต่มักใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน และในหลายครั้งผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น

ลบทำให้ไม่สามารถทราบชนิดของเชื้อก่อโรค ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญที่จะนำเทคนิควิธีการวิเคราะห์แยกเชื้อด้วยเทคนิค PCR มาใช้ในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยแทนวิธีการมาตรฐาน

คำถามงานวิจัย (Research Questions)

สามารถใช้การตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี PCR เพื่อวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อในช่องท้องของผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

เพื่อพัฒนาเทคนิคการค้นหาและคัดแยกชนิดของการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วย peritonitis ด้วยวิธี PCR โดยใช้ยีน 16S rDNA

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

การตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี PCR มีความไวและมีความจำเพาะเพียงพอในการวินิจฉัยการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่มี peritonitis

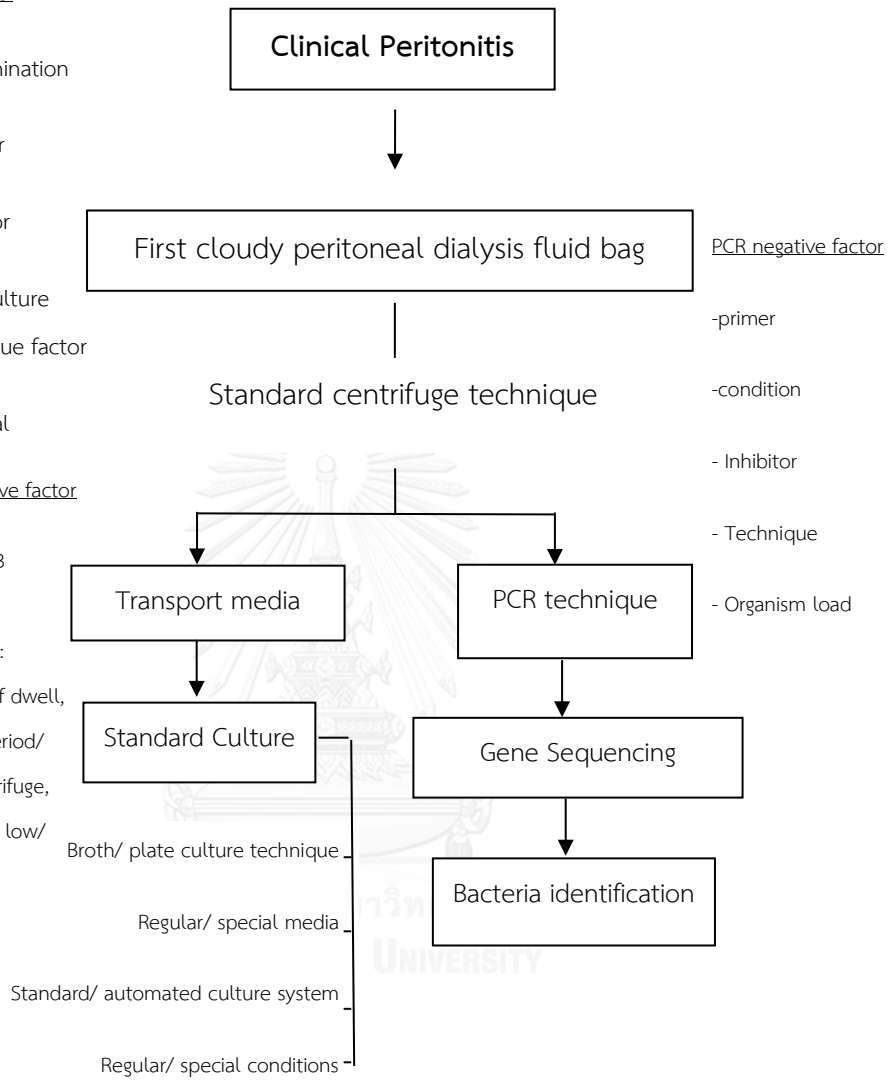
กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)

Influencing factors:

- Contamination
- Transfer
- Pt factor
- PCR/ culture technique factor
- Bacterial

Culture negative factor

- Pt: pre ATB
- Organism
- Technique: duration of dwell, transfer period/ time, centrifuge,
- PDF: conc, low/



รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ไม่มี

ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitations)

ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Definition of Terms)

peritonitis เป็นภาวะที่มีการอักเสบของเยื่อช่องท้อง เกิดได้จากหลายสาเหตุและการอักเสบอาจเกิดขึ้นเฉพาะที่หรือเกิดขึ้นทั่วท้องก็ได้

คำสำคัญ (Keywords)

Peritonitis

16S rDNA

Polymerase chain reaction



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits)

- 1) เพื่อเป็นการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่มีการติดเชื้อ
- 2) เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในการล้างไตทางช่องท้องด้วยวิธี PCR และถอดรหัสพันธุกรรม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การติดเชื้อของเยื่อพุงช่องท้อง (Peritonitis)

ภาวะติดเชื้อของเยื่อพุงช่องท้อง (peritonitis) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญในผู้ป่วยที่รับการรักษาด้วยการล้างไตทางช่องท้อง ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยต้องเปลี่ยนวิธีการรักษาวิธีอื่น คือ การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis: HD) และในบางรายอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ [11] ซึ่งการติดเชื้อของเยื่อพุงช่องท้อง สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ 1) Touch contamination เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อโรคในขณะที่มีการเปลี่ยนถายน้ำยา ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อในกลุ่มของ normal flora ได้แก่ *Corynebacterium* spp., coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS), และ *Bacillus* spp. พบอุบัติการณ์การติดเชื้อด้วยวิธีนี้ร้อยละ 30-40[12, 13] 2) Catheter-related (peri-luminal) route เป็นการติดเชื้อผ่านทางด้านข้างสาย Tenckhoff มักเกิดขึ้นร่วมกับการติดเชื้อของบริเวณทางออกของสาย มีอุบัติการณ์การติดเชื้อวิธีนี้ร้อยละ 20-30[12, 14] 3) Enteric route เกิดจากการที่เชื้อโรคเข้าสู่ลำไส้ทางช่องท้องจากอวัยวะภายในช่องท้อง พบในรายที่มีอาการท้องอืด ได้รับยาลดกรดเป็นระยะเวลานานๆ การทำหัตถการและมีพยาธิสภาพของอวัยวะในช่องท้อง มีอัตราการติดเชื้อด้วยวิธีนี้ร้อยละ 20-30[12, 15] 4) Hematogenous route เกิดการติดเชื้อผ่านทางกระแสเลือด มีอุบัติการณ์ร้อยละ 5-10 5) Gynaecological route เกิดการติดเชื้อเข้าสู่ช่องท้องจากเชื้อโรคผ่านทางช่องคลอดและปากมดลูก [12, 16]

2.1.1 อุบัติการณ์การติดเชื้อ

จากการสำรวจอุบัติการณ์การติดเชื้อ peritonitis ของประเทศไทย ในรอบปี พ.ศ. 2554 ของหน่วยงาน PD จำนวน 102 หน่วยงานจากทั้งหมด 116 หน่วยงานหรือคิดเป็นร้อยละ 88 พบว่ามีอัตราการเกิด peritonitis ของหน่วยงานเท่ากับ 1 ครั้งทุก 25.5 เดือน หรือเท่ากับ 0.47ครั้ง/ปี ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดโดยคณะกรรมการทวิภาคีเอเชีย-แปซิฟิก (Asia-Pacific KPIs) ที่ไม่เกิน 0.30 ครั้ง/ปี หรือไม่บ่อยกว่า 40 เดือน/ครั้ง และมีเพียง 16 ใน 94 หน่วยงาน PD เท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน และเมื่อพิจารณาเกณฑ์ขั้นต่ำที่ยอมรับได้กำหนดโดยคณะกรรมการเฉพาะกิจ ISPD ปี พ.ศ. 2553 คือ หน่วยงาน PD ต้องมีอัตราการติดเชื้อไม่มากกว่า 0.67 ครั้ง/คน/ปี หรือไม่ถี่กว่า 1 ครั้งทุกๆ 18 เดือน หากต่ำกว่านี้ค่านี้อาจถือว่าหน่วยงานนั้นตกเกณฑ์มาตรฐาน พบว่าเกือบร้อยละ 25 ของ

หน่วยงาน PD ในประเทศ หรือ 23 ใน 94 หน่วยไม่ผ่านเกณฑ์ขั้นต่ำนี้ นอกจากนี้ พบว่าเชื้อก่อโรคที่พบว่าเป็นสาเหตุหลักในการเกิด peritonitis ในประเทศไทยเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รองลงมาคือกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ[3, 4, 12]

2.1.2 ปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ

สามารถแบ่งปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1.2.1 ปัจจัยที่สัมพันธ์กับเชื้อก่อโรค โดยในเชื้อก่อโรคบางชนิดจะมีความสามารถในการสร้างสารที่สามารถป้องกันการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะและขบวนการอักเสบของเซลล์ เรียกสารชนิดนั้นว่า biofilm ซึ่งสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังและสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ง่าย โดยที่ biofilm จะประกอบไปด้วยกลุ่มของเชื้อก่อโรคที่อาศัยอยู่บนผิววัสดุ (solid surface) ร่วมกับสารประกอบเชิงซ้อนที่สร้างขึ้นจากตัวของเชื้อก่อโรคเอง กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharide และโปรตีน เรียกว่า extracellular polymeric substance มีคุณสมบัติในการยับยั้งและป้องกันไม่ให้สารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์เข้ามาทำลายเชื้อก่อโรคที่อาศัยอยู่ภายใน โดยมักจะเป็นเชื้อในกลุ่มของ *S. aureus*, *S. epidermidis*, enterococci, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Escherichia coli* และ *Candida* โดยสาเหตุที่เชื้อก่อโรคเหล่านั้นทนทานต่อยาปฏิชีวนะและการทำลายจากกระบวนการภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดีเนื่องมาจาก ตัวเชื้อก่อโรคเองสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการผ่านเข้าออกของยาปฏิชีวนะและทำลายฤทธิ์ของยาได้ เรียกว่า mucopolysaccharide, ตัวเชื้อก่อโรคมีอัตราการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวที่ช้า เชื้อก่อโรคมีความสามารถในการสร้างสารที่สามารถยับยั้งการขนส่งยาปฏิชีวนะและทำลายฤทธิ์ยาจนไม่เป็นอันตรายต่อตัวเชื้อและการป้องกันยับยั้ง phagocyte ไม่ให้สามารถทำลายเชื้อก่อโรคได้ เป็นต้น[12, 17, 18]

2.1.2.2 ปัจจัยที่สัมพันธ์กับตัวผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อมากกว่ากลุ่มอื่นๆ คือ ในกลุ่มผู้ป่วยเด็ก ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายบกพร่อง และ ผู้ป่วยที่มีฐานะทางเศรษฐกิจไม่ดี [12, 19]

2.1.2.3 ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการทำ PD ได้แก่

ก) คุณสมบัติของน้ำยา PD พบว่า น้ำยา PD มีความปลอดภัยและให้ผลทางการรักษา ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 3-5 ปี และยังพบอีกว่ามีคุณสมบัติหลายประการของน้ำยาที่มีส่วนส่งเสริมให้สามารถเกิด peritonitis ง่ายและรุนแรงยิ่งขึ้น ได้แก่

ก.1) น้ำยา PD มีความเป็นกรดและความเข้มข้น osmolality ที่สูง โดยน้ำยา PD ที่ใช้ใน ปัจจุบันมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ค่อนข้างต่ำ เฉลี่ย 5.2-5.5, มีความเข้มข้นของ osmolality ที่สูงกว่า พลาสมาถึง 1.3-1.8 เท่า มีอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลกลูโคสและที่เกิดจากการสีก กร่อนของสารสังเคราะห์ที่นำมาผสมรวมกับวัสดุพีวีซี เพื่อช่วยให้ถุงบรรจุน้ำยามีลักษณะอ่อนนุ่มที่ เรียกว่า plasticizer (di-2-ethylhexy phthalate: DEHP) ซึ่งล้วนส่งผลเสียต่อการทำงานของเซลล์ เม็ดเลือดขาว รวมทั้งส่งผลเสียต่อการทำงานของเซลล์ mesothelium ในการแสดงปฏิกิริยา ตอบสนองต่อการติดเชื้อ

ก.2) ในน้ำยา PD มีระดับของแคลเซียมที่น้อยกว่าในพลาสมาของผู้ป่วย ส่งผลให้ เซลล์ macrophage ทำงานได้ลดลงในสภาพแวดล้อมที่มีแคลเซียมต่ำ ทำให้เสี่ยงต่อการเกิด peritonitis มากขึ้น

ก.3) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำยาวันละหลายๆ ครั้ง จะมีความเสี่ยงใน การเกิด peritonitis เพิ่มขึ้นเนื่องจากจะเจือจางระดับของแอนติบอดี, cytokine และ opsonin ภายในช่องท้อง ซึ่งจะแปรผกผันกับความสามารถในการจับกินและการฆ่าเชื้อของเซลล์ macrophage

ก.4) น้ำยา PD มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูง[20] และตัวน้ำตาล กลูโคสเองก็เป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีพของเชื้อแบคทีเรียและ เชื้อรา ซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการเกิด peritonitis ได้ง่าย

ข) เทคนิคการเปลี่ยนถ่ายน้ำยา การปรับเปลี่ยนเทคนิคในการเปลี่ยนถ่ายน้ำยา สามารถลดอัตราการเกิด peritonitis ได้ โดยพบว่า ระบบการเปลี่ยนถ่ายน้ำยาแบบ “Flush before fill” สามารถลดการเกิด peritonitis ในทุกประเทศได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับระบบ “Single-bag”[12, 19]

2.1.3 ลักษณะทางคลินิก

ผู้ป่วย peritonitis ส่วนใหญ่จะมาด้วยอาการปวดท้อง น้ำยา PD ชุ่น และในบางรายอาจมาด้วยภาวะบวมจากการขาดทุนน้ำยา PD, มีไข้ หรืออาจมีอาการแสดงของอวัยวะที่เป็นต้นเหตุของการเกิด peritonitis ยกตัวอย่างเช่น การอักเสบติดเชื้อของช่องทางออกของสาย ช่องคลอด ฟัน และปอด เป็นต้น ผู้ป่วยมักมีอาการปวดท้องที่แตกต่างกันไป อาจมีอาการปวดท้องที่รุนแรง ปวดเพียงเล็กน้อย หรือไม่ปวดเลยก็ได้ ซึ่งความรุนแรงของอาการปวดท้องสามารถบอกได้ถึงเชื้อที่เป็นสาเหตุในการติดเชื้อ เช่น CoNS peritonitis มักไม่ค่อยปวดท้องหรือปวดไม่รุนแรง ส่วน peritonitis ที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* และ *S. aureus* มักมีอาการปวดท้องที่รุนแรงกว่า [4, 12, 21]

2.1.4 การวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค

2.1.4.1 เกณฑ์การวินิจฉัย ในการวินิจฉัย peritonitis ใช้อาการและอาการแสดงทางคลินิก 2 ใน 3 ข้อดังนี้คือ

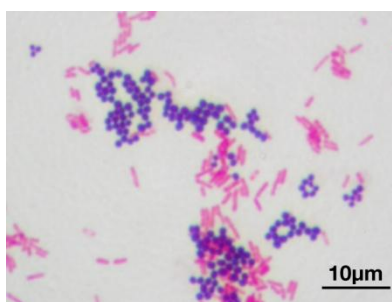
ก) ผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงที่บ่งชี้ถึงการอักเสบของเยื่อผนังช่องท้อง ได้แก่ อาการปวดท้อง กดเจ็บทั่วๆ ไปของผิวหนังบริเวณหน้าท้อง และการตรวจพบ rebound tenderness

ข) น้ำยา PD ที่ถ่ายออกมามีความขุ่น (cloudy effluent) หรือตรวจพบเม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 ตัว/ไมโครลิตรและพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil มากกว่าร้อยละ 50 โดยสัดส่วนของ neutrophil มีความสำคัญ เนื่องจากปกติในน้ำยา PD ที่ค้างในช่องท้องผู้ป่วยนาน 4 ถึง 6 ชั่วโมง จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่เกิน 50 ตัว/ไมโครลิตร และส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดี่ยว คือ macrophage และ monocyte ส่วน lymphocyte จะพบเพียงเล็กน้อย เมื่อมีการอักเสบติดเชื้อภายในช่องท้อง เซลล์ neutrophil ภายในหลอดเลือดจำนวนมากจะเคลื่อนที่ออกมาในน้ำยา ทำให้พบเซลล์ neutrophil ในน้ำยา PD เพิ่มมากขึ้น และมีสัดส่วนของ neutrophil ที่สูงขึ้น เมื่อมีเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 ตัว/ไมโครลิตร จะเริ่มสังเกตเห็นความขุ่นของน้ำยา และเห็นความขุ่นได้ชัดเจนเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่า 300 ถึง 500 ตัว/ไมโครลิตร เซลล์ที่สามารถทำให้น้ำยาขุ่น ไม่ได้มีเพียง neutrophil เท่านั้น แต่อาจเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ เซลล์ lymphocyte เช่น ที่พบในผู้ป่วยติดเชื้อราและวัณโรคชนิดเรื้อรัง (chronic tuberculous peritonitis) เซลล์ eosinophil เกิดจากปฏิกิริยา chemical reaction ของเยื่อผนังช่องท้องที่แพ้ต่อยาในกลุ่ม calcium channel blocker, amphotericin B หรือ vancomycin ที่บริหารทาง IP หรือจากการ

ติดเชื้อ *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii* และ *Strongyloides stercoralis* เชื้อรา เซลล์มะเร็ง เช่น ที่พบในภาวะมะเร็งรังไข่ระยะแพร่กระจาย นอกจากนี้ ยังมีอีกหลายภาวะที่น้ำยา PD มีความขุ่น แต่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 100 ตัว/ไมโครลิตร ได้แก่ ภาวะที่มีปริมาณไขมัน หรือไฟบรินในน้ำยา PD เพิ่มขึ้น (chylous ascites), การทึบน้ำยา PD ค้างในช่องท้องนานเกินกว่า 8 ชั่วโมง, ภาวะเลือดออกในช่องท้อง และภาวะตับอ่อนอักเสบ และในผู้ป่วยมี peritonitis จริง แต่อาจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 100 ตัว/ไมโครลิตร ได้ในกรณีที่ทำการส่งตรวจในช่วงเริ่มต้นของการ ติดเชื้อ ภายหลังจากได้รับยาปฏิชีวนะไปแล้วช่วงหนึ่ง หรือนับเซลล์จากน้ำยา PD ที่ทึงค้างในช่องท้องน้อยกว่า 2 ชั่วโมง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในกรณีหลังแม้มีเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาณน้อย แต่สัดส่วนปริมาณของ neutrophil ก็ยังคงมากกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นนิยมใช้สัดส่วนของ neutrophil เป็นหลักในการวินิจฉัยภาวะ peritonitis สำหรับผู้ป่วย APD หรือ IPD ควรรีบทำการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดขาวภายใน 3 ถึง 5 ชั่วโมง หลังได้รับตัวอย่างน้ำยา PD เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และลักษณะของเซลล์ และในกรณีที่ไม่สามารถตรวจนับเซลล์ได้หรือไม่มีความพร้อม อาจใช้ Leukocyte esterase reagent strip ซึ่งเป็นแถบสีสำเร็จรูปที่ใช้จุ่มเพื่อทดสอบปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil โดยจะมีการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ leukocyte esterase พบว่ามีความไวและความแม่นยำสูงในการวินิจฉัยภาวะช่องท้องอักเสบ สามารถใช้ประกอบการวินิจฉัยแยกภาวะน้ำยาขุ่นจากสาเหตุอื่นนอกจาก peritonitis ได้ แต่อย่างไรก็ตามอาจพบผลบวกหลงได้จากยาปฏิชีวนะบางประเภทหรือในภาวะตับอ่อนอักเสบ[4, 12, 21]

ค) ตรวจพบเชื้อก่อโรคจากการย้อมสีแกรมหรือการเพาะเชื้อ

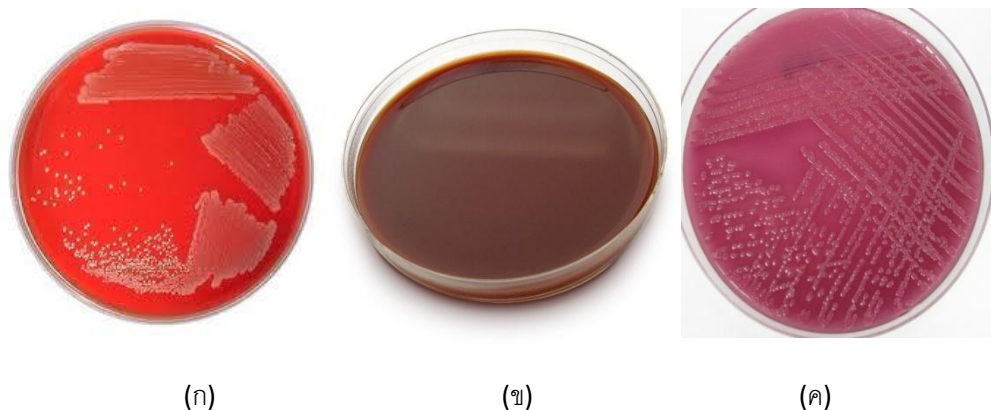
ค.1) การย้อมสีแกรม ช่วยประกอบการตัดสินใจรักษาผู้ป่วยในระยะเบื้องต้น มีความไวในการวินิจฉัยเชื้อร้อยละ 9-40 โดยเฉพาะในกลุ่มเชื้อราหรือแบคทีเรียแกรมลบ แต่อาจพบผลบวกหลงในกรณีของแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากตะกอนสีแกรมหรือจากการปนเปื้อนระหว่างการเก็บตัวอย่างส่งตรวจ ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 5-20[12] (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงผลการย้อมสีแกรมของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ[22]

ค.2) การเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำยา PD ของผู้ป่วย peritonitis โดยทั่วไปสามารถเพาะเชื้อจากตัวอย่างน้ำยา PD ได้ประมาณร้อยละ 70-90 โดยทางคณะกรรมการเฉพาะกิจ ISPD พ.ศ. 2553 ได้แนะนำขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 วิธีร่วมกัน เพื่อเพิ่มความไวในการเพาะตัวอย่างให้ได้มากกว่าร้อยละ 95 คือ 1) Bedside culture โดยการแบ่งน้ำยา PD ปริมาตร 5-10 ml มาเพาะเชื้อในขวด nutrient broth จำนวน 2 ขวด 2) Large volume culture โดยนำน้ำยา PD จากผู้ป่วย peritonitis ปริมาตร 50-100 ml มาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน 3-5 ml มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ และแบ่งไปเพาะเลี้ยงในวุ้นเลี้ยงเชื้อ ออบที่อุณหภูมิ 37°C ในสถาบันที่ไม่สามารถกระทำการปั่นตกตะกอนน้ำยาได้ อาจอนุโลมให้เหลือเพียงการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี bedside culture เท่านั้น แต่ประสิทธิภาพของผลการเพาะเชื้อเป็นบวกอาจลดลงเหลือเพียงร้อยละ 80[12]

- วุ้นเลี้ยงเชื้อ (agar plate หรือ solid media) มีลักษณะเป็นวุ้นแข็งที่บรรจุใน หลอดทดลองหรือ petri dish มีส่วนประกอบเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีประโยชน์ทั้งในแง่ของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ไปและการแยกชนิดของเชื้อ กล่าวคือ differential agar เป็นวุ้นเพาะเลี้ยงที่เมื่อมีแบคทีเรียที่มีจำเพาะกับวุ้นนั้นๆ เจริญเติบโต จะเกิดการเปลี่ยนสีของวุ้นเกิดขึ้น ซึ่งวุ้นชนิดนี้มีให้เลือกใช้มากมาย แต่ที่นิยมมีด้วยกัน 3 แบบคือ 1) Chocolate agar เหมาะสำหรับเพาะเชื้อในกลุ่ม fastidious bacteria 2) Blood agar เหมาะสำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ไป, กลุ่มเชื้อรา รวมถึงสามารถในการใช้วุ้นชนิดนี้แยกเชื้อชนิด streptococci ได้ 3) MacConkey agar เหมาะที่จะเลือกใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน selective agar จะเป็นวุ้นเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อบางจำพวกออกเนื่องจากวุ้นจะมีคุณสมบัติไม่ยอมให้เชื้อบางชนิดเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงของเชื้อบน agar มีข้อดีคือ ตัวเชื้อจะสามารถสร้าง colony และลักษณะของ colony ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถที่จะบอกชนิดของเชื้อได้ สะดวกและง่ายที่นำไปแยกเพาะเลี้ยงเพื่อระบุเชื้อชนิดนั้นๆ ต่อไป[12] (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างของวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ blood agar (ก), chocolate agar (ข) และ MacConkey agar (ค)[23-25]



- liquid media หรือ broth เป็น media ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเป็นของเหลว ประกอบไปด้วยสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตหลายชนิด โดยมีส่วนประกอบเป็นสารสกัดจากเนื้อวุ้นผสมกับ peptones ละลายอยู่ในน้ำเพาะเลี้ยง สามารถนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อได้ทั้งชนิดที่ทนต่อออกซิเจนและไม่ทนต่อออกซิเจน เพียงฉีดตัวอย่างที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในช่วงเพาะเลี้ยง สะดวกและง่ายต่อการใช้งาน สามารถแบ่งชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในน้ำ media ได้ตามความสามารถในการทนต่อการขาดออกซิเจน ดังนี้ 1) Obligate anaerobic bacteria เป็นแบคทีเรียที่จะเจริญเติบโตบริเวณส่วนล่างของ broth เนื่องจากแบคทีเรียจะเสียชีวิตเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน 2) Obligate aerobic bacteria เป็นแบคทีเรียที่จะมีการเจริญเติบโตเฉพาะบริเวณผิวหน้าหรือส่วนบนของ broth เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่จำเป็นต้องพึ่งพาออกซิเจนในการเจริญเติบโต 3) Microaerophiles จะพบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในส่วนบนของ broth แต่ไม่พบบริเวณผิวหน้า broth เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่น้อยกว่าความเข้มข้นในสภาพบรรยากาศปกติ 4) Aerotolerant bacteria เราจะพบการเจริญเติบโตที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้ง broth เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นชนิดที่ไม่พึ่งพาออกซิเจนในการเจริญเติบโต 5) Facultative bacteria จะพบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั่วทั้ง broth โดยเฉพาะบริเวณส่วนบน เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แต่จะสามารถเผาผลาญพลังงานได้ดียิ่งขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน[12]

ค.3) การเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือด แม้ว่าจะได้ตัวอย่างน้ำยา PD ในขณะที่ผู้ป่วยมีอาการ และอาการแสดงการติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างชัดเจน แต่ยังคงพบว่ามีผลการเพาะเลี้ยงในเลือดเป็น บวกต่ำต้งนั้น หากไม่มีอาการหรืออาการแสดงของการติดเชื้อในกระแสเลือด จะไม่แนะนำให้ส่ง ตัวอย่างจากเลือดไปเพาะเลี้ยงเชื้อในผู้ป่วยทุกรายที่มี peritonitis [12]

ค.4) การวิเคราะห์หา endotoxin สาร endotoxin เป็นสารในกลุ่ม lipopolysaccharide พบอยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ o-polysaccharide chain, core polysaccharide และ lipid A ซึ่งสาร endotoxin จะถูกปล่อยออกจากเซลล์แบคทีเรียในขณะที่เซลล์ใกล้เสียชีวิตหรือเสียชีวิตแล้ว เมื่อสาร endotoxin เข้าสู่ร่างกายจะไปจับกับ lipopolysaccharide binding protein d เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถจับได้ดี กับ CD 14 ที่มีอยู่บนผิวเซลล์หลายชนิดในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น neutrophil, macrophage และ enthelial cell ส่งให้เซลล์ดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาตอบสนองของหลังสาร proinflammatory cytokines และ inflammatory mediators หลายชนิด และอาจรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ โดยในปัจจุบันได้มีการ คิดค้นการตรวจสาร endotoxin โดยใช้วิธี limulus ameocyte lysate (LAL) มีหลักการสำคัญคือ สาร endotoxin มีคุณสมบัติที่สามารถทำให้โปรตีนในระบบไหลเวียนเลือดของแมงดาทะเลเกิดการ แข็งตัว สามารถทดสอบได้หลายวิธีทั้ง gel-clot, turbidimetric และ chromogenic technique [12]

2.1.4.2 การส่งตรวจเพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาว กระทำโดยการเก็บตัวอย่างน้ำยา PD ซึ่งควรค้างอยู่ในช่องท้องอย่างน้อย 2 ชั่วโมง และหากในกรณีที่ไม่มีน้ำยา PD ค้างอยู่ในช่องท้องผู้ป่วย ให้ทำการใส่น้ำยา PD เข้าไปใหม่ปริมาตร 1 ลิตร ปล่อยให้ค้างอยู่ในช่องท้องอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมง จึงจะทำการถ่ายน้ำยาเพื่อส่งตรวจต่อไป[12]

2.1.4.3 การให้คำนิยามของการติดเชื้อในช่องท้อง ซึ่งทางคณะกรรมการเฉพาะกิจ ISPD พ.ศ. 2553 [4, 12, 26] ได้ให้คำนิยามและแบ่งประเภทของการติดเชื้อได้ดังต่อไปนี้

ก) Recurrent peritonitis คือ หลังจากสิ้นสุดจากการรักษาการติดเชื้อครั้งก่อน เกิดการติดเชื้อซ้ำอีกครั้งภายใน 4 สัปดาห์โดยที่เชื้อก่อโรคเป็นเชื้อตัวใหม่

ข) Relapsing peritonitis คือ หลังจากสิ้นสุดจากการรักษาการติดเชื้อในครั้งก่อน เกิดการติดเชื้อซ้ำอีกครั้งภายใน 4 สัปดาห์ โดยที่เชื้อก่อโรคงยังคงเป็นเชื้อตัวเดิมหรือไม่ทราบผลการเพาะเชื้อ

ค) Repeat peritonitis คือ หลังจากสิ้นสุดการรักษาการติดเชื้อในครั้งก่อนมากกว่า 4 สัปดาห์ ผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อตัวเดิม

ง) Refractory peritonitis เป็นการติดเชื้อในช่องท้องที่ยังคงมีอาการทางคลินิก ตรวจพบเม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 เซลล์/ไมโครลิตรและเป็นชนิด neutrophil มากกว่าร้อยละ 50 หรือสามารถเพาะเชื้อขึ้นจากน้ำยา PD แต่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาแม้ว่าจะได้รับยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมมากกว่า 5 วัน

จ) Catheter-related peritonitis เป็นการติดเชื้อในช่องท้องที่เกิดร่วมกันกับ tunnel infection และ/หรือ ESI โดยเชื้อก่อโรคนั้นต้องเป็นเชื้อที่เพาะไม่ขึ้นจากตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งหรือจากเชื้อตัวเดียวกัน

ฉ) Peritonitis-related death ผู้ป่วยเกิดการเสียชีวิตในขณะที่เกิดภาวะ peritonitis หรือภายในสองสัปดาห์ หลังเกิดภาวะ peritonitis หรือในขณะที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยภาวะ peritonitis

2.1.4.4 การวินิจฉัยแยกโรค ผู้ป่วย peritonitis ส่วนใหญ่จะมาพบแพทย์ด้วยน้ำยาชุ่นร่วมกับอาการปวดท้อง แต่มีในบางกรณีที่ไม่มีน้ำยาชุ่นแต่ยังคงมีอาการปวดท้อง ยกตัวอย่างเช่น นิ้วในทางเดินปัสสาวะ ท้องผูก แผลในกระเพาะอาหาร ตับอ่อนอักเสบ ลำไส้ทะลุเป็นต้น หรือแม้แต่น้ำยาชุ่นแต่ไม่ใช่ภาวะ infective peritonitis เนื่องจากสาเหตุอื่นได้แก่ การอักเสบของเยื่อช่องท้องจากสารเคมี การตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil มากกว่าร้อยละ 10 การตกเลือดในช่องท้อง การที่เยื่อผนังช่องท้องพบเซลล์มะเร็งกระจายอยู่ทั่วไป ในน้ำยา PD มีน้ำเหลืองปนเปื้อนและการเก็บตัวอย่างน้ำยา PD ในขณะที่ช่องท้องแห้ง

2.1.5 ภาวะแทรกซ้อน

ภาวะแทรกซ้อนที่สามารถพบได้ในผู้ป่วย peritonitis ได้แก่

2.1.5.1 ก้อนหนอง (Abscess formation) การตรวจพบก้อนหนองมักสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด *S. aureus* และเชื้อรา ซึ่งสามารถยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยด้วยการเอกซเรย์คอมพิวเตอร์และการตรวจอัลตราซาวด์ สามารถรักษาได้โดยการเจาะดูดหรือผ่าตัดเพื่อระบายก้อนหนองออก ภาวะแทรกซ้อนลักษณะนี้มักจะพบได้ไม่บ่อย เฉลี่ยประมาณร้อยละ 1

2.1.5.2 ความล้มเหลวทางเทคนิค (technical failure) เป็นที่น่าสังเกตว่า ถึงแม้จะมีการปรับเปลี่ยนเทคนิคมาใช้ระบบ “flush before fill” แต่กลับไม่ช่วยให้การเกิดการล้มเหลวทางเทคนิคดีขึ้น และพบในผู้ป่วย peritonitis ประมาณร้อยละ 15-20

2.1.5.3 การเกิดพังผืดในช่องท้องอย่างรุนแรง (encapsulating peritoneal sclerosis: EPS) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง ผู้ป่วย peritonitis ส่วนใหญ่มักมาพบแพทย์ด้วยอาการลำไส้อุดตันและถึงแม้ว่าผู้ป่วยได้หยุดทำ PD ไประยะเวลาหนึ่งแล้วก็ตามก็สามารถพบการเกิดพังผืดในช่องท้องได้ พบภาวะแทรกซ้อนนี้ได้ไม่บ่อยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 1-2 ของผู้ป่วย peritonitis

2.1.5.4 การเสียชีวิต อุบัติการณ์เสียชีวิตของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันออกไป เนื่องจากมีการให้ค่านิยามที่แตกต่างกัน พบว่ามีการระบุสาเหตุการเสียชีวิตที่เกิดจาก peritonitis โดยตรงเพียงร้อยละ 26 เท่านั้น ส่วนสาเหตุอื่นๆ มีการระบุว่าเป็นโรคหัวใจ เหตุผลทางสังคม เป็นต้น

2.1.5.5 ภาวะ UF failure การเกิด peritonitis เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ช่วยเร่งให้เกิดภาวะ high transporter และอาจทำให้ผู้ป่วย peritonitis เสี่ยงต่อการเสียชีวิตเพิ่มขึ้น

2.1.5.6 ภาวะ cardiovascular morbidity การติดเชื้อในกระแสเลือด ไม่เพียงแต่จะส่งผลเสียต่อการทำงานของหัวใจและหลอดเลือดในระยะเฉียบพลันเท่านั้น แต่อาจส่งผลต่อการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือดในระยะยาว ได้ถึง 5 ปี[12]

2.1.6 การป้องกันการติดเชื้อในช่องท้อง

การป้องกันการติดเชื้อในช่องท้อง เป็นสิ่งที่สำคัญและควรให้ผู้ป่วยทุกรายตระหนักถึงความสำคัญ รวมถึงการค้นหาสาเหตุการติดเชื้อ เพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยในการแก้ไขข้อบกพร่องไม่ให้เกิดการกลับซ้ำของการติดเชื้อได้อีก โดยทางคณะกรรมการเฉพาะกิจ ISPD พ.ศ. 2553[4] ได้แนะนำแนวทางปฏิบัติเบื้องต้นเพื่อป้องกันการเกิด peritonitis ดังนี้

2.1.6.1 touch contamination มีส่วนช่วยในการป้องกันการติดเชื้อที่เกิดขณะทำการเปลี่ยนถ้าน้ำยา PD โดยการเน้นย้ำผู้ป่วยและญาติปฏิบัติตามแนวปฏิบัติการรักษาอย่างเคร่งครัด ทำการฝึกอบรมซ้ำเมื่อผู้ป่วยเกิด peritonitis หรือเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษาความสะอาดและการล้างมือที่ถูกต้อง รวมถึงหากเกิดเหตุการณ์การรั่ว ซึม ฉีกขาดของสายหรือข้อ

ต่อ ผู้ป่วยและผู้ดูแลต้องทราบถึงการจัดการในเบื้องต้น ก่อนที่จะมาพบแพทย์ที่โรงพยาบาล และเลือกใช้น้ำยาระบบ “flush before fill”

2.1.6.2 catheter-related route พบว่าการติดเชื้อช่องทางนี้ส่วนใหญ่มักมีความสัมพันธ์กับ tunnel infection และ ESI เราสามารถป้องกันการติดเชื้อจากสาเหตุนี้ได้โดย การเลือกใช้สาย Tenckhoff catheter แบบมาตรฐานที่มี 2 cuffs ไม่เย็บปากแผล และวางให้แนวของสายชี้ลงหรือขนานกับลำตัวในขั้นตอนการผ่าตัดวางสาย, ระวังไม่ให้แผลเปียกน้ำจางกว่าแผลจะหายสนิท และทำความสะอาดแผลของสายทางออกทุกวัน[12]

2.2 Bacterial Taxonomy

เชื้อแบคทีเรีย (Bacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในสิ่งแวดล้อม ที่อาจอาศัยเป็นอิสระหรือดำรงชีวิตเป็นปรสิตอยู่กับเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มีการค้นพบเป็นครั้งแรก โดย Anton van Leeuwenhoek (ค.ศ. 1632-1723) นักจุลทรรศน์ศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์[27]

ในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันมีอยู่หลายระบบและยังไม่เป็นที่แน่นอน โดยโดเมนจัดเป็นหน่วยใหญ่ที่สุดในการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 โดเมนหลักๆ คือ โดเมนยูคารียา (eukarya), แบคทีเรีย (bacteria), และอาร์คี (archae) ซึ่งโดเมนยูคารียาเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ประกอบด้วยเซลล์ชนิดยูคาริโอต (eukaryote) หลายเซลล์อาศัยอยู่ร่วมกัน แบ่งย่อยออกเป็นอาณาจักรสัตว์ อาณาจักรพืช อาณาจักรรา และอาณาจักรโพรติสตา[27]

ส่วนสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโดเมนแบคทีเรียและอาร์คี เป็นสิ่งมีชีวิตที่ประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวชนิดโพรคาริโอต โดยในโดเมนแบคทีเรียจะประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิด true bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมหมายรวมถึงแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคน และแบคทีเรียอีกชนิดคือ แบคทีเรียกลุ่ม cyanobacteria ส่วนโดเมนอาร์คี เป็นกลุ่มแบคทีเรียชนิดดึกดำบรรพ์ที่เรียกว่า archaeobacteria พบได้ไม่แพร่หลายนัก เป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานสูง สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิ ความเป็นกรด หรือความเป็นเกลือสูงมากได้[27]

2.2.1 การจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial classification)

ในการจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรียอาศัยคุณสมบัติหลายประการ โดยทั่วไปมักจัดกลุ่มแยกย่อยตามคุณสมบัติทางชีวภาพและคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่เรียกว่า สปีชีส์ และในบางครั้งในกลุ่มสปีชีส์

เดียวกันอาจมีการแบ่งย่อยออกเป็นสปีชีส์ย่อยหรือ subspecies ตามคุณสมบัติเฉพาะบางประการของเซลล์ชนิดนั้นๆ ยกตัวอย่างเช่น คุณสมบัติทางชีวภาพที่จำเพาะบางประการที่เรียกว่า biogroup หรือแบ่งตามคุณสมบัติโครงสร้างแอนติเจนที่มีความจำเพาะ ที่เรียกว่า serogroup[27]

2.2.2 การเรียกชื่อเชื้อแบคทีเรีย

การเรียกชื่อแบคทีเรียเป็นหลักการสากลที่มีการกำหนดขึ้นโดยคณะกรรมการสากล มีการเรียกชื่อตามรากศัพท์ภาษาละตินหรือกรีก ใช้ตัวสะกดเป็นภาษาอังกฤษ ลงท้ายชื่อแฟมิลีย์ด้วยคำว่า -aceae และเขียนด้วยอักษรตัวตรง เขียนอักษรตัวแรกของชื่อแฟมิลีย์และจีนัสด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ แต่เขียนขึ้นต้นชื่อสปีชีส์ด้วยตัวพิมพ์เล็ก โดยในการเรียกชื่อสปีชีส์ จะอาศัยระบบที่เรียกว่า binomial system ประกอบด้วยสองส่วนคือ ส่วนแรกจะเป็นชื่อจีนัส ส่วนที่สองจะเป็นชื่อสปีชีส์ เขียนด้วยตัวเอนทั้งสองส่วนหรือตัวตรงพร้อมขีดเส้นใต้ทั้งสองส่วนแยกออกจากกัน นอกจากนี้สามารถเขียนชื่อจีนัสในรูปแบบย่อได้โดยเขียนอักษรตัวแรกด้วยตัวพิมพ์ใหญ่เอนหรือขีดเส้นใต้แล้วตามด้วยมหัพภาค ตัวอย่างเช่น *S. aureus*[27]

2.2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

สามารถจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียออกได้ 2 ระบบใหญ่ๆ คือ

2.2.3.1 การจำแนกเชื้อตามลักษณะที่ตรวจพบได้

การจำแนกเชื้อตามลักษณะที่ตรวจพบได้ หมายถึงการตรวจตามลักษณะหรือคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเห็นหรือทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการและยังอาจสามารถใช้จำแนกเชื้อออกเป็นกลุ่มย่อยที่เรียกว่า subtyping โดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติจำเพาะบางประการ อาทิ การจำแนกตามคุณสมบัติทางชีวภาพที่เรียกว่า biotyping การจำแนกตามคุณสมบัติของโครงสร้างแอนติเจนที่เรียกว่า serotyping และการจำแนกตามความไวต่อการติดเชื้อไวรัสที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย ที่เรียกว่า bacteriophage typing แต่ในบางครั้งอาจต้องอาศัยการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม เช่นการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมหรือการทดสอบหลายวิธีร่วมกัน โดยหลักการจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะที่ตรวจพบได้ที่สำคัญ ได้แก่

ก) ลักษณะทางจุลภาค (microscopic characteristic)

- การติดสีแกรม ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งเซลล์แบคทีเรียได้เป็นสองกลุ่ม คือ แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยอาศัยความแตกต่างทางโครงสร้างของผนังเซลล์ทั้งสองชนิด มีขั้นตอนโดยสังเขปคือ การตรึงเชื้อบนแผ่นสไลด์แก้ว ย้อมด้วยสี crystal violet ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน และย้อมตามด้วยสี gram iodine ซึ่งช่วยในการคงสี crystal violet ไว้ภายในเซลล์ จากนั้นทำการล้างสีออกด้วยแอกอฮอลล์และตามด้วยการย้อมสี safranin ซึ่งมีสีแดง โดยแบคทีเรียแกรมบวกสามารถกักสีของ crystal violet ไว้ภายในเซลล์ได้โดยไม่ถูกชะล้างออกในขั้นตอนการล้างสี ในทางตรงข้ามที่แบคทีเรียแกรมลบจะไม่สามารถกักสีของ crystal violet ไว้ได้ ทำให้เซลล์ติดสีแดงของ safranin

- ขนาดและรูปร่างของเซลล์ เราสามารถแบ่งชนิดของเซลล์ได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามลักษณะขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละชนิด คือ เซลล์ที่มีรูปร่างกลม (coccus) เซลล์รูปแท่ง (rod) และเซลล์รูปเกลียว (spiral) แต่ก็ยังมีเชื้อบางชนิดที่มีรูปร่างไม่แน่นอน หรือเรียกอีกอย่างว่า pleomorphic

- การเรียงตัวของเซลล์ โดยทั่วไปมักพบเซลล์แบคทีเรียอยู่กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว แต่อาจพบการจับตัวกันเป็นสาย เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มก็ได้

ข) ลักษณะทางมหภาค (macroscopic characteristic) ลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเพาะเชื้อชนิดวันแข็ง สามารถนำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้ ยกตัวอย่างเช่น ความหนูน รูปร่างขอบ ผิวหน้า เนื้อและสีโคโลนี การสร้างเม็ดสี ความสามารถของเชื้อในการสลายเม็ดเลือดแดงบริเวณรอบโคโลนีที่เจริญบนวันเพาะเชื้อที่ผสมเม็ดเลือดแดง รวมถึงความสามารถสร้างก๊าซหรือสารหลั่งออกมาภายนอก

ค) คุณสมบัติทางชีวภาพ เราสามารถใช้คุณสมบัตินี้ที่แตกต่างกันออกไปในเชื้อแต่ละชนิดมาแบ่งแยกชนิดของเชื้อ ไม่ว่าจะเป็นลักษณะทางสรีรวิทยาและการสร้างสารต่างๆ จากกระบวนการเมตาบอลิซึม ได้แก่ ความต้องการของก๊าซออกซิเจน ความต้องการที่แตกต่างกันของเชื้อแต่ละชนิดสามารถแบ่งเชื้อได้ 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่เจริญได้เฉพาะบรรยากาศที่มีออกซิเจน (aerobe) กลุ่มที่เจริญได้ทั้งบรรยากาศที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน (facultative anaerobe) กลุ่มที่เจริญได้ดีเฉพาะในบรรยากาศที่มีระดับออกซิเจนที่ต่ำ ประมาณ 5-10% (microaerophile) และกลุ่มที่สามารถเจริญได้เฉพาะบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) อุณหภูมิ ความแตกต่างของช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตสามารถนำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้คือ เชื้อที่สามารถ

เจริญเติบโตได้ดีในช่วง 30-37°C (mesophile) เชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีช่วงอุณหภูมิ 50-60°C (thermophile) และเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีช่วงอุณหภูมิ 15-20°C (psychrophile) สภาพแวดล้อม เชื้อต่างชนิดกันจะสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป บางชนิดต้องการความเป็นกรดต่างสูง บางชนิดต้องการสภาพแวดล้อมที่มีแรงดันออกซิเจนสูง เป็นต้น นอกจากนี้ที่กล่าวมาข้างต้น อาจจะมีจำแนกได้จาก ความสามารถในการเคลื่อนที่ อัตราการเจริญเติบโต ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ การต้องการอาหารในการเจริญเติบโตที่มีความจำเพาะกับเชื้อชนิดนั้นๆ

ง) คุณสมบัติทางชีวเคมี เราสามารถจำแนกชนิดของเชื้อ โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ยกตัวอย่างเช่น คุณสมบัติพื้นฐานของเชื้อแต่ละชนิดในการทำปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีต่อการวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ หมายรวมถึงผลผลิตต่างๆ จากกระบวนการเมตาบอลิซึม

จ) คุณสมบัติทางซีโรโลยี โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อ โดยการสร้างแอนติบอดี และการตรวจแอนติเจนจำเพาะของเชื้อนั้นๆ

ฉ) แบบแผนความไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรีย มีประโยชน์ทั้งในแง่ของการจำแนกชนิดของเชื้อ การเลือกยาที่เหมาะสมในการรักษา และการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา

ช) โครงสร้างหรือส่วนประกอบของเซลล์ เชื้อที่ต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกันออกไปทั้งในส่วนขององค์ประกอบของผนังเซลล์และส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์[27]

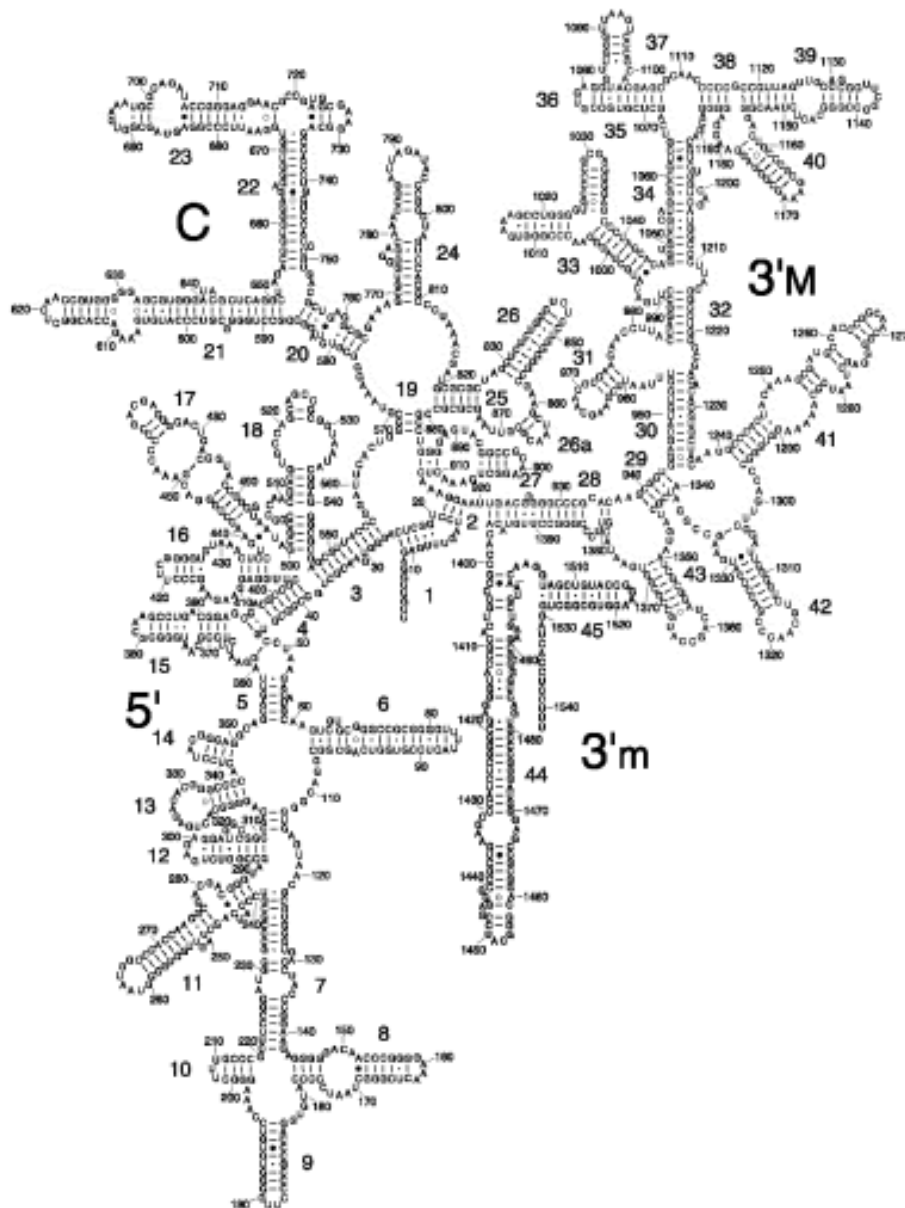
2.2.3.2 การจำแนกเชื้อตามโครงสร้างพันธุกรรม

การจำแนกเชื้อโดยอาศัยเทคนิคระดับโมเลกุลสามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้ โดยเฉพาะการวินิจฉัยชนิดของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ยากหรือไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ด้วยการทดสอบอื่นที่ทำโดยทั่วไป หรืออาจต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อ อาทิเช่น การวิเคราะห์อัตราส่วนของกรดนิวคลีอิกชนิด guanine และ cytosine, การวิเคราะห์ลำดับของกรดนิวคลีอิกชนิด DNA เป็นต้น นอกจากนี้ การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อยังมีบทบาทในการสืบสวนทางระบาดวิทยา การเปรียบเทียบความแตกต่างหรือความสัมพันธ์ของโครงสร้างพันธุกรรมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย สามารถช่วยในการสืบหาแหล่งที่มาของเชื้อโรคและวางแผน ควบคุม ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้อีกด้วย[27]

2.3 การวิเคราะห์ 16S rDNA

ไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มประกอบด้วย rRNA และโปรตีน ในโพรคาริโอตเซลล์มีไรโบโซมขนาด 70S ประกอบด้วย small subunit ขนาด 30S และ large subunit ขนาด 50S large subunit ประกอบด้วย rRNA ขนาด 5S มีนิวคลีโอไทด์ 120 คู่เบส และขนาด 23S มีนิวคลีโอไทด์ 2,900 คู่เบส ส่วน small subunit ประกอบด้วย rRNA ขนาด 16S มีนิวคลีโอไทด์ 1542 คู่เบส[28] ในส่วนของ Ribosomal DNA (rDNA) จะเป็น DNA sequence ที่ code สำหรับ ribosomal RNA ซึ่งไรโบโซมมีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรตีนและ rRNA จะเป็นส่วนที่จะมีการแปลรหัส mRNA ไปสร้างโปรตีน

16S ribosomal DNA (rDNA) genes จะประกอบด้วย “hypervariable regions” (V1–V9) 9 region โดยได้มีการใช้ในการศึกษาแยก species ของแบคทีเรียและการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน[6, 29-36] โดยได้มีการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ครั้งแรกในปี 1972 ใน *E.coli* สาเหตุที่เราใช้ 16S rDNA ในการศึกษาเพราะเชื่อว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ที่สามารถแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการและแบคทีเรียในแต่ละสปีชีส์มีลักษณะที่เฉพาะตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยประกอบด้วยทั้งในส่วนของ variable region และ conserve region[9, 28, 37-39] (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ 16S rRNA[40]

ประโยชน์ของการประยุกต์ใช้ 16S rDNA sequencing ในการวิจัยคือ 1) เพื่อสืบค้นเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตช้า เช่นในกลุ่ม mycobacteria ที่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ 6-8 สัปดาห์ 2) เพื่อสืบค้นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultivable bacteria) หรือเพาะไม่ขึ้นเนื่องจากมีข้อจำกัด และกลุ่มที่ให้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นลบ ยกตัวอย่างเช่นในกลุ่มของ endocarditis โดยที่ 1 ใน 3 ของการอักเสบของ endocarditis จะให้ผลการเพาะเชื้อเป็นลบ ซึ่งรวมทั้ง meningitis, brain abscess, keratitis, urinary tract infections, empyema, septic arthritis และ septicaemia[41]

2.4 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ ที่เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ หรือที่เรียกว่า DNA Replication ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้เป็นล้านเท่า โดยเทคนิคนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นในปี 1985 โดย Kary B. Mullis และคณะแห่ง Cetus Corporation สหรัฐอเมริกา และจากเทคนิคนี้เองส่งผลให้ได้รับรางวัลโนเบลในปี 2537[42]

2.4.1 หลักการทำงานของเทคนิค PCR

PCR เป็นเทคนิคที่มีหลักการพื้นฐานในการจำลองสายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น หรือที่เรียกว่า primer จำนวน 1 คู่ ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase โดย primer ประกอบไปด้วย nucleotide ประมาณ 17-24 คู่เบส ดำเนินปฏิกิริยาหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนสำคัญคือ

2.4.1.1 denaturation เป็นกระบวนการที่มีการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยว โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ที่ประมาณ 92-95°C

2.4.1.2 annealing เป็นขั้นตอนที่มีการจับคู่กันระหว่าง primer กับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเข้าคู่กัน มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 50-60°C

2.4.1.3 extension จะเป็นขั้นตอนที่มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น โดยจะมีการสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของ primer โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 72-75°C[42]

2.4.2 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR

การตรวจหา PCR product สามารถแบ่งออกเป็น 2 เทคนิคใหญ่ๆ คือ

2.4.2.1 Gel Electrophoresis

gel electrophoresis เป็นขั้นตอนที่มีการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปตรวจวัดผลที่ได้ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตดูการเรืองแสงที่เกิดขึ้น

2.4.2.2 Nucleic Acid Hybridization

ในกรณีที่ได้ผลจาก gel electrophoresis ไม่ชัดเจนหรือต้องการยืนยันผลซ้ำเพื่อเพิ่มความมั่นใจ สามารถนำ PCR product มาทำ nucleic acid hybridization ได้ โดยการใช้ตัวติดตามที่มีเบสคู่สมกับ PCR product ทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม โดยที่ตัวติดตามอาจเป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ มีขั้นตอนการติดตาม PCR product คือ

ก) การติดฉลาก

ก.1) การติดฉลากด้วยสารรังสี

- การติดฉลากที่ปลาย 5' โดยการอาศัยคุณสมบัติที่ปลาย oligonucleotide สังเคราะห์มีปลาย 5' เป็น OH group จึงใช้ เอนไซม์ T4 Polynucleotide kinase เติม γ -³²P-ATP ที่ติดสารรังสีเข้าไปที่ 5'-OH group ของสาย oligonucleotide ได้ทันที

- การติดฉลากที่ปลาย 3' โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) หากต้องการเติมนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารรังสีเข้าไปที่ปลาย 3' เพียงตัวเดียว นิยมใช้ γ -³²P dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP) แทน γ -³²P-dNTP แต่หาก

ต้องการเติม polymer ของนิวคลีโอไทล์เข้าที่ปลาย 3' ก็สามารถใส่ γ - 32 P-dNTP ได้ อย่างไรก็ตาม ความยาวของ homopolymer จะขึ้นกับปริมาณของ dNTP เป็นตัวกำหนด

ก.2) การติดฉลากด้วยสารปลดรังสี มีข้อดีที่ปลอดภัย สามารถเก็บรักษาได้นานกว่า สามารถกระทำได้สะดวกและรวดเร็วเช่นเดียวกันกับสารติดรังสี สารที่นิยมใช้ได้แก่ biotin, digoxigenin, fluorescein, alkaline phosphate, horseradish peroxidase เป็นต้น

ข) การทำ DNA ที่ติดฉลากให้บริสุทธิ์ สามารถทำได้สองวิธีคือ การตกตะกอนด้วย ethanol โดยการเติม 3M sodium acetate 1/10 ของปริมาตรสารละลายและ absolute ethanol ในปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและเก็บที่ -70°C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที วิธีนี้มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้แยก DNA ที่ติดฉลากเป็น oligonucleotide เนื่องจาก DNA สายสั้นๆ มักตกตะกอนไม่สมบูรณ์ ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี วิธีนี้ทำให้ได้ผลผลิตทั้ง DNA, RNA และ oligonucleotide สามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินออกจาก DNA ที่ติดฉลากไปแล้ว

ค) การทำ hybridization คือ การกำหนดสถานะให้ตัวติดตามที่ติดฉลากแล้ว สามารถเข้าจับเบสคู่สมกับ DNA เป้าหมาย โดยทั้งคู่จะถูกทำให้อยู่ในสภาพสายเดี่ยวมาก่อนที่จะตรวจสอบ มักนิยมให้ DNA เป้าหมายถูกตรึงอยู่บนกระดาษกรองพิเศษหรือ membrane filter ซึ่งมีคุณสมบัติจับ DNA สายเดี่ยวได้ดี ส่วน DNA ตัวติดตามจะอยู่ในสารละลาย แต่อาจกระทำในสถานะที่อยู่ในสารละลายทั้งคู่หรือ membrane filter โดยตรงก็ได้

ง) การตรวจจับหาตัวติดตาม

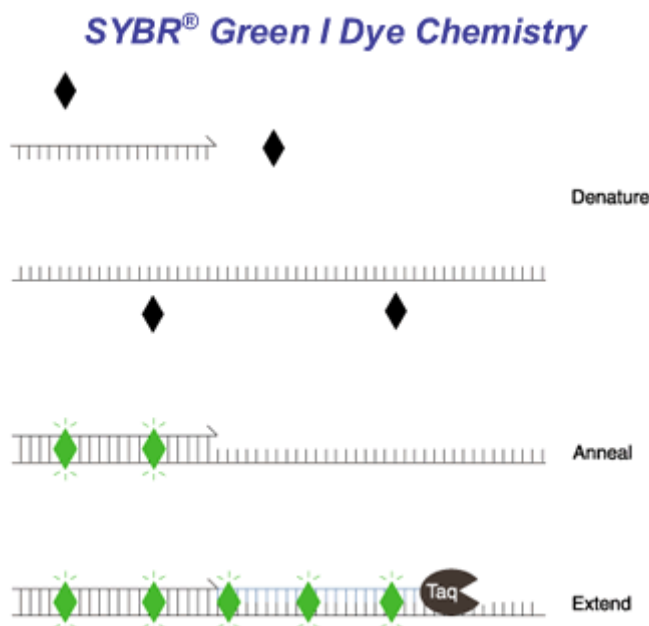
- การตรวจจับสารรังสี โดยการประกบกระดาษกรองกับแผ่นฟิล์มเอกเรย์ เก็บไว้ที่ -70°C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จึงนำไปล้างและดูผลจุดสีดำที่ปรากฏ

- การตรวจจับสารปลดรังสี เป็นการตรวจหาสีหรือตรวจหาแสง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารปลดรังสีที่ใช้[43]

2.5 Real-Time PCR

real-time PCR หรือ quantitative PCR เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีการพัฒนาจาก conventional PCR ที่สามารถตรวจจับและวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นในระหว่างเกิดปฏิกิริยา[44-48] ซึ่งแตกต่างจาก convention PCR ที่จะสามารถตรวจสอบขนาดและปริมาณของ PCR product ที่เกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเท่านั้น การที่เราสามารถตรวจวัด PCR product ของ real-time PCR ได้โดยการทำให้ PCR product ติดฉลากกับสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ประกอบด้วยวิธีดังต่อไปนี้

2.5.1 การใช้สีที่สามารถแทรกจับกับโครงสร้างทางพันธุกรรม โดยการใช้สารเรืองแสงไปจับกับ minor groove ของ DNA สายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะเกิดการคายพลังงานออกมา ที่สามารถตรวจจับได้ด้วยเครื่อง real-time thermocycler ที่มีตัวรับสัญญาณแสงโดยเฉพาะ ตัวอย่างสีที่ใช้ในการแทรกจับกับโครงสร้างพันธุกรรม ได้แก่ SYBR Green I dye โดยจะมีการไปแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ในขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ เกิดการเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อรอบของ PCR มาถึงช่วง denature อีกครั้ง SYBR Green I dye ก็จะถูกหลุดออก โดยโมเลกุลสารเรืองแสงจะจับได้มากน้อยขึ้นขึ้นกับความยาวของ PCR product ที่สังเคราะห์ได้ ถึงแม้ว่าการใช้ SYBR Green I dye จับกับ DNA สายคู่จะเป็นแบบไม่จำเพาะ แต่วิธีนี้มีข้อดีที่เราสามารถค่า T_m ในการแยก primer-dimer และ non-specific product อื่นๆ ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอแต่ละสาย และแปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ การทำงานของ SYBR Green I dye (รูปที่ 5)

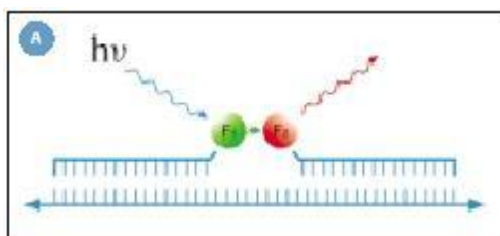


รูปที่ 5 แสดงการทำงานของ SYBR Green I dye[49]

2.5.2 การใช้ probes ติดฉลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) จะนำมาใช้ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูง ยกตัวอย่างเช่น ในการบ่งชี้ single nucleotide mutations โดยจะเป็นการนำ fluorochrome 2 ประเภทติดฉลาก เข้ากับสายของ specific probe เรียกว่า quencher และ reporter dye เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง พลังงานสูง quencher จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้กับ reporter dye โดยไม่มีการสูญเสียพลังงานออกสู่ภายนอก ต่อจากนั้น reporter molecule จะปลดปล่อยพลังงานออกมาสู่ ระบบภายนอกในรูปของแสงที่เราสามารถตรวจวัดได้ การติดฉลาก fluorochrome เข้ากับ probe สามารถทำได้หลายลักษณะ ได้แก่

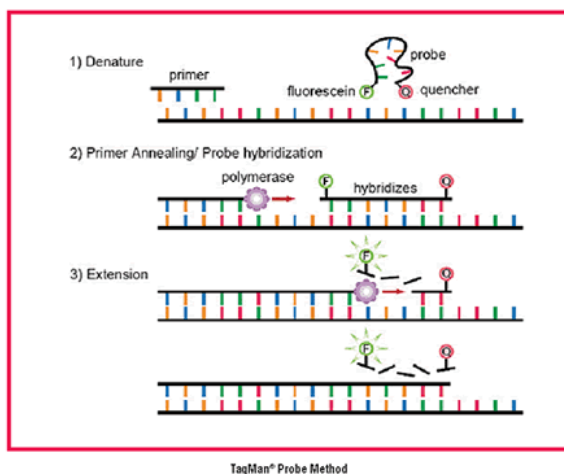
2.5.2.1 Hybridization probe โดยการนำ oligonucleotide probe สายสั้นสองสาย สายแรกติด ฉลากที่ปลายข้าง 3' ด้วย Fluorescein ทำหน้าที่เป็น quencher และสายที่สองติดฉลากด้วย Red 640 หรือ Red 705 ที่ปลาย 5' โดยที่ปลาย 3' ของ oligonucleotide probe สายที่สองจะถูกปิด ด้วย phosphate group เพื่อไม่ให้สามารถทำหน้าที่เป็น primer ได้ ทั้งนี้ probe ทั้งสองเส้นจะมี ลำดับเบสต่อเนื่องกันโดยเว้นช่วงระหว่าง ปลาย 3' ของ oligonucleotide probe เส้นแรก กับ ปลาย 5' ของ probe อีกเส้นหนึ่งประมาณ 1-5 bp เมื่อเกิดการ hybridization ระหว่าง Probe ทั้ง

สองกับดีเอ็นเอเป้าหมายจะเกิด FRET สามารถวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ในทุกช่วงของขั้นตอนการ annealing ในกระบวนการ PCR นอกจากนี้ hybridization probe สามารถนำมาตรวจสอบ amplified product เพื่อบ่งชี้ single point mutation หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งไม่สามารถทำได้ใน SYBR Green I dye โดยเมื่อ probe ที่จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายมีบางตำแหน่งไม่คู่สมกัน (mismatch) จะหลุดตัวออกมาก่อนในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ในขณะที่หากจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่คู่สมกัน probe จะหลุดตัวออกมาในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า (รูปที่ 6)



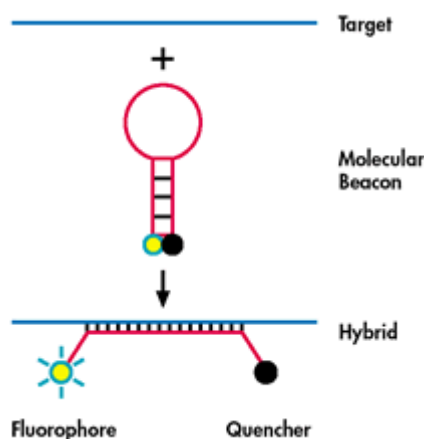
รูปที่ 6 แสดงการทำงานของ Hybridization probe[49]

2.5.2.2 Hydrolysis Probe หรือเรียกอีกอย่างว่า Taqman probe วิธีการนี้จะเป็นการใช้ oligonucleotide เพียงเส้นเดียว โดยที่ปลาย 5' จะติดฉลาก reporter dye และภายในสายห่างจาก reporter dye ไม่เกิน 5bp จะติดฉลากด้วย quencher dye เมื่อ reporter dye ถูก excite จะเกิดการถ่ายทอดพลังงานไปให้ quencher dye ซึ่งจะดูดซับพลังงานนั้นไว้แล้วคายพลังงานออกมาในรูปของแสงที่มีความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น เมื่อกระบวนการ PCR เข้าสู่ช่วงการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ 5' exonuclease activity ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase จะทำการย่อย Taqman probe ทำให้ reporter dye หลุดเป็นอิสระ ทำให้สามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสง (รูปที่ 7)



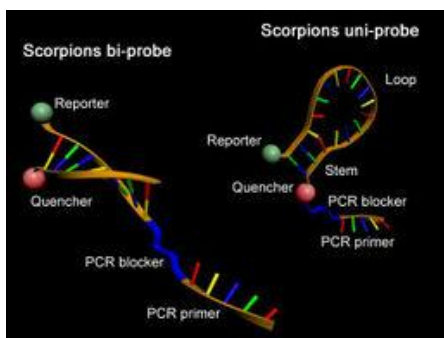
รูปที่ 7 แสดงการทำงานของ Taqman Probe[49]

2.5.2.3 Molecular Beacons เป็น oligonucleotide probe ที่มีลักษณะโค้งงอเป็น loop คล้ายกับ โดยมีส่วนที่ยึดติดกันด้วยพันธะ hydrogen bond ประมาณ 5-7 nucleotides ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับเบสเป็น G-C rich ทำให้ปลาย 5' และ 3' ที่ติดฉลากด้วย reporter และ quencher dyes เข้ามาอยู่ใกล้กันจน quencher dye สามารถดูดซับพลังงานจาก reporter dye ได้ บริเวณ loop ประมาณ 5-30 nucleotides จะถูกสร้างให้มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการตรวจหา เมื่อ molecular beacon เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย hairpin structure จะถูกสลายไป ทำให้ reporter dye ที่ 5' อยู่ห่างจาก quencher dye ที่ 3' end สามารถเปล่งแสงได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง (ในรูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงการทำงานของ molecular beacons[49]

2.5.2.4 Scorpion probes เป็น hairpin loop ที่เชื่อมกับปลาย 5' ของ primer ที่สามารถจับกับเบสคู่สมบนโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายได้ หลังจากเกิดปฏิกิริยา extension แล้ว ซึ่งทำให้โมเลกุล hairpin loop ของ probe ถูกเปิดออก ซึ่งจะทำให้มีการปลดปล่อยพลังงานในรูปของฟลูออเรสเซนส์ได้ (รูปที่ 9)[49]



รูปที่ 9 แสดงการทำงานของ Scorpion probes[49]



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยแบบ diagnostic test เป็นการตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี PCR เพื่อวิเคราะห์ความไวความจำเพาะในการวินิจฉัยภาวะ peritonitis ของผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง ซึ่งการศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้วก่อนที่จะเริ่มการศึกษานี้

3.2 ประชากร (Population)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาจากกลุ่มผู้ป่วยที่มีการล้างไตทางช่องท้องที่มีการติดเชื้อในช่องท้องในโรงพยาบาลบ้านแพ้ว (สาขาพร้อมมิตร) โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลพิจิตร และโรงพยาบาลพระพุทธบาท โดยมีข้อกำหนดดังนี้

3.2.1 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

3.2.1.1 ผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อในช่องท้อง ตามหลักเกณฑ์ของ ISPD พ.ศ. 2553[4] โดยน้ำยา PD ที่ปล่อยออกมาจากช่องท้องมีความขุ่น ตรวจพบเม็ดเลือดขาว 100 cell/mm^3 และในจำนวนนี้เป็น polymorphonuclear neutrophils (PMN) มากกว่าร้อยละ 50

3.2.1.2 ทราบผลเพาะเชื้อเป็นแบคทีเรียและตัวอย่างน้ำยา PD ที่เก็บจากผู้ป่วย ต้องมีการจัดเก็บตัวอย่างก่อนที่จะให้การรักษายาปฏิชีวนะ โดยจะมีการจัดเก็บตัวอย่างละ 50 ml เพื่อนำไปสู่ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2 กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

3.2.2.1 มีการติดเชื้อในเยื่อช่องท้องจากสาเหตุอื่นนอกเหนือจากการล้างไตทางช่องท้อง

3.2.2.2 เชื้อเป็นกลุ่มเชื้ออื่นๆ ที่นอกเหนือจากแบคทีเรีย อาทิเช่น เชื้อรา, TB เป็นต้น

3.2.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

ขนาดตัวอย่างได้มาจากการคำนวณโดยใช้สมการที่ 1

$$n = Z\alpha^2 pq/d^2 \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

โดย $\alpha = 0.5$ (two-tail), $Z\alpha = 1.96$ เมื่อกำหนดความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

$P =$ ผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่มีการติดเชื้อในช่องท้องที่มีผลเพาะเชื้อเป็นเชื้อแบคทีเรีย

$$q = 1 - p = 1 - 0.5 = 0.5$$

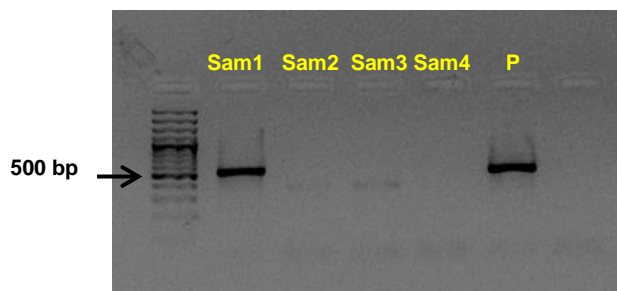
$$d = \text{ระดับความคลาดเคลื่อน คิดเป็นร้อยละ } 10 = 0.1$$

$$n = (1.96)^2 (0.5)(0.5) / (0.1)^2 = 96.03$$

ดังนั้น ผู้ทำวิจัยวางแผนใช้ขนาดตัวอย่างในการศึกษาประมาณ 97 ราย

3.3 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

3.3.1 การแสดงออกของยีน 16S rDNA ในตัวอย่างจากน้ำยา PD ของผู้ป่วยที่มีภาวะ peritonitis ด้วยวิธี PCR ให้ผล positive เมื่อวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงการให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis

จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ band ใน Sam1 ให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis

3.3.2 การแสดงออกของยีน 16S rDNA ในตัวอย่างจากน้ำยา PD ของผู้ป่วยที่มีภาวะ peritonitis ด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลเป็นบวกเมื่อตัวอย่างนั้นๆ มีค่า Cp น้อยกว่า negative control มากกว่าหรือเท่ากับ 3 cycle และมี melting curve ที่มีเพียง peak เดียวและมีความแตกต่างจาก negative control อย่างชัดเจน

3.4 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึก (record form) และคอมพิวเตอร์ รวมถึงตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูลทั้งหมดเพื่อให้ครบถ้วนตามเป้าหมายที่ได้กำหนดไว้ และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

3.5.1 ข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative variables) วิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพ อาทิ เพศ อายุ เป็นต้น จะเป็นค่าเฉลี่ย (mean) พิสัย (Range)

3.5.2 การวิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ ความถูกต้องแม่นยำในการวินิจฉัยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน แสดงนิยาม true positive, true negative, false positive และ false negative (ตารางที่ 1) และแสดงวิธีการวิเคราะห์ ความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก และค่าพยากรณ์ลบ ในสมการที่ 2, 3, 4 และ 5

การทดสอบ (Screening test)	Reference test (Gold standard)		รวม (total)
	Disease +	Disease -	
ผลบวก (positive)	ผลบวกจริง (True positive) a	ผลบวกเทียม (False positive) b	All positive tests $a+b$
ผลลบ (negative)	ผลลบเทียม (False negative) c	ผลลบจริง (True negative) d	All negative tests $a+b$
รวม (total)	All disease persons $a+c$	All non-disease persons $a+d$	All tested persons $a+b+c+d$

ตารางที่ 1 แสดงนิยาม true positive, true negative, false positive และ false negative

ความไว (Sensitivity) คือ ร้อยละของผู้ป่วยที่ตรวจได้ผลบวกจากการทดสอบ

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True positives}}{\text{True positives} + \text{False negatives}} \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

ความจำเพาะ (Specificity) คือ ร้อยละของบุคคลที่ปราศจากโรคที่ตรวจได้ถูกต้องจากการทดสอบว่าเป็นผลลบ

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True negatives}}{\text{True negatives} + \text{False positives}} \dots\dots\dots \text{สมการที่ 3}$$

ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) หมายถึง ร้อยละของการทดสอบที่ได้ผลบวกแล้วมีโอกาสเป็นโรค

$$\text{Positive predictive value} = \frac{\text{True positives}}{\text{True positives} + \text{False positives}} \dots\dots\dots\text{สมการที่ 4}$$

ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) หมายถึง ร้อยละของการทดสอบที่ได้ผลลบแล้วมีโอกาสไม่เป็นโรค

$$\text{Negative predictive value} = \frac{\text{True negatives}}{\text{True negatives} + \text{False negatives}} \dots\dots\dots\text{สมการที่ 5}$$

3.6 วิธีการวิจัย

3.6.1 การเก็บตัวอย่างน้ำยา PD โดยจะมีการเก็บตัวอย่างน้ำยา PD ของผู้ป่วยถุงแรกที่พบว่าชุน ในกรณีผู้ป่วยไม่ได้นำถุงน้ำยาที่ชุนมา ให้ถ่ายน้ำยาที่ค้างไว้ในช่องท้องอย่างน้อย 2-4 ชั่วโมง มาทำการส่งตรวจแทน แต่หากไม่มีน้ำยาค้างในช่องท้อง เช่น ช่วงกลางวันของผู้ป่วย nightly intermittent PD (NIPD) ให้ทำการใส่น้ำยาเข้าไปในช่องท้อง ทิ้งค้างไว้ 2-4 ชั่วโมง แล้วจึงค่อยนำน้ำยาที่ถ่ายออกมาส่งตรวจ

3.6.1.1 สวม mask และล้างมือ หลังล้างมือแล้วไม่จับสิ่งของอื่นอีก รวมทั้งเสื้อผ้า

3.6.1.2 ใช้ 10% povidone iodine ทาฆ่าเชื้อบริเวณที่จะเก็บน้ำยา PD ทิ้งไว้ 1 นาที ตามด้วย 70% alcohol รอให้แห้ง จึงเก็บน้ำยา PD

3.6.2 การทดสอบหา sensitivity ของเทคนิค PCR ในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

3.6.2.1 การทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform นำตัวอย่างน้ำยา PD 49 ml มาเติมเชื้อ *E. coli* 1ml ความเข้มข้น 7.28×10^7 cfu/ml นำมาปั่นตกตะกอนที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตกตะกอนที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทำการ

สกัด และทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial-dilution) 10 เท่าคือ $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$, $1:10^7$, $1:10^8$, $1:10^9$, $1:10^{10}$ ตามลำดับ นำไปเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR และ SYBR Green I real-time PCR โดยใช้ primer 2 เส้น คือ Forward Bosshard 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ Reverse Bosshard 5'- GTATTACCGCTGCTG-3'[50] ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 528 คู่เบส ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เปรียบเทียบผลการทดลองที่เกิดขึ้น[51-53]

3.6.2.2 การทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี boiling เตรียมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดยที่ *E. coli* มีความเข้มข้น 1.3×10^8 cfu/ml และ *S. aureus* มีความเข้มข้นเริ่มต้น 2.75×10^8 cfu/ml นำเชื้อในน้ำยา PD 1 ml มาปั่นที่ 13,000 rpm 5 นาที นำส่วนตะกอนไปละลายใน DNase-RNase free water 50 μ l นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C 10 นาที แล้วนำไปวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที ใช้ส่วนของ supernatant เป็น DNA template วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ นำไปเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR โดยใช้ primer 2 เส้น คือ Forward Bosshard 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ Reverse Bosshard 5'-GTATTACCGCTGCTG-3'[50] ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 528 คู่เบส ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เปรียบเทียบผลการทดลองที่เกิดขึ้น

3.6.2.3 การทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform และย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียด้วย lysozyme เตรียมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดยที่ *E. coli* มีความเข้มข้น 1.3×10^8 cfu/ml และ *S. aureus* มีความเข้มข้นเริ่มต้น 2.75×10^8 cfu/ml นำเชื้อในน้ำยา PD 1 ml เติม lysozyme 100 μ l นำไปบ่มที่ 37°C 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 13,000 rpm 10 นาที นำตะกอนไปละลายใน DNase-RNase free water 100 μ l นำไปสกัดโดยวิธี phenol-chloroform วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ นำไปเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยวิธี conventional PCR โดยใช้ primer 2 เส้น คือ Forward Bosshard 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ

Reverse Bosshard 5'-GTATTACCGCTGCTG-3'[50] ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 528 คู่เบส ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เปรียบเทียบผลการทดลองที่เกิดขึ้น

3.6.3 การทดสอบหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดสอบ conventional PCR โดยการนำน้ำจากขวด hemoculture มาทำการสกัดดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทำการทดสอบหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ conventional PCR ด้วยช่วงอุณหภูมิ annealing ที่แตกต่างกันคือ 60°C, 59°C, 57°C, 54.3°C, 50.9°C, 48.1°C, 46.1°C และ 45°C โดยใช้ primer 2 เส้น คือ Forward Bosshard 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ Reverse Bosshard 5'-GTATTACCGCTGCTG-3' ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 528 คู่เบส ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เปรียบเทียบผลการทดลองที่เกิดขึ้น

3.6.4 การทำการทดสอบการตรวจ PCR ที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างจากผู้ป่วยไตวายที่มีการติดเชื้อในช่องท้อง

3.6.4.1 ทำการรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่มีการติดเชื้อในช่องท้องจากโรงพยาบาลต่างๆ โดยเก็บข้อมูลทั่วไปได้แก่ อายุ เพศ ประวัติการติดเชื้อในช่องท้อง และปริมาณเม็ดเลือดขาวที่นับได้

3.6.4.2 เก็บน้ำยาจากช่องท้องผู้ป่วยที่ติดเชื้อเข้าถุงเพื่อให้เข้ากันสองถึงสามครั้งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 50 ml ปริมาตรรวม 150 ml ส่วนแรกนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่ 2 และ 3 นำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 rpm 15 นาที ในอุณหภูมิ 4°C เก็บส่วน pellet ไปสกัด DNA และอีกส่วนเก็บไว้เป็น stock เพื่อยืนยันผลภายหลัง สกัด DNA โดยวิธี phenol-chloroform และวัดปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rDNA โดยวิธี PCR โดยใช้ primer 2 เส้น คือ Forward Bosshard 5'-

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ Reverse Bosshard 5'-GTATTACCGCTGCTG-3'[50] โดยที่สารเคมีในปฏิกิริยา(ตารางที่ 2) และการควบคุมอุณหภูมิ (ตารางที่ 3) ดัดแปลงมาจาก Edwards KJ และคณะ[50] ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 528 คู่เบส ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ตรวจสอบลำดับเบสโดยวิธี sequencing ที่บริษัท 1st BASE Sequencing INT ประเทศสิงคโปร์ วิเคราะห์ผลจากการทำ direct sequencing เพื่อดูชนิดของแบคทีเรียที่ติดเชื้อ โดยการ blast กับ GeneBank ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษาทุกรายจะถูกบันทึกลงแบบฟอร์ม และจัดเก็บเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์เพื่อจะนำไปสู่การวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป โดยกำหนดให้การเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น gold standard ในการเปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ

3.6.4.3 ทำการตรวจ housekeeping gene "GAPDH" ควบคู่ไปกับการตรวจหา 16S rDNA เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาว่าไม่มี PCR inhibitor ด้วย primer hGAPDH forward: 5'-TCAACGACCCCTTCATTGAC-3' และ hGAPDH reverse: 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'[54] โดยสารเคมีในปฏิกิริยา (ตารางที่ 7) และการควบคุมอุณหภูมิ (ตารางที่ 8) ดัดแปลงมาจาก Murata และคณะ[54] GAPDH PCR product จะมีขนาด 500 คู่เบส ตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ด้วย 2% agarose gel

3.6.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.5.1 นำตัวอย่างน้ำยา PD ปริมาตร 50 ml มาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 15 นาที อุณหภูมิ 4°C

3.6.5.2 ทิ้งของเหลวส่วนบนทิ้งให้คงเหลือไว้ประมาณ 10-15 ml ผสมให้เข้ากัน

3.6.5.3 นำตัวอย่างน้ำยา PD มาหยดลงบน Plate ทั้ง 3 ชนิดคือ blood agar, chocolate agar, MacConkey agar โดยหยด plate ละ 2-3 หยด ทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการ spread plate อ่าน plate ทุกๆ 24 ชั่วโมง หากมีการเจริญเติบโตของเชื้อ จึงนำเชื้อชนิดนั้นๆ ไปทดสอบทาง biochemistry ต่อไป แต่หากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อใน 3 วัน จึงจะให้ผลการเพาะเชื้อเป็นลบ

3.6.5.4 นำตัวอย่างน้ำยา PD ปริมาตร 2 ml ฉีดลงในขวด hemoculture นำไปบ่มเชื้อในตู้ automate blood culture หากตู้มีการแสดงสัญญาณว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อภายในขวด

Hemoculture จึงจะนำขวดนั้นๆ มาย้อม gram stain และ spread ลง plate ทั้งสามชนิด เพื่อดูการเจริญเติบโตและยืนยันชนิดของเชื้อนั้นๆ แต่หากไม่มีสัญญาณของตู้ automate blood culture ภายใน 5 วันถึงจะถือว่าตัวอย่างนั้นๆ ให้ผลเป็นลบ

3.6.6 การสกัดดีเอ็นเอ

3.6.6.1 นำตัวอย่างน้ำยา PD ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปริมาตร 50 ml นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3000 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

3.6.6.2 ทิ้งของเหลวส่วนบนแล้วผสมส่วนที่เป็นตะกอนให้เข้ากัน เติม Lysis II ปริมาตร 900 μ l, Proteinase k 10 μ l และ 10% SDS 60 μ l นำไปปั่น (Incubate) ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลาหนึ่งคืน

3.6.6.3 เติม phenol-chloroform 500 μ l ผสมให้เข้ากันดี

3.6.6.4 ตูดแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml จำนวน 2 หลอดๆ ละ เท่าๆกัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3.6.6.5 ตูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดขนาด 1.5 ml เติม Absolute Ethanol 500 μ l และ 2M sodium acetate 60 μ l นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

3.6.6.6 นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวด้านบนทิ้ง จะมองเห็นตะกอนด้านล่าง

3.6.6.7 เติม 70% EtOH ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนของเหลวด้านบนทิ้ง นำไปตากแห้งเป็นเวลาหนึ่งคืน

3.6.6.8 เติมน้ำ 50 μ l นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3.6.7 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี polymerase chain Reaction (PCR)

total DNA ที่ได้หลังการสกัดตามวิธีในข้อ 3.6.6 มาวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี PCR โดยใช้ส่วนผสม (ตารางที่ 2) และการควบคุมอุณหภูมิ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออกของ 16S rDNA gene[50]

สารเคมี	ปริมาตร ($\mu\text{l}/\text{tube}$)
Buffer	10
MgCl ₂	3
dNTP	1
20 μM Forward primer	2
20 μM reverse primer	2
Water (PCR grade)	26.75
Gotaq	0.25
DNA template	5
Total volume	50

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา conventional PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ 16S rDNA gene[50]

Analysis mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition mode
Pre-incubation					
None	1	-	95°C	2 min	none
Amplification					
Quantification	40	Denaturation	95°C	45 s	none
		Annealing	45°C	45 s	none
		Extension	72°C	30 s	single
Cooling					
None	1	-	72°C	5 min	none

ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR[50, 54]

Gene	Primers	Type	Sequence (5'--->3')
16s rDNA	Forward Bosshard	Forward	AGAGTTTGATCMTG GCTCAG
	Reverse Bosshard	Reverse	GTATTACCGCTGCTG
GAPDH	hGAPDH forward	Forward	TCAACGACCCCTTCA TTGAC
	hGAPDH reverse	Reverse	ATGCAGGGATGATGT TCTGG

3.6.8 การตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis

3.6.8.1 เตรียม 2% agarose gel ผสมด้วย ethidium bromide ที่งัวให้เจลแข็งตัว อย่างน้อย 20 นาที เท TBE buffer ลงไปจนท่วม 2% agarose gel

3.6.8.2 ผสม PCR product ที่ได้ปริมาตร 5 μ l กับ loading dye ปริมาตร 2 μ l บนกระดาษพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นหยอดลงในหลุมบน agarose gel

3.6.8.3 ต่อสายไฟฟ้าเชื่อมระหว่างขั้วไฟฟ้าบนเจลแอมเบอร์กับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ที่ 100 V สำหรับ 16S rDNA และ 135 V สำหรับ GAPDH เวลา 30 นาที

3.6.8.4 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบน agarose gel ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

3.6.9 ขั้นตอนการ sequencing

3.6.9.1 นำ PCR product ปริมาตร 7.5 μ l เติมสาร ExoProStar™ 1-step, Enzymatic PCR and Sequence Reaction Clean-up kit ปริมาตร 3 μ l

3.6.9.2 ผสมให้เข้ากัน นำไป purified PCR product โดยการนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และ Incubate ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อยุติการทำงานของเอนไซม์

3.6.9.3 นำส่ง PCR product ที่ผ่านการ Purified เรียบร้อยแล้ว ไป sequence ที่บริษัท 1st bases sequencing ประเทศสิงคโปร์ นำผล sequence ที่ได้มา blast กับฐานข้อมูล NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome[55]



3.6.10 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี SYBR Green I real-time PCR

total DNA ที่ได้หลังการสกัดตามวิธีในข้อ 3.6.6 มาวิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี SYBR Green I real-time PCR โดยใช้ส่วนผสม (ตารางที่ 5) และการควบคุมอุณหภูมิ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา Real-time PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออกของ 16S rDNA

สารเคมี	ปริมาตร ($\mu\text{l}/\text{tube}$)
SYBR Green Premix Ex Taq	10
10 μM primer 8F	0.8
10 μM primer 536R	0.8
DNase-RNase free water	6.4
Template DNA	2
Total volume	20

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ 16S rDNA gene[50]

Analysis mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition mode
Pre-incubation					
None	1	-	98°C	2 min	None
Amplification					
Quantification	40	Denaturation	95°C	10 s	None
		Annealing	54°C	15 s	None
		Extension	72°C	20 s	single
Cooling					
None	1	-	95°C	5 sec	none
			60°C	1 min	

วิเคราะห์ค่า Cp และค่า Tm ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับ positive และ negative control

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา conventional PCR สำหรับบ่งชี้การแสดงออกของ GAPDH gene

สารเคมี	ปริมาณ (µl/tube)
2x Phusion Flash PCR Master Mix	10
10 µM primer hGAPDH-F	1
10 µM primer hGAPDH-R	1
DNase-RNase free water	6
template DNA	2
Total volume	20



ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา conventional PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ GAPDH gene

Analysis mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition mode
Pre-incubation					
None	1	-	98°C	2 min	None
Amplification					
Quantification	30	Denaturation	98°C	1 s	None
		Annealing	55°C	5 s	None
		Extension	72°C	15 s	single
Cooling					
None	1	-	95°C	5 sec	none
			72°C	1 min	

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

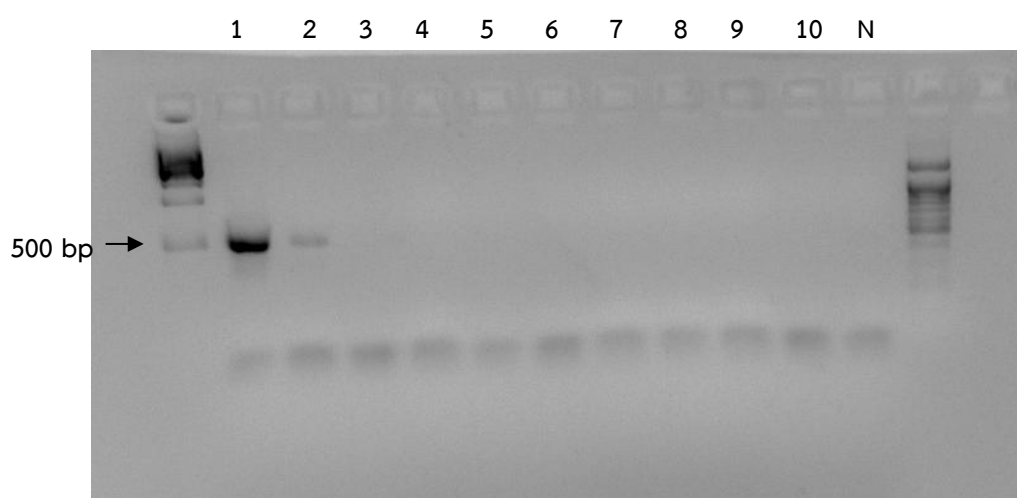
ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้องที่มีการติดเชื้อในช่องท้องที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 7 ราย โรงพยาบาลบ้านแพ้ว (สาขาพร้อมมิตร) จำนวน 74 ราย โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 17 ราย โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตรจำนวน 3 ราย และโรงพยาบาลพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรีจำนวน 1 ราย รวมทั้งหมด 102 ราย มีอายุตั้งแต่ 18 ปีจนถึง 89 ปี ค่าเฉลี่ยอายุของตัวอย่างที่ศึกษามีค่าเท่ากับ 60.28 ปี (57.22, 63.34; 95% CI) เป็นเพศชายจำนวน 46 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.1 และเป็นเพศหญิงจำนวน 56 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.9 ของตัวอย่างทั้งหมด (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

		ตัวอย่างผู้ป่วย 102 ราย
		มัธยฐาน, ค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)
อายุเฉลี่ย (ปี)		61.00, 60.28 (18.00-89.00)
เพศ	ชาย	46 (45.1)
	หญิง	56 (54.9)
น้ำหนัก (kg)		55.30, 56.89 (35.00-106.00)
ส่วนสูง (cm)		160.00, 159.18 (145.00-178.00)
ดัชนีมวลกาย (BMI; Kg/m ²)		21.72, 22.63 (15.56-37.11)

4.2 ผลการทดสอบหา sensitivity ของเทคนิค PCR ในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

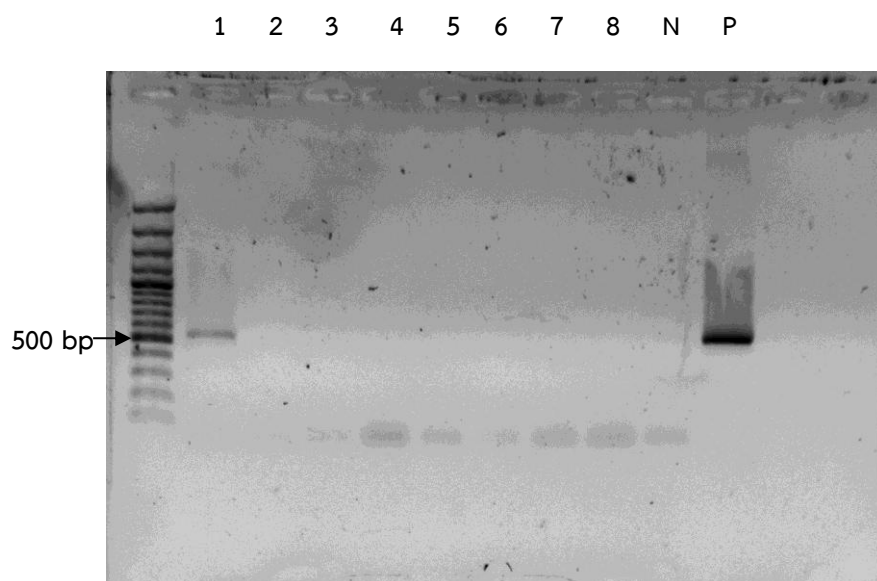
4.2.1 การทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform โดยการ spike เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ทำ serial dilution แล้วตรวจวัดด้วยวิธี PCR โดย DNA ที่สกัดได้ มีค่าความเข้มข้น 1347.49 ng/ μ l ค่า 260/280 เท่ากับ 1.69 และค่า 260/230 เท่ากับ 2.03 (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16s rDNA โดยวิธี conventional PCR โดยที่ (1) คือ 10^{-1} และ (10) คือ 10^{-10}

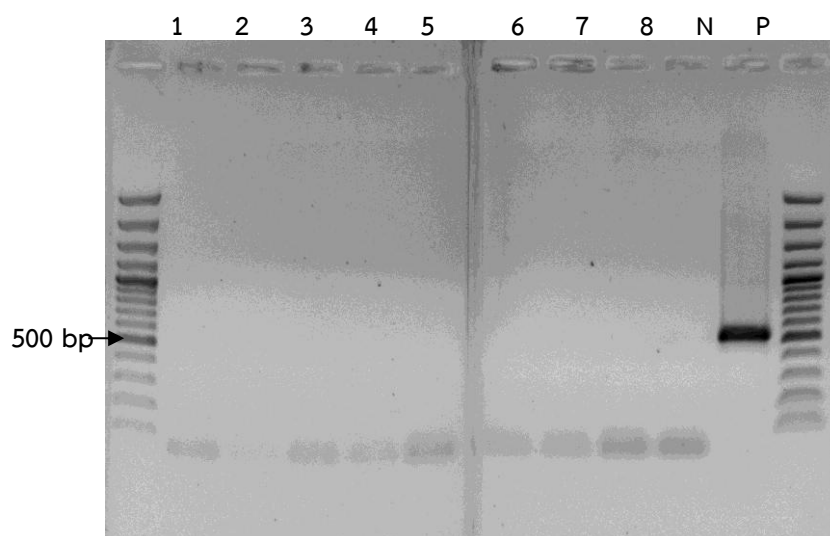
จากรูปที่ 11 มีการแสดงออกของ band ที่ หมายเลข (1) และ (2) ดังนั้น ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR เท่ากับ 7.28×10^5 cfu/ml

4.2.2 การทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี boiling โดยการ spike เชื้อ *E. coli* (รูปที่ 12) และ *S. aureus* (รูปที่ 13)



รูปที่ 12 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR สกัด DNA โดยวิธี boiling spike เชื้อ *E. coli* โดยที่ (1) คือ 10^8 และ (8) คือ 10^1

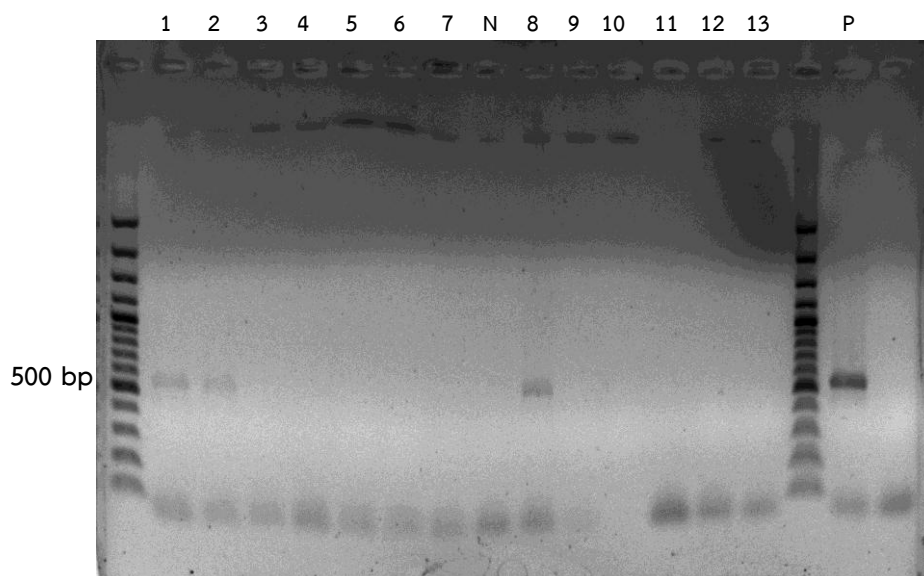
จากรูปที่ 12 มีการแสดงออกของ band ที่ หมายเลข (1) แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR สกัดโดยวิธี boiling เท่ากับ 1.3×10^8 cfu/ml



รูปที่ 13 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR สกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี boiling spike เชื้อ *S. aureus* โดยที่ (1) คือ 10^8 และ (8) คือ 10^0

จากรูปที่ 13 ไม่มีการแสดงออกของ band จากการทดสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR สกัดโดยวิธี boiling จะต้องมีปริมาณเชื้อมากกว่า 1.3×10^8 cfu/ml

4.2.3 การทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform และย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียด้วย lysozyme โดยการ spike เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* (รูปที่ 14)

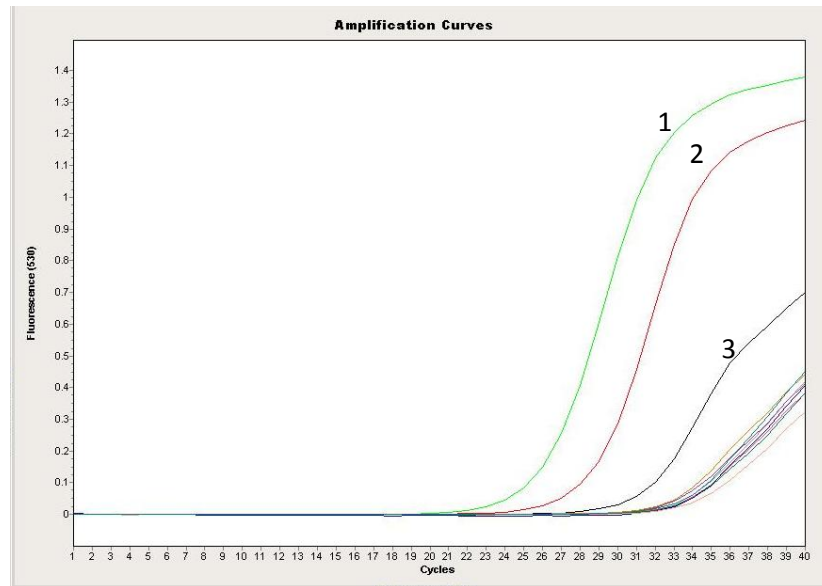


รูปที่ 14 แสดงผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี conventional PCR โดยการเติม lysozyme spike เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดยที่ (1) คือ 10^8 *E. coli*, (7) คือ 10^2 *E. coli*, (8) คือ 10^8 *S. aureus* และ (13) คือ 10^3 *S. aureus*

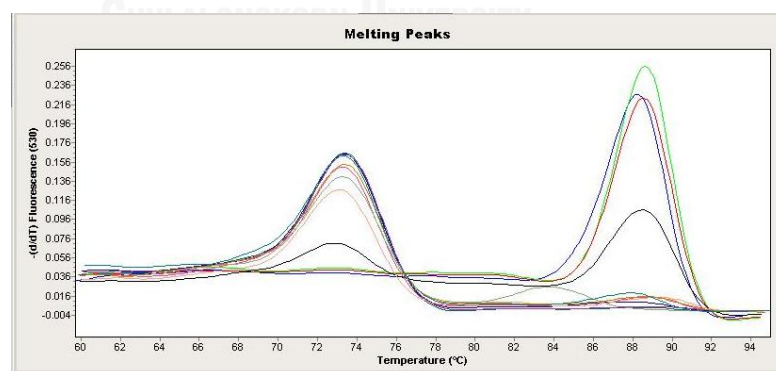
จากรูปที่ 14 มีการแสดงออกของ band ที่ หมายเลข (1) และหมายเลข (2) แสดงให้เห็นว่าการทดสอบ sensitivity โดยการเติม lysozyme ก่อนที่จะสกัดดีเอ็นเอเพื่อช่วยย่อยผนังเซลล์ ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR เท่ากับ 1.3×10^7 cfu/ml และ มีการแสดงออกของ band ที่หมายเลข (8) แสดงว่าปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR เท่ากับ 2.75×10^8 cfu/ml

4.3 ผลการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR

ในการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยการ spike เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ โดยการทำ serial dilution แล้วตรวจวัดด้วยวิธี real-time PCR (รูปที่ 15 และ 16)



รูปที่ 15 แสดง amplification curves ของการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี real-time PCR โดยที่ (1) คือ 10^{-1} , (2) คือ 10^{-2} และ (3) คือ 10^{-3}

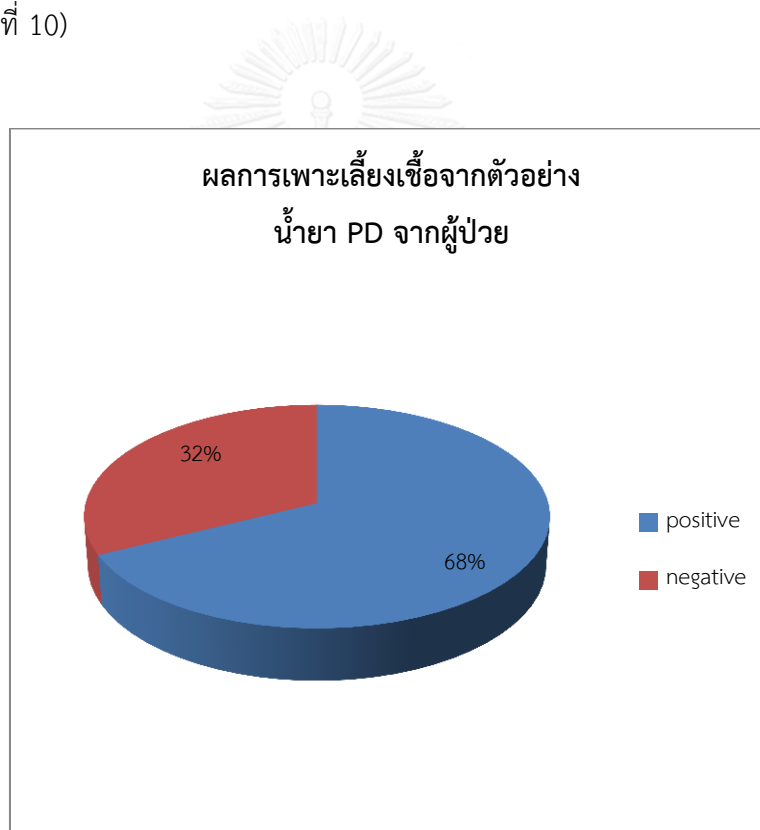


รูปที่ 16 แสดง melting peaks ของการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA โดยวิธี real-time PCR

จากรูปที่ 15 และรูปที่ 16 แสดงถึง amplification curve และ melting ของการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี real-time PCR เท่ากับ 7.28×10^4 cfu/ml

4.4 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วย

เมื่อนำตัวอย่างน้ำยา PD จากผู้ป่วยโรงพยาบาลต่างๆ ทั้งหมด 102 ราย นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้ผลเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นบวกจำนวน 69 ตัวอย่างและผลการเพาะเชื้อเป็นลบจำนวน 33 ตัวอย่าง (รูปที่ 17-18, ตารางที่ 10)

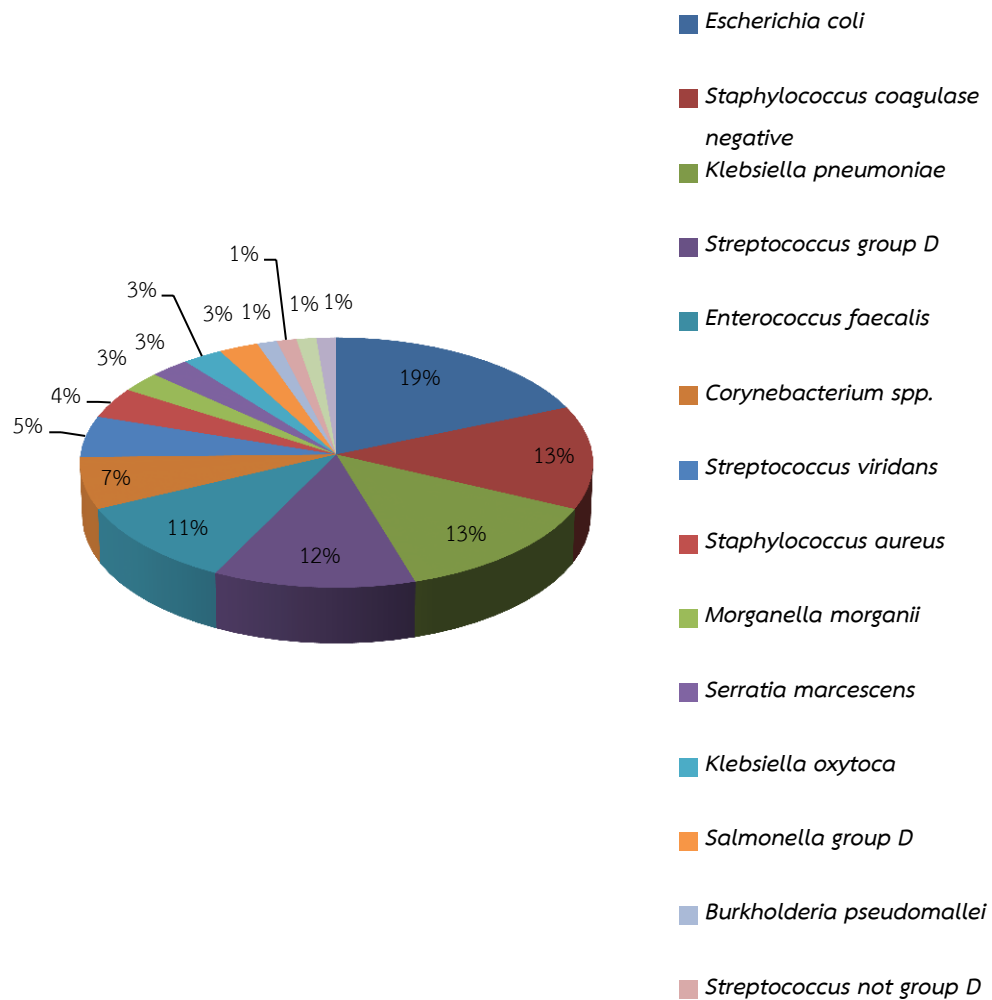


รูปที่ 17 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างน้ำยา PD จากผู้ป่วย

ตารางที่ 10 แสดงชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างน้ำยา PD

กลุ่มเชื้อ	ชนิดของเชื้อ	จำนวนผู้ป่วย
Gram positive	<i>Streptococcus</i> group D	9
	<i>Streptococcus</i> not group D	1
	<i>Streptococcus viridians</i>	4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
	<i>Staphylococcus</i> coagulase negative	10
	<i>Corynebacterium</i> spp.	5
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8
Gram Negative	<i>Salmonella</i> group D	2
	<i>Morganella morganii</i>	2
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
	<i>Klebsiella</i> spp.	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
	<i>Pseudomonas</i> spp.	1
	<i>Escherichia coli</i>	14
	<i>Serratia marcescens</i>	2
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1

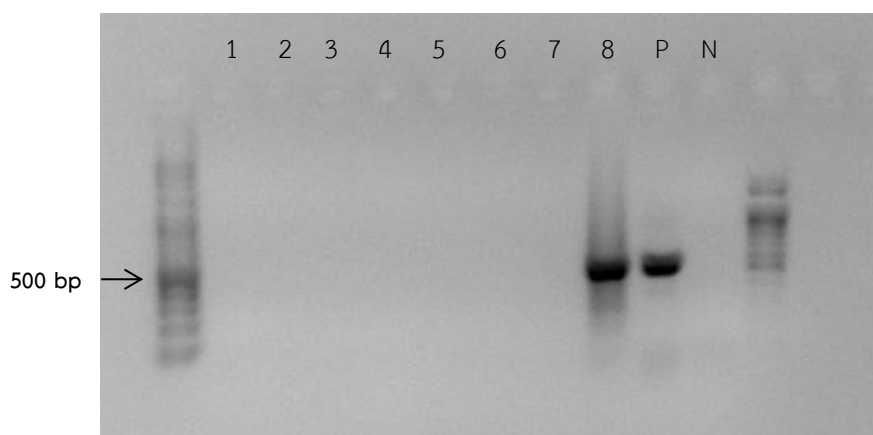
เชื้อชนิดต่างๆ ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากน้ำยา PD



รูปที่ 18 แสดงเชื้อชนิดต่างๆ ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากน้ำยา PD

4.5 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี conventional PCR

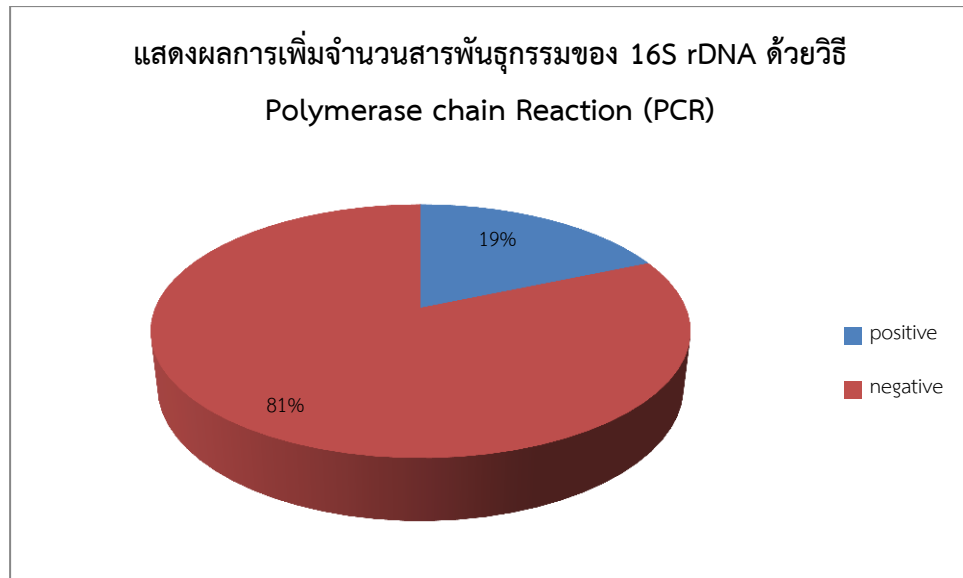
ผลการทดสอบหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR จากตัวอย่างน้ำจากขวด Hemoculture (รูปที่ 19)



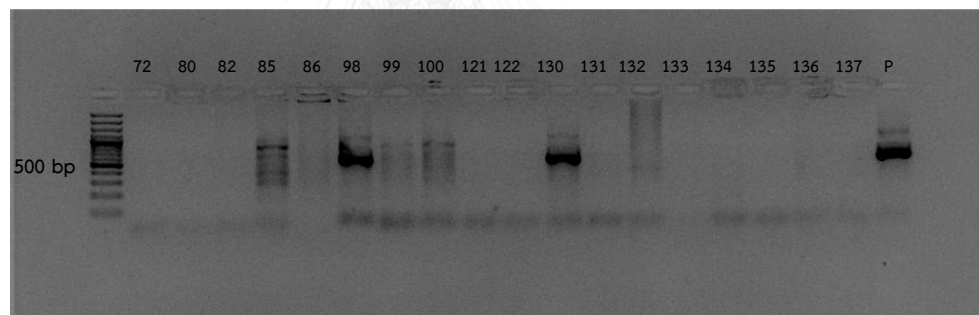
รูปที่ 19 แสดงผลการทดสอบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR ด้วย 16S rDNA โดยที่ (1) คือ 60°C, (2) คือ 59°C, (3) คือ 57°C, (4) คือ 54.3°C, (5) คือ 50.9°C, (6) คือ 48.1°C, (7) คือ 46.1°C, (8) คือ 45°C

จากรูปที่ 19 มีการแสดงออกของ band จากการทดสอบด้วยวิธี conventional PCR ที่หมายเลข (8) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ 45°C

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำยา PD พบว่าตัวอย่างน้ำยา PD จากผู้ป่วยจำนวน 102 ราย ให้ผล positive กับ 16S rDNA จำนวน 19 ราย (รูปที่ 20-21)



รูปที่ 20 แสดงผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR



รูปที่ 21 แสดงตัวอย่างการผลการตรวจหา PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

จากข้อมูลทั้งหมด นำมารอกข้อมูลในตาราง 2x2 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ PCR

PCR	culture technique		sub-total
	culture +ve	culture -ve	
PCR +ve	18	1	19
PCR -ve	51	32	83
	69	33	102

จากตารางที่ 11 สามารถนำไปคำนวณได้ดังนี้

Sensitivity

$$\begin{aligned}
 \text{Sensitivity} &= \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False negative}} \\
 &= \frac{18}{18 + 51} \times 100 \\
 &= 26.09\%
 \end{aligned}$$

Specificity

$$\begin{aligned}
 \text{Specificity} &= \frac{\text{True negative}}{\text{False positive} + \text{True negative}} \\
 &= \frac{32}{1 + 32} \times 100 \\
 &= 96.97\%
 \end{aligned}$$

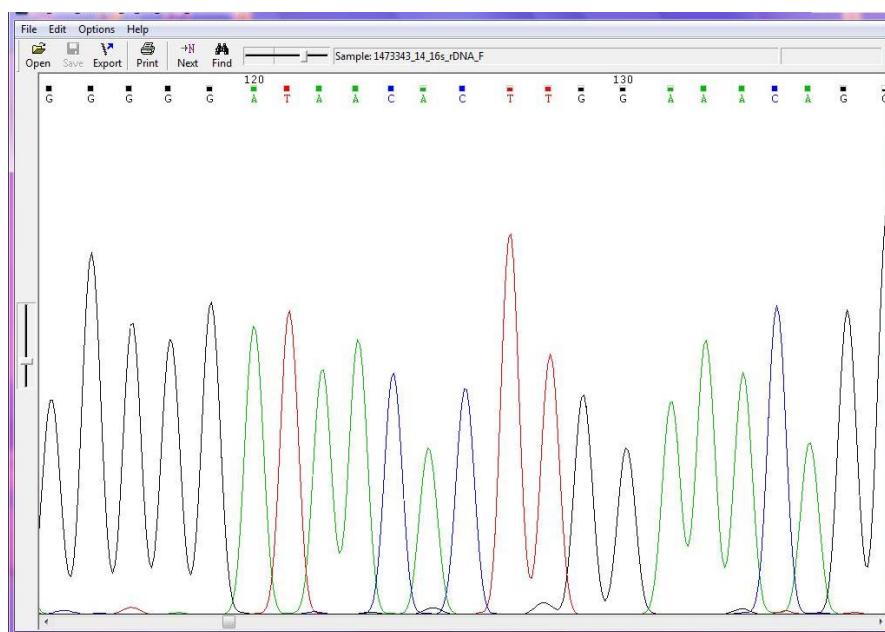
Positive predictive value

$$\begin{aligned} \text{Positive predictive value} &= \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False positive}} \\ &= \frac{18}{18 + 1} \times 100 \\ &= 94.74\% \end{aligned}$$

Negative predictive value

$$\begin{aligned} \text{Negative predictive value} &= \frac{\text{True negative}}{\text{False negative} + \text{True negative}} \\ &= \frac{32}{51+32} \times 100 \\ &= 38.55\% \end{aligned}$$

Sensitivity	26.09 %	16.26% to 38.06%: 95% CI
Specificity	96.97 %	84.18 % to 99.49 %: 95% CI
Positive Predictive value	94.74%	73.90 % to 99.12 %: 95% CI
Negative Predictive value	38.55%	28.07 % to 49.88 %: 95% CI



รูปที่ 22 แสดงตัวอย่างผลที่ได้จากการ sequencing

เมื่อนำผลจากการทำ Polymerase chain reaction ที่ให้ผลเป็นบวกลงไป sequencing ได้ผลดังนี้คือ

ตารางที่ 12 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อและ PCR sequencing

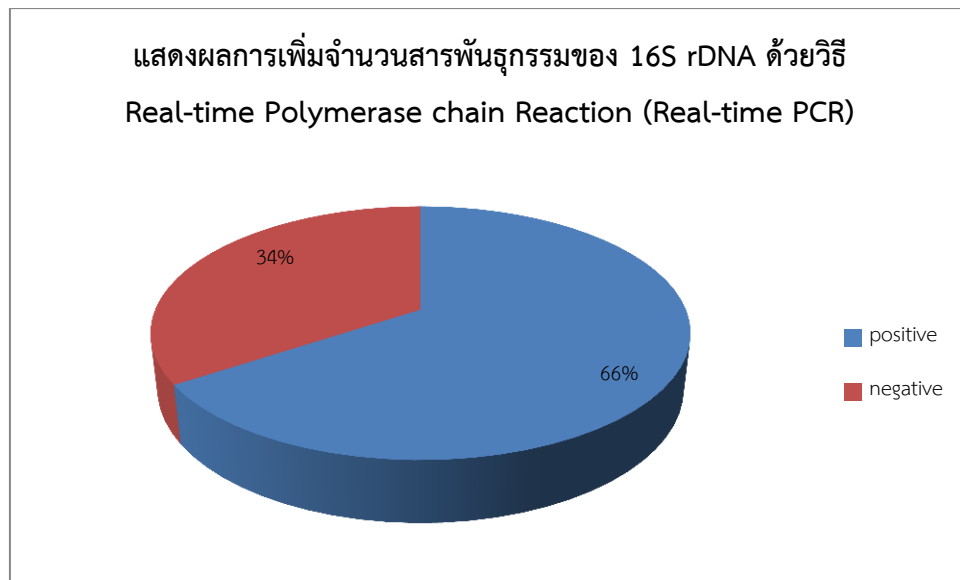
Result culture	PCR Sequencing	Identities
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	509/514(99%)
<i>Streptococcus</i> group D	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	468/473(99%)
<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	482/487(99%)
<i>Streptococcus</i> not group D	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	499/506(99%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	491/503(98%)
No growth	<i>Streptococcus salivarius</i>	492/495(99%)
<i>Streptococcus</i> group D	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	493/498(99%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	486/491(99%)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	483/485(99%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	508/514(99%)

Result culture	PCR Sequencing	Identities
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	484/488(99%)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	476/486(98%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	492/496(99%)
<i>Streptococcus viridans</i>	no result	
<i>Streptococcus viridans</i> , <i>Streptococcus</i> group D	<i>Enterobacter</i> spp.	60/68(88%)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	490/495(99%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	no result	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	450/452(99%)
<i>Streptococcus</i> group D	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	489/494(99%)

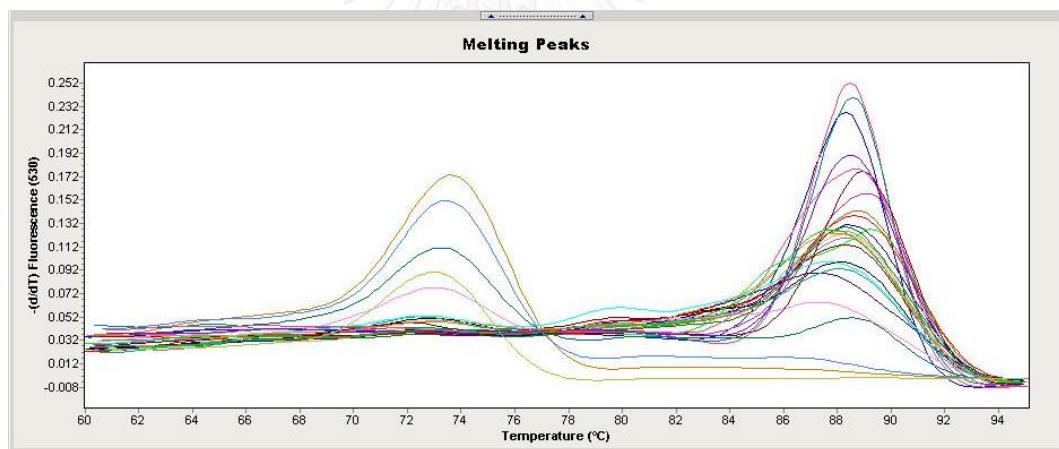
จากตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อและ PCR sequencing พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ identities ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 98-99%

4.6 ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR

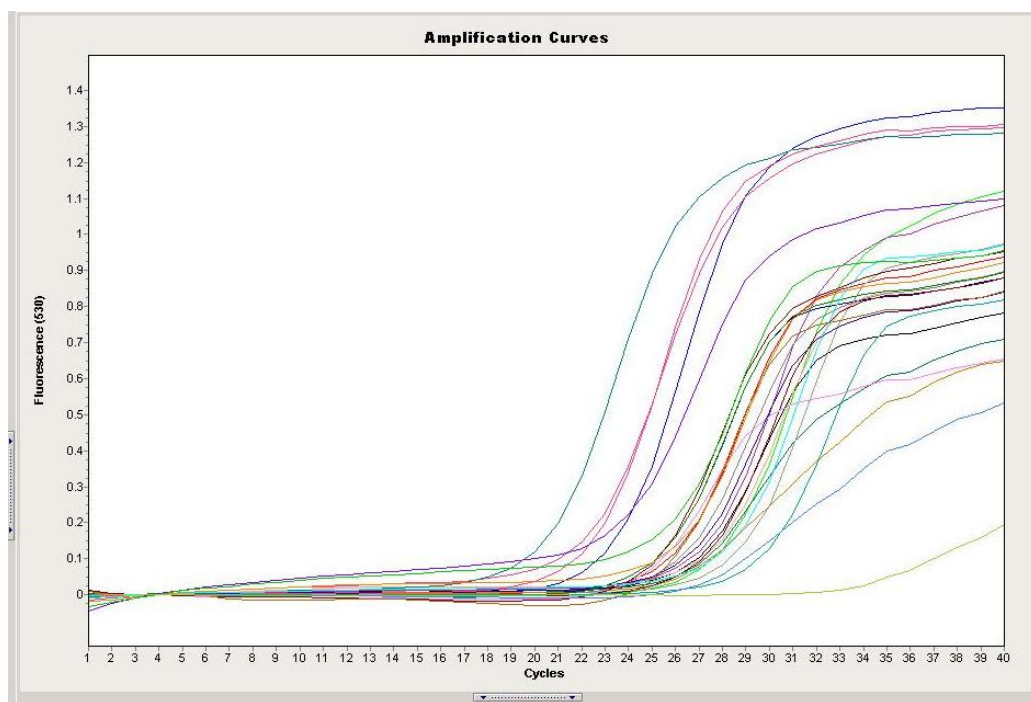
จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR จากตัวอย่างน้ำยา PD พบว่าตัวอย่างจำนวน 102 ราย ให้ผล positive กับ 16S rDNA จำนวน 67 ราย (รูปที่ 23-25)



รูปที่ 23 แสดงผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR



รูปที่ 24 แสดงตัวอย่างกราฟของ melting peaks จากปฏิกิริยา real-time PCR



รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างกราฟของ amplification curves จากปฏิกิริยา real-time PCR

จากข้อมูลทั้งหมด สามารถแสดงออกมาในรูปของตาราง (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ real-time PCR

PCR	culture technique		Sub-Total
	Culture +ve	Culture -ve	
PCR +ve	51	16	67
PCR -ve	18	17	35
	69	33	102

จากตารางที่ 13 สามารถนำไปคำนวณได้ผลดังนี้

Sensitivity

$$\begin{aligned}
 \text{Sensitivity} &= \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False negative}} \\
 &= \frac{51}{51 + 18} \times 100 \\
 &= 73.91\%
 \end{aligned}$$

Specificity

$$\begin{aligned}
 \text{Specificity} &= \frac{\text{True negative}}{\text{False positive} + \text{True negative}} \\
 &= \frac{17}{16 + 17} \times 100 \\
 &= 51.52\%
 \end{aligned}$$

Positive predictive value

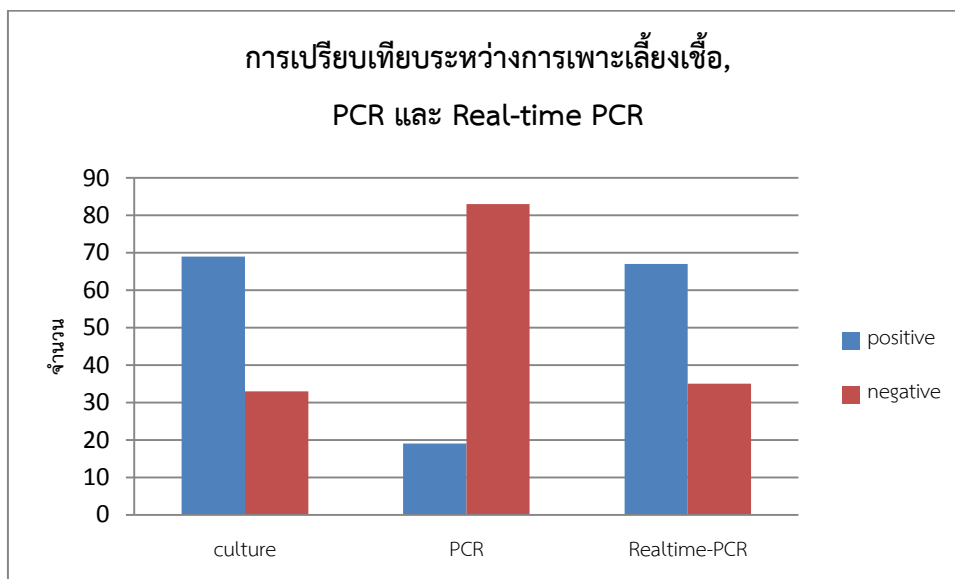
$$\begin{aligned}
 \text{Positive predictive value} &= \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False positive}} \\
 &= \frac{51}{51 + 16} \times 100 \\
 &= 76.12\%
 \end{aligned}$$

Negative predictive value

$$\begin{aligned} \text{Negative predictive value} &= \frac{\text{True negative}}{\text{False negative} + \text{True negative}} \\ &= \frac{17}{18 + 17} \times 100 \\ &= 48.57\% \end{aligned}$$

Sensitivity	73.91 %	61.94 % to 83.74 %: 95% CI
Specificity	51.52 %	33.55 % to 69.19 %: 95% CI
Positive Predictive value	76.12%	64.13 % to 85.68 %: 95% CI
Negative Predictive value	48.57%	31.39 % to 66.00 %: 95% CI

6.7 การเปรียบเทียบผลระหว่าง PCR และ real-time PCR



รูปที่ 26 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ PCR และ real-time PCR

จากรูปที่ 26 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ PCR และ real-time PCR พบว่าการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลเป็นบวกที่ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงเชื้อมากกว่าการทดสอบด้วยวิธี PCR

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่าง PCR และ real-time PCR

	PCR	real-time PCR
Sensitivity	26.09 %	73.91 %
Specificity	96.97 %	51.52 %
Positive Predictive value	94.74%	76.12%
Negative Predictive value	38.55%	48.57%

จากตารางที่ 14 พบว่า การทดสอบด้วยวิธี real-time PCR มีค่าความไวและค่าพยากรณ์ลบที่ดีกว่าการทดสอบด้วยวิธี PCR แต่มีค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวกที่น้อยกว่า เมื่อมีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน

6.8 การเปรียบเทียบผลการวิจัยกับการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้โดย Ciesielczuk HL และคณะ [10] และ Kim SH และคณะ [56]

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ broad-range PCR ของ CAPD culture fluid โดย Kim SH และคณะ [56]

PCR	Culture technique		Sub-Total
	Culture +ve	Culture -ve	
PCR +ve	53	1	54
PCR -ve	2	44	46
	55	45	100

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาในครั้งนี้กับผลการศึกษาโดย Kim SH และคณะ [56]

	Conventional PCR	Kim SH และคณะ
Sensitivity	26.09 %	96.36%
Specificity	96.97 %	97.78%
Positive Predictive value	94.74%	98.15%
Negative Predictive value	38.55%	95.65%

จากตารางที่ 15 เป็นผลจากการศึกษาครั้งที่ผ่านมา โดย Kim SH และคณะ [56] โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ board-range PCR ของ CAPD culture

fluid เมื่อนำข้อมูลไปคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก ค่าพยากรณ์ลบ และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 16) พบว่าการศึกษาของ Kim SH และคณะ[56] มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก และค่าพยากรณ์ลบที่ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจาก การศึกษาของ Kim SH และคณะ[56] เป็นการศึกษาจากตัวอย่าง CAPD culture fluid ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่มากกว่าการตรวจวัดจากตัวอย่างน้ำยา PD โดยตรง

ตารางที่ 17 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างผลการศึกษาในครั้งนี้ กับผลการศึกษาโดย Ciesielczuk HL และคณะ[10] โดยวิธี real-time PCR

	SYBR Green I real-time PCR	Ciesielczuk HL และคณะ
Sensitivity	73.91 %	69%
Specificity	51.52 %	63%
Positive Predictive value	76.12%	75%
Negative Predictive value	48.57%	56%

จากตารางที่ 17 เป็นผลจากการศึกษาครั้งที่ผ่านมา โดย Ciesielczuk HL และคณะ[10] โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ real-time PCR เมื่อนำข้อมูลไปคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก ค่าพยากรณ์ลบ และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการศึกษาของ Ciesielczuk HL และคณะ[10] มีค่าความไว และค่าพยากรณ์บวกน้อยกว่า แต่มีค่าความจำเพาะ และค่าพยากรณ์ลบที่มากกว่าการศึกษาครั้งนี้

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

Peritonitis เป็นปัญหาที่สำคัญของผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง รวมถึงการติดเชื้อที่รุนแรงและเรื้อรังทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อช่องท้องหรือทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วย peritonitis ด้วยวิธี PCR เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วย

จากการผลการทดสอบหาค่า sensitivity ของเทคนิค PCR ในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค PCR ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR จากการ spike เชื้อ *Escherichia coli* เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform เท่ากับ 7.28×10^5 cfu/ml เมื่อทดสอบหา sensitivity เมื่อสกัด DNA ด้วยวิธี boiling โดยการ spike เชื้อ *E. coli* ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR สกัดโดยวิธี boiling เท่ากับ 1.3×10^8 cfu/ml ในขณะที่เดียวกัน spike เชื้อ *S. aureus* ไม่มีการแสดงออกของ band จากการทดสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR สกัดโดยวิธี boiling จะต้องมีปริมาณเชื้อมากกว่า 1.3×10^8 cfu/ml เนื่องจาก *S. aureus* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก มีผนังเซลล์ที่หนากว่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบ[57] นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการย่อยผนังเซลล์ด้วย lysozyme โดยการ spike เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ผลปรากฏว่า ปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR เท่ากับ 1.3×10^7 cfu/ml และ ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี conventional PCR เท่ากับ 2.75×10^8 cfu/ml ในขณะเดียวกัน ได้ทำการทดสอบ sensitivity ของ 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR โดยการ spike เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ โดยการทำให้ serial dilution ผลปรากฏว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี real-time PCR เท่ากับ 7.28×10^4

cfu/ml เมื่อเราเปรียบเทียบกันระหว่าง conventional PCR และ real-time PCR พบว่า วิธี real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ดีกว่า conventional PCR

จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลเป็นบวก 68% และผลการเพาะเลี้ยงเป็นลบ 32% ประกอบด้วยกลุ่มเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Streptococcus* group D, *Streptococcus* not group D, *Streptococcus viridians*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Corynebacterium* spp., *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* group D, *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia pseudomallei*

ในการตรวจวัดการติดเชื้อ โดยมี target gene เป็น 16S rDNA ด้วยวิธี conventional PCR ผลการทดสอบหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR จากตัวอย่างน้ำจากขวด Hemoculture พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ 45°C เมื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำยา PD พบว่าตัวอย่างน้ำยา PD จากผู้ป่วยจำนวน 102 ราย ให้ผล positive กับ 16S rDNA จำนวน 19 ราย เมื่อนำข้อมูลนำมากรอกข้อมูลในตาราง 2x2 เปรียบเทียบระหว่าง conventional PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อ[58] พบว่า การวินิจฉัยด้วยวิธี conventional PCR ให้ผลเป็นบวก 26% ของตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด มีค่า sensitivity 26.09% specificity 96.97% positive predictive value 94.74% Negative predictive value 38.55% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่ผ่านมาโดย Kim SH และคณะ [56] โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ board-range PCR ของ CAPD culture fluid เมื่อนำข้อมูลไปคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก ค่าพยากรณ์ลบ และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการศึกษาของ Kim SH และคณะ[56] มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก และค่าพยากรณ์ลบที่ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาของ Kim SH และคณะ[56] เป็นการศึกษาจากตัวอย่าง CAPD culture fluid ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่มากกว่าการตรวจวัดจากตัวอย่างน้ำยา PD โดยตรง เมื่อนำผลจากการทำ Polymerase chain reaction ที่ให้ผลเป็นบวกไป sequencing พบว่า ผล sequencing ส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์ identities อยู่ที่ 98-99% มีเพียงบางรายที่ไม่สามารถอ่านผล sequencing ได้เนื่องจากลักษณะของกราฟ sequencing มีการซ้อนทับกัน ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างนั้นๆ ไปทำการ clone พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ในการตรวจวัดการติดเชื้อ โดยมี target gene เป็น 16S rDNA ด้วยวิธี real-time PCR จากตัวอย่างน้ำยา PD พบว่าตัวอย่างจำนวน 102 ราย ให้ผล positive กับ 16S rDNA จำนวน 67 ราย เมื่อนำข้อมูลนำมากรอกข้อมูลในตาราง 2x2 เปรียบเทียบระหว่าง real-time PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีค่ามีค่า sensitivity 73.91% specificity 51.52% positive predictive value 76.12% Negative predictive value 48.57% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่ผ่านมา โดย Ciesielczuk HL และคณะ[10] โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทำ real-time PCR เมื่อนำข้อมูลไปคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์บวก ค่าพยากรณ์ลบ และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการศึกษาของ Ciesielczuk HL และคณะ[10] มีค่าความไว และค่าพยากรณ์บวกน้อยกว่า แต่มีค่าความจำเพาะ และค่าพยากรณ์ลบที่มากกว่า การศึกษาครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง conventional PCR และ real-time PCR ในการศึกษาครั้งนี้ การวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR มีความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคมากกว่า เนื่องจากจากการวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR มีความไวในการตรวจวินิจฉัยมากกว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี conventional PCR ที่ไม่สามารถตรวจจับได้ด้วย ethidium bromide[59] ดังจะเห็นได้จากผลการผลวิจัย ร้อยละ 3 ของ real-time PCR ที่ให้ผลเป็นบวก มีค่า Cp ที่น้อยกว่า 20 cycles ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงการมีปริมาณของ DNA ของแบคทีเรียในปริมาณที่สูงซึ่งสอดคล้องกันกับการให้ผลเป็นบวกโดยวิธี conventional PCR และการที่ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลเป็นบวกทั้งในขวด hemoculture และวุ้นเลี้ยงเชื้อ และกว่าร้อยละ 18 ของตัวอย่าง real-time PCR ที่ให้ผลเป็นบวกมีค่า Cp ที่มากกว่า 27 cycles บ่งชี้ถึงปริมาณ DNA ของแบคทีเรียในปริมาณที่ต่ำ โดยที่เกณฑ์ในการพิจารณาการให้ผลเป็นบวกของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR ทางผู้วิจัย ได้อาศัยหลักเกณฑ์อ้างอิงของ Edwards KJ และคณะ[50] ที่ได้กล่าวว่า ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกต้องมีค่า Cp น้อยกว่าหรือเท่ากับ negative control 3 cycles และที่สำคัญลักษณะของ melting peak ต้องแสดงลักษณะของ peak เพียง peak เดียว และมีความแตกต่างจาก melting peak ของ negative control อย่างชัดเจน [60]

ในกลุ่มที่มีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นลบ พบว่าการตรวจวัดด้วยวิธี conventional PCR มีค่า false positive 3% ของตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี real-time PCR มีค่า false positive 48% ของตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ จะเห็นได้ว่า วิธีนี้อาจจะยังไม่เหมาะเท่าที่ควรในการนำไปใช้ทดสอบแทนวิธีมาตรฐาน ควรมีการพัฒนาและปรับปรุงให้มีความจำเพาะมากกว่านี้ จึงจะสามารถนำไปทดแทนวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ อาจปรับเปลี่ยน PCR condition ให้มีความจำเพาะมากขึ้น หรือเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ primer ให้มีความจำเพาะ

มากกว่านี้ ถึงอย่างไรก็ตาม การตรวจวัดด้วยวิธี real-time PCR ยังคงมีข้อดีกว่าในแง่ของเวลาที่มีความรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้กล่าวถึงการนำ 16S rDNA มาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งจากตัวอย่างจากเลือด, น้ำไขสันหลัง, เนื้อเยื่อติดเชื้อต่างๆ[7, 50, 61-65] หรือแม้แต่ตัวอย่างจากน้ำยาล้างไตทางช่องท้องของผู้ป่วยภาวะ peritonitis โดย Kim SH และคณะ ได้ทำการทดสอบในตัวอย่าง CAPD culture fluid โดยเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ Ciesielczuk HL และคณะ[10] ได้กล่าวว่า การที่ผลความไวและความจำเพาะไม่สูงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้ออาจเนื่องมาจากการที่ในตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ซึ่งอาจมีผลไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ก็เป็นไปได้

อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดวินิจฉัยด้วยวิธี real-time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR การทดสอบด้วยวิธี real-time PCR มีความไวในการตรวจวัดมากกว่า conventional PCR แต่ยังคงต้องมีการพัฒนาความจำเพาะในการตรวจวัดมากยิ่งขึ้นด้วยการเลือกวิธีการสกัดวิธีอื่นๆ เพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ของแบคทีเรียมากยิ่งขึ้น การทดสอบด้วย primer ของ 16S rDNA ในส่วนของ region อื่นๆ เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการวินิจฉัยการติดเชื้อ อันจะเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยและการเลือกยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

การตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยภาวะ peritonitis ที่ได้รับการล้างไตทางช่องท้อง โดยใช้ 16S rDNA สามารถที่จะนำไปใช้ในการตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ยังคงต้องการการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อประโยชน์สูงสุดในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ในการอ้างอิงเพื่อศึกษาและพัฒนาการตรวจวัดการติดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ 16S rDNA ได้ แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงขั้นตอนการสกัดเพื่อลดปัจจัยที่จะไปยับยั้งปฏิกิริยาการทำ PCR และเพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ของเชื้อแบคทีเรียสูงสุด, การเลือก primer ในส่วนของ region อื่นๆ ของ 16S rDNA เพื่อให้ครอบคลุมการตรวจวัดแบคทีเรียมากกว่านี้ เพื่อเพิ่มความไว ความจำเพาะ เพื่อประโยชน์สูงสุดในการรักษาผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

- [1]. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67(6): 2089-100.
- [2]. ญัฐวุฒิ โทวนำชัย, พิสุทธิ์ กตเวทิน, และ สมชาย เอี่ยมอ่อง. Overview of Renal Replacement Therapy. ใน: สมชาย เอี่ยมอ่อง, เกரியง ตั้งสง่า, อนุตตร จิตตินันทน์, เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, ดุสิต ล้าเลิศกุล, ประเสริฐ ชนกจิจารุ, บรรณาธิการ. *Textbook of Peritoneal Dialysis*. กรุงเทพฯ: Text & General Publication, Co Ltd, 2551: หน้า 1-17.
- [3]. Kanjanabuch T, Chanchaoenthana 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; 57-12.
- [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: 393-423.
- [5]. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(10): 908-34.
- [6]. Cai H, Archambault M, Prescott JF. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(5): 465-9..
- [7]. 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..
- [8]. Pivat S, Teanpaisan R. 16S rRNA PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of Oral *Lactobacillus casei* Group and Their Phenotypic Appearances. *ISRN Microbiology* 2013; 2013.

- [9]. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4): 840-62.
- [10]. Ciesielczuk HL, Shorten RJ, Davenport A, Kandil H, Carpenter JE, Mchugh TD, *et al*. The Role of 16s rDNA PCR in the Diagnosis of Peritoneal Dialysis-Associated Peritonitis. *J Med Microb Diagn* 2012; 2(1).
- [11]. ศิริินทร์ จิวากานนท์, เจริญ เกียรติวัชรชัย. Difficult Peritonitis and How to Management. ใน สมชาย เอี่ยมอ่อง, เกรียง ตั้งสง่า, อนุตตร จิตตินันท์, เกลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, ดุสิต ล้ำเลิศกุล, ประเสริฐ ธนกิจจารุ, บรรณาธิการ. *Textbook of Peritoneal Dialysis*. กรุงเทพฯ: Text & General Publication, Co Ltd, 2551: หน้า 279-90.
- [12]. เกลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์. Infection-related Peritonitis and Management. ใน เกลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, บรรณาธิการ. *ตำราแนวปฏิบัติการล้างไตทางช่องท้อง "ในพระสังฆราชูปถัมภ์"*. กรุงเทพฯ: บริษัท ศิริวัฒนาอินเตอร์พรีนธ์ จำกัด, 2556; หน้า 113-169.
- [13]. Miller TE, Findon G. Touch contamination of connection devices in peritoneal dialysis--a quantitative microbiologic analysis. *Perit Dial Int* 1997; 17(6): 560-7.
- [14]. Nessim SJ. Prevention Of Peritoneal Dialysis-Related Infections. *Semin Nephrol* 2011; 31(2): 199-212.
- [15]. Caravaca F, Ruiz-Calero R, Dominguez C. Risk factors for developing peritonitis caused by micro-organisms of enteral origin in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 1998; 18(1): 41-5.
- [16]. Johnson CC, Baldessarre J, Levison ME. Peritonitis: Update on Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Infect Dis* 1997; 24(6) : 1035-45.
- [17]. Read RR, Eberwein P, Dasgupta MK, Grant SK, Lam K, Nickel JC, *et al*. Peritonitis in peritoneal dialysis: Bacterial colonization by biofilm spread along the catheter surface. *Kidney Int* 1989; 35(2): 614-21.
- [18]. Dasgupta MK, Ward K, Noble PA, Larabie M, Costerton JW. Development of Bacterial Biofilms on Silastic Catheter Materials in Peritoneal Dialysis Fluid. *Am J Kid Dis* 1994; 23(5): 709-16.
- [19]. อัมพร สกุลแสงประภา. Treatment and Prevention of Peritoneal Dialysis-Related Infections. ใน สมชาย เอี่ยมอ่อง, เกรียง ตั้งสง่า, อนุตตร จิตตินันท์, เกลิงศักดิ์ กาญจน-

- บุษย์, ดุสิต ล้ำเลิศกุล, ประเสริฐ ธนกิจจารุ, บรรณาธิการ. Textbook of Peritoneal Dialysis. กรุงเทพฯ: Text & General Publication, Co Ltd; 2551: หน้า 269-78.
- [20]. Chaudhary K, Khanna R. Biocompatible Peritoneal Dialysis Solutions: Do We Have One? Clin J Am Soc Nephrol 2010; 5(4): 723-32.
- [21]. Keane WF, Alexander SR, Bailie GR, Boeschoten E, Gokal R, Golper TA, *et al.* Peritoneal dialysis-related peritonitis treatment recommendations: 1996 update. Perit Dial Int 1996; 16(6): 557-73.
- [22]. Wikipedia. Gram staining (online). Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Gram_staining.
- [23]. Karen A. Santo-Pietro, E.A. Microorganism of the Month: Corynebacterium species. Available from: <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-05-2007.html>.
- [24]. Gonzalez A. Escherichia coli on MacConkey Agar. Available from: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=10792>.
- [25]. Chen J. Cultivation Media for Bacteria. Available from: <http://learn.chm.msu.edu/vibl/content/differential/>.
- [26]. Troidle L, Gorban-Brennan N, Klinger A, Finkelstein FO. Continuous Peritoneal Dialysis-Associated Peritonitis: A Review and Current Concepts. Semin Dial 2003; 16(6): 428–37.
- [27]. ภัทรชัย กิรติสิน. Bacteria Taxonomy. ใน: ภัทรชัย กิรติสิน, บรรณาธิการ. วิทยาแบคทีเรีย การแพทย์. กรุงเทพฯ: หจก. วี.เจ. พรินต์ติ้ง; 2551: หน้า 1-18.
- [28]. Han XY. Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. In: Tang YW, Stratton CW, edit. Advanced techniques in diagnostic microbiology. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2006: p 323-32.
- [29]. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods 2007; 69(2): 330-9.

- [30]. Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, Agarwal A, Chokshi P, Gerz EA, *et al.* Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(12): 3886–97.
- [31]. Boye K, Hansen DS. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *Int J Med Microbiol* 2003; 292(7-8): 495-503.
- [32]. Boye K, Hogdall E, Borre M. Identification of bacteria using two degenerate 16S rDNA sequencing primers. *Microbiol Res* 1999; 154(1): 23-6.
- [33]. Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One* 2012; 7(6): e39315.
- [34]. Case RJ, Boucher Y, Dahllof I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(1): 278–88.
- [35]. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol* 1991; 173(2): 697-703.
- [36]. Xu J, Stanley T, Millar BC, McClurg RB, Shaw A, Crothers L, *et al.* Difficult-to-identify bacteria: how use of 16S rDNA PCR and gene sequencing can help. *Br J Biomed Sci* 2008; 65(1): 33-6.
- [37]. Noller HF, Stolk BJV, Moazed D, Douthwaite S, Gutell RR. Studies on the structure and function of 16S ribosomal RNA using structure-specific chemical. *J Biosci* 1985; 8: 747–55.
- [38]. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9): 2761–4.
- [39]. Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(10): 4801-4805.

- [40]. Kopylov AM. X-Ray Analysis of Ribosomes: the Static of the Dynamic. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67(3): 372-82.
- [41]. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 1997; 23(7): 433-8.
- [42]. มาลินี อัครดิษฐเลิศ. เทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว. [cited 2008 MAY 13]; Available from: <http://ku-scsmicro36bkk.tripod.com/PCR.html>.
- [43]. นิสิตภาคจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 36. Polymerase Chain Reaction. Available from: <http://ku-scsmicro36bkk.tripod.com/PCR.html>.
- [44]. Arya M, Sherqill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19.
- [45]. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986-94.
- [46]. Bloch EM, Lee TH, Krause PJ, Telford SR 3rd, Montalvo L, Chafets D, *et al.* Development of a real-time polymerase chain reaction assay for sensitive detection and quantitation of Babesia microti infection. *Transfusion* 2013; 53(10): 2299-306.
- [47]. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30(6): 503-12.
- [48]. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 165-256.
- [49]. Gibthai. Real-time PCR technology. Available from: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12&page=4http://202.28.95.5/11Department/micro/public_html/Staff/Viraphong_Lulitanond/Real%20Time%20Polymerase%20Chain%20Reaction.pdf.
- [50]. 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(Pt5): 645-52.
- [51]. Ayub F, Sarker Y, Alam S. Prevalence of white spot syndrome virus infection detected by one-step and nested PCR in selected tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. *Aquacult Int* 2008; 16: 405–15.
- [52]. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; 148(Pt1): 257–66.
- [53]. Reier-Nilsen T, Farstad T, Nakstad B, Lauvrak V, Steinbakk M. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr* 2009; 9: 5.
- [54]. Murata K, Kouzarides T, Bannister AJ, Gurdon JB. Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin* 2010; 3(1): 4.
- [55]. Vetrovsky T, Baldrian P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS One* 2013; 8(2): e57923.
- [56]. 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.
- [57]. Umeda A, Ueki YI, Amako K. Structure of the *Staphylococcus aureus* Cell Wall Determined by the Freeze-Substitution Method. *J Bacteriol* 1987; 169(6): 2482-87.
- [58]. Frosth S, Slette-meas JS, Jørgensen HJ, Angen O, Aspán A. Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: harmonisation between three laboratories. *Acta Vet Scand* 2012; 54: 6.

- [59]. Bonasera V, Alberti S, Sacchetti A. Protocol for high-sensitivity/long linear-range spectrofluorimetric DNA quantification using ethidium bromide. *Biotechniques* 2007; 43(2): 173-6.
- [60]. Rebrikov DV, Trofimov DY. Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis. *Appl Bio Microbiol* 2006; 42(5): 455-63.
- [61]. Bonilla H, Kepley R, Pawlak J, Belian B, Raynor A, Saravolatz LD. Rapid diagnosis of septic arthritis using 16S rDNA PCR: a comparison of 3 methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69(4): 390-5.
- [62]. Chen L, Cai Y, Zhou G, Shi X, Su J, Chen G, *et al.* Rapid Sanger Sequencing of the 16S rRNA Gene for Identification of Some Common Pathogens. *PloS One* 2014; 9(2): e88886.
- [63]. Sarookhani MR, Ayazi P, Alizadeh S, Foroughi F, Sahmani A, Adineh M. Comparison of 16S rDNA-PCR Amplification and Culture of Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Iran J Pediatr* 2010; 20(4): 471-5.
- [64]. Lan Huong VT, Malimas T, Yukphan P, Potacharoen W, Tanasupawat S, Thanh Loan LT, *et al.* Identification of Thai isolates assigned to the genus *Gluconobacter* based on 16S-23S rDNA ITS restriction analysis. *J Gen Appl Microbiol* 2007; 53(2): 133-42..
- [65]. Pathipati P, Menon T, Kumar N, Francis T, Sekar P, Cherian KM. Usefulness of 16S rDNA sequencing for the diagnosis of infective endocarditis caused by *Corynebacterium diphtheriae*. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt8): 1159-61.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Analytical balance (Ohaus: model AR2140)
- 1.2 Analytical balance (Denver: model SI-2002)
- 1.3 Vortex mixer (Labnet: model VX100)
- 1.4 Centrifuge (Beckman Coulter: model Allegra X-15R)
- 1.5 Centrifuge (Biosan: model MSC-A300)
- 1.6 Refrigerate Microcentrifuge (Eppendorf: model 5415R)
- 1.7 Microcentrifuge (Eppendorf: model 5415D)
- 1.8 Autoclave (Hiclave: model HVA-85)
- 1.9 Freezer-20°C (Sanyo)
- 1.10 Freezer-80°C (Sanyo: model MDF-U5086W)
- 1.11 Hot air oven (Binder: model B28)
- 1.12 Laminar flow (Thermo electron corporation: model SAFE 2010)
- 1.13 Laminar flow (Heal Force: model HFsafe-900)
- 1.14 pH meter (Fisher scientific: model AB15)
- 1.15 Real-Time PCR Systems (Roche Applied Science: model LightCycler 2.0)
- 1.16 Refrigerator 4°C (Sharp: model SJD56N)
- 1.17 PCR Systems (Bio-Rad: model MJ mini)
- 1.18 Power supply (C.B.S. Scientific: model EPS-300 IIV)
- 1.19 Horizontal electrophoresis system (Bio-Rad: model SUB-cell[®] GT cell)
- 1.20 Water bath (Mettler: model M22)
- 1.21 Gel Imaging (Quantum: model ST4 1000)

2 อุปกรณ์

- 2.1 Adjustable micropipette: P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P100 (20-100 μ l), P1000 (100-1,000 μ l) (Gilson)
- 2.2 Pipette tip: 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (Labtip)
- 2.3 Syringe: 3ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml (Nipro)
- 2.4 Needle: 21Gx1", 18Gx1½" (Nipro)
- 2.5 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Corning)
- 2.6 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500ml, 1000 ml (Pyrex)
- 2.7 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Axygen)
- 2.8 Parafilm (American Nation Can)
- 2.9 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex)
- 2.10 Lightcycler capillary 20 μ l (Roche)
- 2.11 Glove (Sempermed)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1 Sodium dodecyl sulfate, for molecular biology, approx. 99% (Sigma: cat. no. L4390)
- 3.2 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, approx. 99% titration (Sigma: cat. no. ED2SS)
- 3.3 Sodium chloride (Merck)
- 3.4 Proteinase K, from *Tritirachium album* (Sigma: Cat. No. P2308)
- 3.5 Absolute Ethanol (Merck)
- 3.6 Gotaq Flexi DNA Polymerase (Promega: Cat. No. M8295)
- 3.7 dNTP (Thermo scientific)
- 3.8 Tris, Ultra Pure, Molecular Biology Grade (Research Organic: Cat. No. 9680T)
- 3.9 Agarose, Molecular Biology Grade (Vivantis: Cat. No. PC0701)
- 3.10 DNA Ladder vc 100bp plus (Vivantis: Cat. No. NL1407)
- 3.11 Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega)

3.12 SYBR[®] Premix Ex Taq[™], Tli RNaseH Plus (Takara: Cat. No. RR420A)

3.13 2x Phusion Flash (Thermo scientific)

3.14 ExoProStar[™] 1-step, Enzymatic PCR and Sequence Reaction

Clean-up kit (GE-Healthcare)

4 การเตรียมสารเคมี

4.1 10x TBE buffer

Tris	108	g
Boric acid	55	g
EDTA	7.5	g

Add water to 1000 ml.

4.2 Lysis II buffer

5.0 M NaCl	15	ml
0.5 M EDTA	48	ml

Add water to 500 ml

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวขวัญตา เพชรเผือก

(ภาษาอังกฤษ) Miss Kwanta Petphuak

อายุ 28 ปี เกิด 5 กันยายน 2529

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนาพุทธ

สถานภาพ สมรส

สถานที่เกิด จังหวัดพัทลุง

ที่อยู่ปัจจุบัน 15 หมู่ 3 ต.พนมวังก อ.ควนขนุน จ.พัทลุง

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)

สาขากายภาพบำบัด จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2551

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.

2554

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY