การคัดกรองการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลโดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นางสาวรติมา อิสระชัยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
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 Graduate School.

ENZYME IMMUNOASSAY FOR GLUTAMATE DEHYDROGENASE AS THE SCREENING TEST OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION IN HOSPITALIZED ADULT PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Miss Ratima Issarachaikul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลโดย เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในผู้ป่วยผู้ใหญ่ ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
โดย	นางสาวรติมา อิสระชัยกุล
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชุษณา สวนกระต่าย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชุษณา สวนกระต่าย)

..... กรรมการ

(นายแพทย์ปฏิณัฐ บูรณะทรัพย์ขจร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรพจน์ ตันติศิริวัฒน์)

รติมา อิสระชัยกุล : การคัดกรองการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลโดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. (ENZYME IMMUNOASSAY FOR GLUTAMATE DEHYDROGENASE AS THE SCREENING TEST OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTION IN HOSPITALIZED ADULT PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.ดร. นพ. ชุษณา สวนกระต่าย, 109 หน้า.

การติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล (CDI) เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบมากทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก อาการอาจจะเป็นเพียงถ่ายเหลวเล็กน้อยจนกระทั่งรุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ การวินิจฉัยโดยการตรวจเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนฟลูออเรสเซนแอสเสย์สำหรับท็อกซินเอและบี (cytotoxins A/B ELFA) ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีความไวไม่เพียงพอ การศึกษานี้จึงทำเพื่อประเมินความไวในการคัดกรอง CDI โดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (GDH EIA) โดยเป็นการศึกษาแบบสังเกตเชิงพรรณนาไปข้างหน้าในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่สงสัยว่าจะเป็น CDI และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 ผลการศึกษาพบว่า จากผู้ป่วย 91 ราย พบอัตราชุกของการเกิด CDI วินิจฉัยโดยวิธีการตรวจโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (PCR) สำหรับ *tcdA* และ *tcdB* genes ร้อยละ 24.2 การคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA ตรวจพบผลเป็นบวก 21 รายจากทั้งหมด 22 ราย คิดเป็น sensitivity ร้อยละ 95.5 และตรวจพบผลเป็นลบ 46 รายจากทั้งหมด 69 ราย คิดเป็น specificity ร้อยละ 66.7 positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) และ accuracy คิดเป็นร้อยละ 47.7, 97.9 และ 73.6 ตามลำดับ ส่วนการตรวจ cytotoxins A/B ELFA มี sensitivity, specificity, PPV NPV และ accuracy คิดเป็นร้อยละ 72.7, 95.7, 84.2, 91.7 และ 92.3 ตามลำดับ

ภาควิชา.....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2554.....

5474151030 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS : GLUTAMATE DEHYDROGENASE / *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTION / SCREENING TEST

RATIMA ISSARACHAIKUL : ENZYME IMMUNOASSAY FOR GLUTAMATE DEHYDROGENASE AS THE SCREENING TEST OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTION IN HOSPITALIZED ADULT PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL. ADVISOR : PROF. CHUSANA SUANKRATAY, MD, Ph.D., 109 pp.

Clostridium difficile infection (CDI) is one of the most common nosocomial infections in Thailand and worldwide. The clinical spectrum ranges from annoying diarrhea to severe life-threatening disease. Enzyme-linked immunofluorescent assay for cytotoxins A/B (cytotoxins A/B ELFA) which has been used in our institute is generally considered the test with low sensitivity for diagnosis of CDI. Our study was thus aimed to determine the diagnostic values of the new test, enzyme immunoassay for glutamate dehydrogenase (GDH EIA), for CDI. We performed a prospective study in 91 adult patients with suspected CDI who were hospitalized at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand, from December 2012 to February 2013.

The results showed that of 91 patients. There were 22 CDI diagnosed by the gold standard PCR test for *tcdA* and *tcdB* genes, accounting for the prevalence of 24.2%. Of these 22 patients, GDH EIA was positive in 21 patients, accounting for the sensitivity of 95.5%. Of 69 patients without CDI, GDH EIA was negative in 46 patients, accounting for the specificity of 66.7%. The positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy were 47.7%, 97.9%, and 73.6%, respectively. The sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy of cytotoxins A/B ELFA were 72.7%, 95.7%, 84.2%, 91.7%, and 92.3%, respectively.

Department : ……...Medicine……. Student's Signature……..

Field of Study : .....Medicine.....…… Advisor's Signature……..

Academic Year : …2011……..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณผู้ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของศาสตราจารย์ดอกเตอร์นายแพทย์ชุษณา สวนกระต่าย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำ แนวทางข้อคิดเห็นและข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณผู้ให้ความร่วมมือ ช่วยเหลือและลงมือปฏิบัติในการทำงานวิจัย

- นางสาวมยุรี ขันติพงศ์ ผู้ชำนาญการนักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- นางสาวอัจฉราพร สวัสดิ์พานิช ผู้ชำนาญการนักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- นางสาวเกษิณี อรุณยิ่งมงคล ผู้ชำนาญการนักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- นางปนัดดา ขำนิพัทธ์ เจ้าหน้าที่ธุรการ ฝ่ายอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ขอขอบคุณผู้ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางข้อคิดเห็น และข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อวิจัย

- อาจารย์ประจำสาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน
- รองศาสตราจารย์ดอกเตอร์สมหญิง ธัมวาสร อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณแพทย์ประจำบ้าน และแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน

ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ป่วยทุกท่านที่เป็นเสมือนอาจารย์ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฐ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1

คำถามของการวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

สมมติฐานของการวิจัย..... 2

กรอบแนวคิดการวิจัย..... .3

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 4

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 5

บทนำ.....5

ระบาดวิทยา.....7

หน้า

จุลชีววิทยา..... 7
พยาธิกำเนิด..... 8
โครงสร้างทางพันธุกรรมและสายพันธุ์ของ *C. difficile*..... 9
ความเสี่ยงในการก่อโรค CDI..... 13
อาการและอาการแสดง CDI..... 14
การเก็บอุจจาระเพื่อส่งตรวจ *C. difficile*..... 15
การตรวจวินิจฉัย CDI..... 15
การรักษา CDI..... 24
การป้องกันและควบคุม CDI..... 28

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย..... 29
รูปแบบการวิจัย..... 29
ระเบียบวิธีการวิจัย..... 29
การคำนวณประชากรตัวอย่าง..... 30
วิธีการเก็บตัวอย่าง..... 30
การสังเกตและการวัด..... 30
การเก็บรวบรวมข้อมูล..... 30
การดำเนินการวิจัย..... 31
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 33
ปัญหาทางจริยธรรม..... 33
อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข..... 34
การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน..... 34
งบประมาณ..... 34

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 36
ขั้นตอนการเก็บข้อมูลและทำการทดสอบ..... 36
ระบาดวิทยา..... 37
ความเสี่ยงในการก่อโรค CDI..... 40
ลักษณะทางคลินิก..... 44
ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ..... 46
ผลการทดสอบจำแนกตามวิธีการทดสอบแต่ละประเภท..... 47
การรักษา..... 49
ผลการรักษา..... 49

บทที่ 5 บทวิจารณ์..... 51
ระบาดวิทยา..... 51
โรคประจำตัวของผู้ป่วย CDI..... 54
ความเสี่ยงของการก่อโรค CDI..... 55
ลักษณะทางคลินิก..... 59
ผลการทดสอบจำแนกตามวิธีการทดสอบแต่ละประเภท..... 60
การทดสอบเพื่อวินิจฉัย CDI แบบ 2 ขั้นตอน..... 63
การรักษาและผลการรักษา..... 68
ข้อจำกัดของการศึกษานี้..... 68
ข้อได้เปรียบของการศึกษานี้..... 69
การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต..... 70
การประยุกต์ใช้ผลการศึกษาในเวชปฏิบัติ..... 70

รายการอ้างอิง..... 71

ภาคผนวก ก แบบฟอร์มที่ใช้ในการเก็บข้อมูลผู้ป่วย..... 85

ภาคผนวก ข เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย..... 92

ภาคผนวก ค ใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย..... 99

ภาคผนวก ง แสดงผลการทดสอบ..... 102

ภาคผนวก จ แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ..... 107

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 109

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงผล sensitivity และ specificity ของผลการทดสอบแต่ละชนิด..... 22

ตารางที่ 2 แสดงตารางเปรียบเทียบการทดสอบ 5 ชนิด เวลาที่ใช้ในการทดสอบ sensitivity และ specificity..... 23

ตารางที่ 3 แสดงการแบ่งความรุนแรงของ CDI และแนวทางการรักษา..... 27

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรตัวอย่างจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI ตามผลการตรวจ polymerase chain reaction (PCR)..... 38

ตารางที่ 5 แสดงอาการสำคัญและ/หรือโรคที่นำผู้ป่วยมาโรงพยาบาลจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI.....40

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนครั้งของการสั่งใช้ยาปฏิชีวนะจำแนกตามประเภทของยาปฏิชีวนะและผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI.....42

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนครั้งของการสั่งใช้ยาเคมีบำบัดจำแนกตามประเภทของยาเคมีบำบัดและผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI.....43

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนครั้งของการสั่งใช้ยาลดกรดจำแนกตามประเภทของยาลดกรดและและผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI..... 44

ตารางที่ 9 แสดงอาการและอาการแสดงจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI.....45

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI..... 47

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบ GDH EIA, cytotoxins A/B ELFA และ culture โดยเปรียบเทียบกับ polymerase chain reaction (PCR)..... 48

ตารางที่ 12 แสดงความรุนแรงของ CDI และการรักษา..... 49

ตารางที่ 13 แสดงความรุนแรงของ CDI การรักษาและผลการรักษา..... 50

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบ PCR, culture, GDH EIA และปริมาณเม็ดเลือดขาวในอุจจาระ (stool WBC) แบ่งตามผลการทดสอบ cytotoxins A/B ELFA..... 62

หน้า

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดสอบ GDH EIA, cytotoxins A/B ELFA, culture, PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes (raw data)…… ……102

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของ toxin ในการทำลายเซลล์..... 9

ภาพที่ 2 (A) แสดงตำแหน่ง genes บน pathogenic locus (PaLoc) และการแสดงออกของ gene เกี่ยวข้องกับการสร้าง toxin

(B) แสดงโครงสร้าง genes ควบคุมการสร้าง toxin A (*tcdA*) และ toxin B (*tcdB*)..... 10

ภาพที่ 3 แสดง genetic fingerprints ของ partial *cdtB* gene 510 bp ซึ่งพบใน strain B1/NAP1/027..... 12

ภาพที่ 4 แสดง genetic fingerprints ของ partial *tcdC* gene ของ binary toxins..... 13

ภาพที่ 5 สุนัขที่ได้รับการสอนให้ดมกลิ่นของ *C. difficile*.....16

ภาพที่ 6 แสดงหลักการของการทดสอบ PCR.....19

ภาพที่ 7 แสดงหลักการของการทดสอบ GDH EIA..... 21

ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนการทดสอบอุจจาระเพื่อวินิจฉัย CDI ด้วยวิธี 2 ขั้นตอน.....24

ภาพที่ 9 ขั้นตอนการทำการทดสอบอุจจาระ..... 37

ภาพที่ 10 แสดงการทดสอบ 2 ขั้นตอนและผลการทดสอบ.....64

ภาพที่ 11 แสดงผลการทดสอบ VIDAS® cytotoxins A/B..... 106

ภาพที่ 12 (A) แสดงผลการทดสอบ PCR for *tcdA* gene

(B) แสดงผลการทดสอบ PCR for *tcdB* gene..... 106

ภาพที่ 13 แสดง microwells ที่ใช้ในการทดสอบ GDH EIA..... 107

ภาพที่ 14 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ VIDAS® cytotoxins A/B..... 107

ภาพที่ 15 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ.....108

ภาพที่ 16 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ PCR 108

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AAD	Antibiotic-associated diarrhea
B. difficilis	*Bacillus difficilis*
BL/BI	beta-lactam/beta-lactamase inhibitor
C. difficile	*Clostridium difficile*
CA	Carcinoma
CCFA	Cycloserine-cefoxitin-fructose agar
CCNA	Cell cytotoxic neutralization assay
CDI	*Clostridium difficile* infection
CI	Confidence interval
EIA	Enzyme immunoassay
ELFA	Enzyme-linked fluorescent assay
ELISAs	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESRD	End-stage renal disease
GDH	Glutamate dehydrogenase
HMI	Humoral immune response
HPF	High power field
H2RAs	Histamine 2 receptor antagonists
Ig	Immunoglobulin
IQR	Interquartile range
IV	Intravenous
kB	กิโลเบส
NNH	Number needed to harm

NPV	Negative predictive value
OR	Odds ratio
PaLoc	Pathogenic locus
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Picogram
p.o.	Per oral
PPIs	Proton-pump inhibitors
PPV	Positive predictive value
q.i.d.	Qua´ter in di´e (four times a day)
SOT	Solid organ transplant
spp.	Species
t.i.d.	Ter in di´e (three times a day)
US-FDA	The United States-Food and Drug Administration
µL	Microliter

บทที่ 1

บทนำ

(INTRODUCTION)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (background and rationale)

ในปัจจุบันการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล (*Clostridium difficile* infection, CDI) เป็นโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่พบได้บ่อย ทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก[1-4] แพทย์ควรจะคำนึงถึงเสมอในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและมีภาวะถ่ายเหลว การวินิจฉัยที่ล่าช้าอาจส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญ ซึ่งมีความรุนแรงสูง ได้แก่ pseudomembranous colitis หรือ toxic megacolon เป็นต้น จึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องมีการวินิจฉัย CDI อย่างถูกต้อง รวดเร็ว เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เหมาะสมอย่างทันท่วงที และเป็นการป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้[3, 5]

คำถามของการวิจัย (research questions)

1. **คำถามหลัก** (primary research question)

เพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ของการคัดกรอง CDI ด้วยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (enzyme immunoassay for glutamate dehydrogenase, GDH EIA) ในอุจจาระ ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่เข้ารับการรักษาภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และสงสัยว่าจะมี CDI โดยเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วย polymerase chain reaction สำหรับยีนของ toxins A และ B (PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes)

2. **คำถามรอง** (secondary research questions)

2.1. เพื่อวิเคราะห์ความจำเพาะ (specificity) ของการคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA และ cytotoxins A/B enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) ในอุจจาระของผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมี CDI โดยเปรียบเทียบกับการทดสอบอุจจาระด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

2.2. เพื่อวิเคราะห์ negative predictive value ของการคัดกรองโรคท้องร่วงจาก *C. difficile* ด้วย GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในอุจจาระของผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมี CDI โดยเปรียบเทียบกับการทดสอบอุจจาระด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

2.3. เพื่อวิเคราะห์ positive predictive value ของการคัดกรองโรคท้องร่วงจาก *C. difficile* ด้วย GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในอุจจาระของผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมี CDI โดยเปรียบเทียบกับการทดสอบอุจจาระด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

2.4. เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางระบาดวิทยา อาการและอาการแสดง รวมถึงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการระหว่าง CDI และโรคท้องร่วงจากสาเหตุอื่นๆ

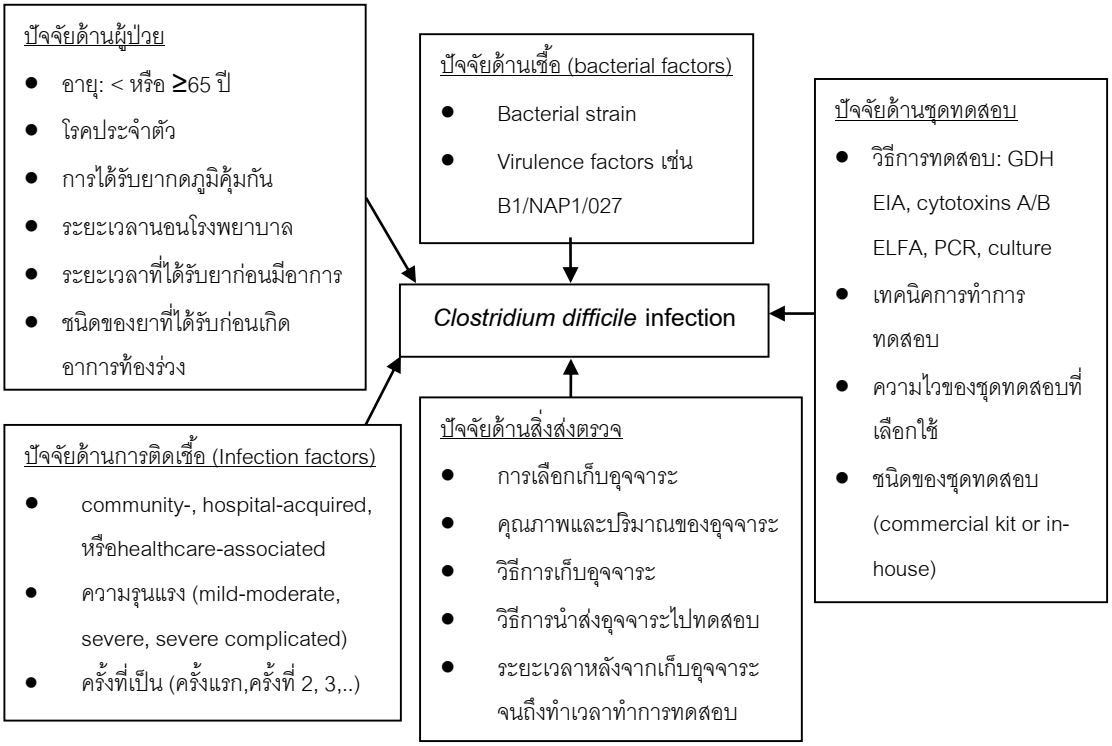
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objectives)

1. เพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ของการคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในอุจจาระ โดยเปรียบเทียบกับการทดสอบอุจจาระด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในอุจจาระ โดยเปรียบเทียบกับการทดสอบอุจจาระด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

สมมติฐานของการวิจัย (hypothesis)

การคัดกรอง CDI ด้วยการทดสอบอุจจาระด้วย GDH EIA ในอุจจาระ มีความไวสูงกว่าร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับการวินิจฉัยด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

กรอบแนวคิดการวิจัย (conceptual framework)



การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (operational definitions)

1. Definite CDI[26] ประกอบด้วยทั้ง 2 ข้อ ดังต่อไปนี้
   1.1. อาการถ่ายเหลวมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ครั้งภายในเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 24 ชั่วโมงติดต่อกัน
   1.2. ผลการตรวจอุจจาระพบ toxin ของ *C. difficile* ด้วยวิธี PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes
2. Suspected CDI[26] หมายถึง ผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ครั้งภายในเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 24 ชั่วโมงติดต่อกัน และเคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหรือยาเคมีบำบัดที่มีรายงานว่าสามารถก่อให้เกิด CDI ได้ในช่วงเวลาไม่มากกว่า 3 เดือนและไม่น้อยกว่า 3 วันก่อนเกิดอาการ
3. ความรุนแรงของโรค[26]
   3.1. Mild or moderate จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือด ≤15,000 เซลล์/ไมโครลิตร (μL)

	และค่า serum creatinine <1.5 เท่าของค่าดั้งเดิม
3.2. Severe	จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือด >15,000 เซลล์/ไมโครลิตร (µL)
	และค่า serum creatinine ≥1.5 เท่าของค่าดั้งเดิม
3.3. Severe, complicated	Hypotension, shock, ileus หรือ megacolon

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (expected benefit and application)

1. การวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ของการคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA ในอุจจาระ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้จริงสำหรับผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่เข้ารับการรักษาภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ต่อไป
2. เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางระบาดวิทยา อาการและอาการแสดง รวมถึงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการระหว่าง CDI และโรคท้องร่วงจากสาเหตุอื่นๆ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

(review of related literature)

บทนำ

Clostridium difficile เป็น anaerobic Gram-positive, spore-forming, toxin-producing bacillus ในปี ค.ศ. 1935 Hall และ O'Toole ได้มีรายงานถึงการค้นพบเชื้อชนิดนี้ครั้งแรก โดยรายงานว่าเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของเด็กแรกเกิดโดยไม่ก่อโรค และตั้งชื่อเชื้อชนิดนี้ *Bacillus difficilis* อันเนื่องมาจากเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงยาก โดยในขณะนั้น ได้ตั้งสมมติฐานว่าเชื้อ *B. difficilis* toxin อาจจะมีความสำคัญต่อการเกิดอาการท้องเสีย การตรวจพบเลือดในอุจจาระ และอาการชักในเด็กแรกเกิด โดยยังไม่ทราบความสำคัญของการก่อโรคโดยเชื้อชนิดนี้ในผู้ใหญ่[6, 7]

ลักษณะ pseudomembranous ในลำไส้ เป็นโรคที่ Finney รายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1893 ซึ่งตรวจพบจากการตรวจศพในผู้ป่วยรายหนึ่งที่มีอาการถ่ายเหลวก่อนเสียชีวิต โดยยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด รายงานในช่วงนั้นยังเข้าใจว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงในลำไส้ชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับการผ่าตัดช่องท้อง[6]

ในช่วงปี ค.ศ. 1950 ได้มีการเสนอรายงานความเป็นไปได้ในความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด pseudomembranous colitis และการใช้ยาปฏิชีวนะ ต่อมาในปี ค.ศ. 1956 Newman ได้รายงานการรวบรวมและทบทวนข้อมูลจากผู้ป่วยจำนวนหนึ่ง เพื่อสนับสนุนทฤษฎีว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด pseudomembranous colitis[8, 9]

จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1977 Larson และคณะได้ทำการศึกษาเพื่อหาสาเหตุของ pseudomembranous colitis ในอุจจาระของผู้ป่วยเด็กหญิงคนหนึ่ง และพบ toxinในช่วงแรกของอาการของโรค (acute illness) และหายไปในช่วงหลัง (convalescence) ซึ่งจากการศึกษาต่อเนื่อง

พบว่า toxin นี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือ เป็นพิษต่อเซลล์ (toxic cytopathic effect) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พบในอุจจาระของผู้ป่วย pseudomembranous colitis อีก 5 ราย แต่ไม่พบในอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวจากสาเหตุอื่นอีก 6 ราย จึงสามารถอธิบายได้ว่า pseudomembranous colitis เกิดจาก toxin เป็นตัวก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามในรายงานของ Larson ก็ยังไม่พบเชื้อที่เป็นสาเหตุของ toxin[10]

ในปีเดียวกัน Bartlett และคณะ ได้ทำการทดลองโดยการให้ยาปฏิชีวนะในหนูเพื่อก่อให้เกิดโรคท้องร่วง (clindamycin-associated colitis) และพบ toxin-producing strain of *Clostridium* ในอุจจาระของหนูที่ป่วย จึงสรุปว่า clindamycin-resistant, toxin-producing strain of *Clostridium* เป็นสาเหตุของ clindamycin-associated colitis[11] และเพื่อสนับสนุนสมมติฐานว่าการเติบโตอย่างผิดปกติ (overgrowth) ของ *Clostridium* ในลำไส้แทนเชื้อประจำถิ่น (normal flora) อาจเป็นสาเหตุของ clindamycin-associated pseudomembranous colitis ในอีก 3 เดือนถัดมา Bartlett และคณะก็ได้รายงานการนำอุจจาระจากผู้ป่วยไปฉีดในหนู (intracaecal) เพื่อก่อให้เกิดโรคและเพาะเชื้อจากอุจจาระของหนูที่ป่วย พบว่า ในอุจจาระมีคุณสมบัติของ toxin ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ร่วมกับเพาะเชื้อพบ clostridia strains จึงสรุปได้ว่าการที่ toxin-producing clostridia ดื้อต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะทั่วไป ทำให้เชื้อนี้เติบโตอย่างมากกว่าปกติในลำไส้ของผู้ป่วยที่ได้รับยาและก่อให้เกิด pseudomembranous colitis นอกจากนี้ ยังได้ทำการจัดกลุ่มของเชื้อชนิดนี้ใหม่และเรียกชื่อว่า *Clostridium difficile*[12] และเรียกภาวะถ่ายเหลวจาก *C. difficile* ว่า *C. difficile*-associated diarrhea หรือ *C. difficile* infection (CDI)

ภาวะถ่ายเหลวที่มีความเกี่ยวข้องกับการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic-associated diarrhea, AAD) หมายถึง ภาวะท้องเสียที่ไม่สามารถอธิบายได้ด้วยสาเหตุอื่น ซึ่งเกิดขึ้นโดยมีความเกี่ยวข้องกับการใช้ยาปฏิชีวนะด้วยสาเหตุใดๆ ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ไม่ว่าจะเป็น osmotic diarrhea, secretory diarrhea การกระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยยาปฏิชีวนะ (stimulation of intestinal motility through the motilin-like effect) หรือการติดเชื้อบางชนิด เช่น *C. difficile* (CDI), enterotoxin-producing strains of *Clostridium perfringens* type A, *Staphylococcus aureus, Klebsiella*

oxytoca และ *Salmonella* species เป็นต้น [1, 13] โดยรายงานการเกิด AAD แตกต่างกันไปในแต่ละสถานที่และชนิดของยาปฏิชีวนะ ทั่วๆไปอุบัติการณ์จะอยู่ในช่วงร้อยละ 2-5[13-15]

ระบาดวิทยา (epidemiology)

อย่างที่ได้กล่าวไว้แล้วว่า AAD อาจจะเกิดจากสาเหตุอื่นๆได้อีกหลายอย่างนอกเหนือจาก CDI แต่อย่างไรก็ตาม CDI ก็จัดเป็นสาเหตุที่สำคัญของ AAD แต่เดิมข้อมูลที่ Bartlett ได้รวมรวมไว้ในปีค.ศ. 2002 รายงานความชุกของ CDI อยู่ที่ร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วย AAD[1] ในปัจจุบันรายงานความชุกของการเกิด CDI ก็ยังคงไม่ลดลงหรือเพิ่มขึ้นอีกด้วย ข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริกาในปีค.ศ.2008 รายงานความชุกที่เพิ่มขึ้น คิดเป็น 13.1 รายต่อผู้ป่วยใน 1000 ราย คิดเป็นร้อยละ 15-25 ของ AAD[3, 4]

เช่นเดียวกันกับประเทศอื่นๆในแถบยุโรป CDI เป็นปัญหาที่พบเพิ่มขึ้น ข้อมูลจากประเทศอิตาลีรายงานความชุกของการเกิด CDI โดยเก็บข้อมูลในช่วงปีค.ศ.2006-2011 พบว่าความชุกของการเกิด CDI เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.9 เป็นร้อยละ 11.2 หรือคิดเป็น 0.3 รายในปีค.ศ. 2006 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 รายต่อ 10,000 วันของการรับผู้ป่วยในในปีค.ศ.2011 ทั้งนี้อาศัยการวินิจฉัยจากการตรวจ enzyme immunoassays (EIA) สำหรับ cytotoxins A/B[16]

ส่วนในประเทศไทย ข้อมูลจากโรงพยาบาลศิริราช เก็บในช่วงปีค.ศ.2008 พบว่า ความชุกของโรคท้องร่วงที่เกิดจาก *C. difficile* สูงถึงร้อยละ 12.3[2]

จุลชีววิทยา (microbiology)

C. difficile หรือ difficult clostridium มีความหมายตรงตามชื่อ คือ *Clostridium* ที่เพาะเลี้ยงยากด้วยวิธีทั่วไป (conventional method) และโดยแท้จริงแล้ว *C. difficile* เป็นส่วนหนึ่งของเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของมนุษย์ โดยสัดส่วนอยู่ที่ร้อยละ 2-10 ซึ่งปริมาณของเชื้อ *C. difficile* จะถูกควบคุมโดยเชื้อประจำถิ่นอื่นๆให้อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสมและไม่ก่อโรค[17] นอกจากจะเพาะเลี้ยงยากแล้ว *C. difficile* ยังมีคุณสมบัติพิเศษอีกอย่าง ได้แก่ การที่สามารถอาศัยอยู่ภายนอกลำไส้ได้นานในรูปแบบของ spore ซึ่งมีความคงทนต่อความร้อน กรด และเป็นรูปแบบสำคัญที่จะส่งผลต่อการติดต่อจากคนสู่คน กล่าวคือ เมื่อผู้ป่วยรับประทาน spore ของ *C. difficile* spore จะไม่ถูกทำลายโดยความ

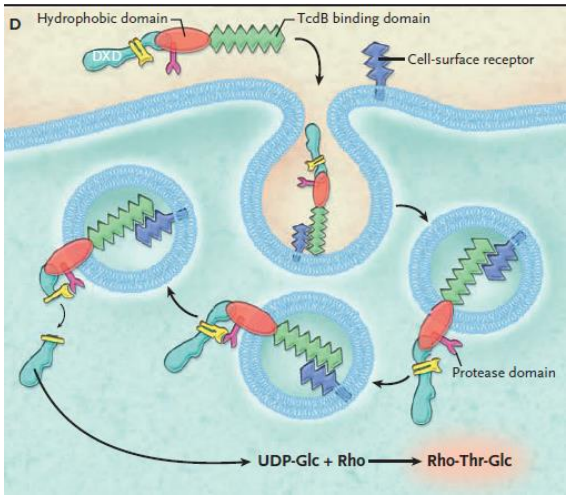
เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และจะสามารถผ่านไปถึงลำไส้เล็กและเปลี่ยนรูปแบบเป็น vegetative อีกครั้งเมื่อสัมผัสกับน้ำดี[18] ในที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม กล่าวคือ มีการลดลงของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ร่วมกับ มี toxigenic strain *C. difficile* ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ก็จะมีการหลั่ง toxin ทำให้เกิดการทำลายเยื่อบุลำไส้และก่อให้เกิด CDI

พยาธิกำเนิด (pathogenesis)

ดังที่กล่าวแล้วว่า สิ่งสำคัญในการก่อโรคของ *C. difficile* คือ toxin สายพันธุ์ก่อโรคของ *C. difficile* จึงต้องมีการสร้าง toxin โดยที่ปริมาณ และ ชนิดของ toxin มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ CDI สำหรับ toxins ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ toxin A หรือ enterotoxin และ toxin B หรือ cytotoxin ซึ่งมีความสำคัญในการก่อโรคทั้ง 2 ชนิด กล่าวคือ ในสิ่งมีชีวิต (in vivo) toxin A จะส่งผลให้มีการทำลายเยื่อบุลำไส้ ก่อให้เกิดการอักเสบ กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils และทำให้มีการหลั่งสารน้ำออกจากลำไส้มากขึ้น[19] ส่วน toxin B ซึ่งมีความแรงมากกว่า toxin A ประมาณ 10 เท่าก็มีฤทธิ์ทั้งในด้าน enterotoxin ร่วมกับ cytotoxin และมีความสำคัญในการก่อให้เกิด CDI ที่มีความรุนแรงสูงกว่า (more virulence) นอกจากนี้ toxin ทั้ง 2 ชนิดยังมีฤทธิ์ในการกระตุ้น proinflammatory cytokines ก่อให้เกิดการอักเสบที่มากขึ้นอีกด้วย [20, 21]

การทำงานของ toxin A และ toxin B จะทำลายระบบ glycosylation (การเติมโมเลกุลน้ำตาลให้เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน) ผ่านทางวิธีการ catalase ทำให้ Rho-GTPases ซึ่งเป็น regulatory proteins ไม่สามารถทำงานได้ จึงเกิดการเสียโครงสร้างของเซลล์ และตายในที่สุด (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของ toxins A และ B ของ *Clostridium difficile* ในการทำลายเซลล์[22]

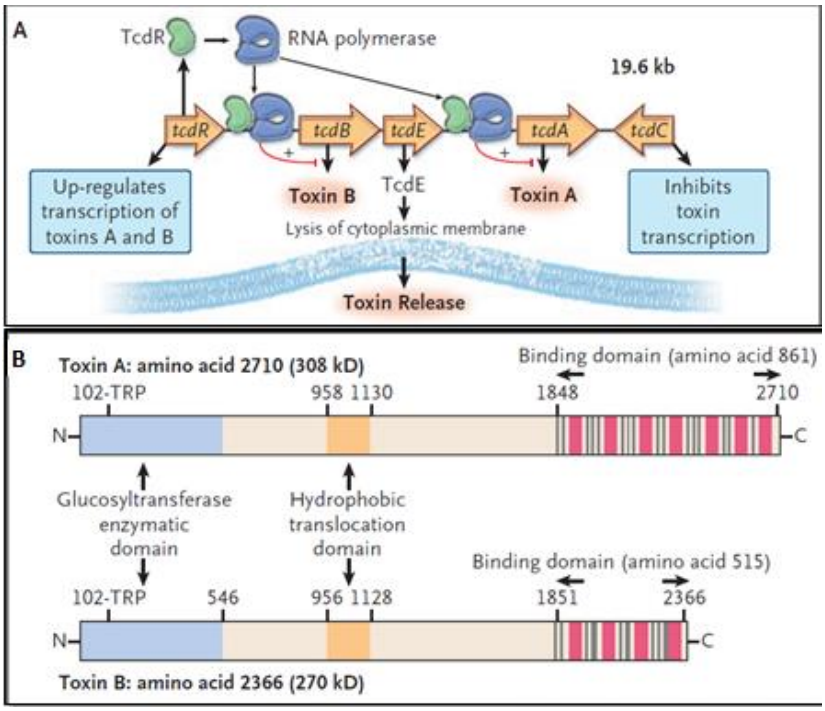


โครงสร้างทางพันธุกรรมและสายพันธุ์ของ *C. difficile*

ลักษณะปกติดั้งเดิม (wild type) ของ toxigenic strain-*C. difficile* คือ toxin A บวกและ toxin B บวก เป็นลักษณะที่พบมากที่สุด นอกจากนี้บาง strain ยังมีลักษณะ toxin A บวก หรือ toxin B บวก เพียงอย่างเดียว ขึ้นกับ genome ของ strain นั้นๆ ตำแหน่งที่ควบคุมการแสดงออกของ toxin และ neighboring regulatory genes ต่างๆ เรียกว่า the pathogenic locus (PaLoc) ประกอบด้วย genes ที่สำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ *tcdA* (toxin A), *tcdB* (toxin B) และ 3 regulatory genes (*tcdC, tcdE* และ *tcdR*)[20, 22, 23] ตำแหน่งของ genes บน PaLoc และโครงสร้างของ genes ควบคุมการสร้าง toxin A (*tcdA*) และ toxin B (*tcdB)* แสดงดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 (A) แสดงตำแหน่งยีน (genes) บน pathogenic locus (PaLoc) และการแสดงออกของ genes เกี่ยวข้องกับการสร้าง toxins

(B) แสดงโครงสร้างของยีน (genes) ควบคุมการสร้าง toxin A (*tcdA*) และ toxin B (*tcdB*)[22]



แต่เดิมในอดีต เป็นที่เข้าใจกันว่า *C. difficile* strain toxin A ลบ แต่ toxin B บวก (A-B+) มีเพียง serogroup F strains ที่พบเป็น colonization ในเด็กทารกเท่านั้น โดยไม่พบว่าก่อโรค แต่ในปี ค.ศ. 1998 Alfa และคณะได้รายงานถึงการระบาดของ CDI ในโรงพยาบาลที่ประเทศแคนาดา ซึ่งผลการตรวจ ELISA สำหรับ cytotoxin A เป็นลบ เมื่อศึกษาถึงระดับ genes จึงพบว่าเป็น toxigenic strain *C. difficile* ชนิด toxin A ลบ โดยส่วนใหญ่จะมี deletion 1.8 กิโลเบส (kb) ที่ตำแหน่ง carboxy repetitive oligopeptide (CROP region) ของ *tcdA* gene ใน PaLoc ซึ่งจัดเป็นนกลุ่ม strain F แบบเดียวกับที่พบเป็นพาหะในเด็กแรกเกิด[24] นอกจาก strain F แล้ว ยังพบ strain A-B+ ที่มี deletion 5.6 kb ที่ *tcdA* gene ซึ่งพบว่ามีการสร้าง toxin ที่มีฤทธิ์ต่อลำไส้ (enteropathogenicity) แตกต่างไปจาก toxin A และมีความรุนแรงสูงกว่า toxin B แต่มีลักษณะคล้ายกับ *Clostridium sordellii* lethal toxin แทน[25] ต่อมาภายหลังก็มีรายงาน strain A-B+ เป็นระยะๆ จากประเทศต่างๆ โดยในปัจจุบันอุบัติการณ์

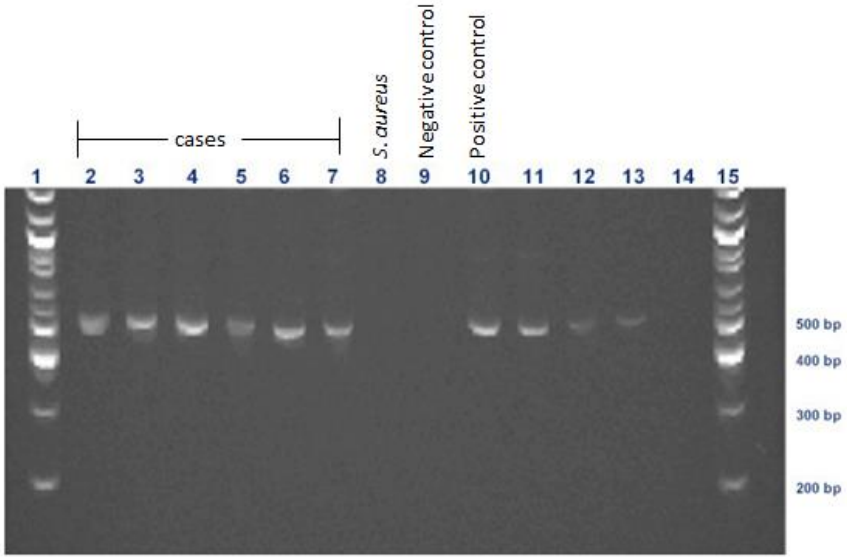
ของ strain A-B+ ในประเทศสหรัฐอเมริกาอยู่ที่ร้อยละ 1-2[26] และประเทศทางแถบยุโรป น้อยกว่าร้อยละ 5 แต่รายงานจากประเทศญี่ปุ่น ประเทศอาร์เจนตินาและ ประเทศอิสราเอล ความชุกสูงถึงร้อยละมากกว่าร้อยละ 30[21]

นอกจากนี้ยังมีการกล่าวถึง *C. difficile* strain toxin A บวก แต่ toxin B ลบ (A+B-) ซึ่งในปัจจุบันยังเป็นที่เข้าใจกันว่า toxin B เป็น key virulence factor ของ *C. difficile*[23] แต่เริ่มมีรายงานถึง strain A+B- ในหลอดทดลองพบว่า เมื่อไม่มี toxin B, toxin A ก็จะสามารถแสดง virulence ที่มากขึ้นกว่าเดิมได้อย่างน้อย 3 เท่า โดยออกฤทธิ์ทั้ง enterotoxin และ cytotoxin[27] และเมื่อทำการทดลองในหนู hamster ก็พบว่า strain A+B- ก็อาจจะก่อโรคได้เช่นกัน[28] อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบมีรายงานของ strain A+B- ที่ก่อให้เกิดโรคในคน[27]

ในช่วงหลังปีค.ศ. 2000 มีรายงานการระบาดของ CDI และพบว่านอกเหนือจากอัตราการติดเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นแล้ว อัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนและอันตรายจนถึงแก่ชีวิตก็ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยเริ่มจากทางฝั่งสหรัฐอเมริกา แคนาดา และต่อเนื่องไปทางฝั่งอังกฤษและทั่วทวีปยุโรป[29-31] นำไปสู่การศึกษาในระดับ genes และพบว่ามีการระบาดของสายพันธุ์ (strain) ที่มีความรุนแรงสูง (hypervirulence) ของ *C. difficile* ส่งผลให้สายพันธุ์นี้เริ่มเป็นที่รู้จัก และกล่าวถึงมากขึ้น ได้แก่ สายพันธุ์ restriction endonuclease analysis (REA) group BI, North American pulsed-field type 1 (NAP1), และ PCR ribotype 027 (BI/NAP1/027) (ภาพที่ 3 แสดง genetic fingerprints ของ partial *cdtB* gene 510 bp ซึ่งพบใน strain B1/NAP1/027[29]) ซึ่งมีลักษณะสำคัญคือ เป็น toxinotype III (strain อื่นๆ ทั่วไปมักเป็น toxinotype 0) ทำให้มีความแตกต่าง คือ มีการขาดหายของ *tcdC* gene บางส่วน (18 base-pair deletion) ใน PaLoc หน้าที่ของ *tcdC* gene คือ ทำให้เกิด downregulation ของการสร้าง toxins A และ B เป็นผลให้มีการสร้าง toxin A และ B ในปริมาณที่มากขึ้น 16 เท่าและ 23 เท่า ตามลำดับ[32-34] ส่งผลให้เกิดการทำลายเยื่อบุลำไส้มากขึ้นและมีการอักเสบในลำไส้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้สายพันธุ์นี้ยังสามารถสร้าง toxin อีกชนิดหนึ่ง เรียกว่า binary toxin ซึ่งมีลักษณะแบบเดียวกับ iotatoxin ของ *C. perfringens* และไม่อยู่ในกลุ่ม PaLoc เดียวกับ toxin A และ B คือ *cdtA*

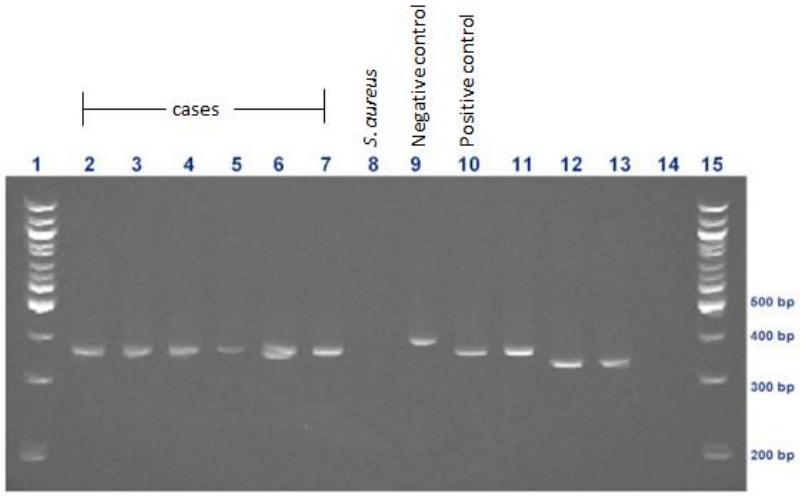
และ *cdtB* genes[29] Binary toxin นี้มีคุณสมบัติเป็น enterotoxic activity ในหลอดทดลอง (ภาพที่ 4 แสดง genetic fingerprints ของ partial *tcdC* gene ของ binary toxins[29]) พยาธิกำเนิดต่อโรค CDI ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัดนัก เชื่อว่าเป็นเพียง toxin ที่ออกฤทธิ์เสริมกันกับ toxin A และ toxin B เท่านั้น เนื่องจากมีข้อมูลว่า *C. difficile* ที่มี binary toxin แต่ไม่มี toxin A และ B ไม่สามารถก่อโรคได้ เป็นผลให้การติดเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ BI/NAP1/027 มีความรุนแรงมากกว่าการติดเชื้อสายพันธุ์อื่น โดยความเสี่ยงสำคัญในการเกิดการติดเชื้อ *C. difficile* สายพันธุ์ นี้ ได้แก่ การใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม fluoroquinolones เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ fluoroquinolones[22, 35]

ภาพที่ 3 แสดง genetic fingerprints ของ partial *cdtB* gene 510 bp ซึ่งพบใน strain B1/NAP1/027[29]



Pulsed-field gel electrophoresis: PCR amplification of partial *cdtB* gene

ภาพที่ 4 แสดง genetic fingerprints ของ partial *tcdC* gene ของ binary toxins[29]



Pulsed-field gel electrophoresis: PCR amplification of partial partial deletion of the *tcdC* gene

นอกเหนือจากสายพันธุ์ B1/NAP1/027 แล้ว ยังมีการกล่าวถึง hypervirulence strain อีกสายพันธุ์หนึ่ง ได้แก่ ribotype 078 โดยรายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่พบมากในกลุ่มคนอายุน้อยและมีการติดเชื้อ CDI มาจากนอกโรงพยาบาล (community-onset)[36]

ความเสี่ยงในการก่อโรค CDI

โดยความเสี่ยงสำคัญของการก่อโรค คือ ผู้สูงอายุ ≥65 ปี การได้รับยาปฏิชีวนะ proton-pump inhibitors หรือยาเคมีบำบัดบางชนิด ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคมะเร็งโลหิต ผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่มีความเจ็บป่วยรุนแรง และผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน เป็นต้น[37-39]

ความเสี่ยงที่สำคัญที่สุดและเป็นที่รู้กันมานานต่อการเกิด CDI คือ การใช้ยาปฏิชีวนะ แต่แรกเริ่มที่ยังไม่มีความรู้ว่า pseudomembranous colitis เกิดได้จากการติดเชื้อ *C. difficile* ก็เป็นที่รู้กันแล้วว่า clindamycin มีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรค[11] ต่อมาก็มีรายงานของยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ ตามมา ได้แก่ cephalosporins, broad-spectrum penicillins, macrolides เป็นต้น ในปัจจุบันมีรายงานการใช้ fluoroquinolones มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด hypervirulence strain *C. difficile*[35]

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดและใช้เป็นระยะเวลานาน ก็เป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด CDI มากขึ้นเช่นกัน[40]

นอกเหนือจากความเสี่ยงจากภายนอกที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการกล่าวถึงความเสี่ยงจากภายใน (intrinsic risk) กล่าวคือ การสร้างภูมิคุ้มกันในการต้านโรค พบว่าผู้ที่มี *C. difficile* colonization และมีสร้างภูมิคุ้มกัน (immunoglobulin, Ig) ทั้งชนิด IgA คือภูมิคุ้มกันของเนื้อเยื่อ (mucosal antibodies) และ IgG ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งในเลือดและอุจจาระ จะมีโอกาสเกิดโรค และโอกสกลับเป็นโรคซ้ำน้อยกว่าผู้ที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน[41-43]

อาการและอาการแสดงของ CDI

อาการและอาการแสดงของ CDI แบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 short-term colonization, กลุ่มที่ 2 ภาวะถ่ายเหลวเฉียบพลัน ซึ่งแบ่งความรุนแรงได้หลายระดับ ตั้งแต่อาการน้อยหรือปานกลาง ซึ่งอาจจะหายได้เอง หรือมีเพียงอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ เป็นมูก หรือปนเลือด เมื่อความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น อาการทาง systemic ก็มักจะเพิ่มมากขึ้นตาม อาจจะมีอาการไข้ ปวดท้อง ตรวจเลือดพบเม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ ไตวายเฉียบพลันได้ หรือกลุ่มที่ 3 fulminant diarrhea มีความรุนแรงมากจนกระทั่งก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต ได้แก่ colonic perforation, transverse volvulus, pseudomembranous colitis, toxic megacolon เป็นต้น[18] สุดท้ายคือกลุ่มที่ 4 กลุ่มติดเชื้อซ้ำ (recurrent CDI) ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการติดเชื้อใหม่ (reinfection) หรือ เชื้อเดิม (relapse) พบได้ประมาณร้อยละ 20-30 โดยมีรายงานว่าความเสี่ยงในการเกิดโรคซ้ำ คือ การติดเชื้อ B1/NAP1/027 strain ผู้ป่วยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปี การได้รับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นซึ่งเป็นความเสี่ยงต่อการเกิด CDI ทั้งในช่วงรับการรักษาและหลังการรักษา และการไม่มี immunoglobulin ต่อ toxin A[18, 26, 42, 44, 45]

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *C. difficile* แบบรุนแรง (fulminant CDI) นั้นเพิ่มอัตราการตายถึง 2 เท่า[3, 37, 46, 47]

นอกจากอาการทางลำไส้และระบบทางเดินอาหารแล้ว ยังมีรายงานถึงอาการแสดงในระบบอื่นๆ (extraintestinal manifestations) ได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด ไม่ว่าจะเป็นจาก *C. difficile* เอง หรือจากแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้ การเกิดฝีหนองในอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ ม้าม (splenic abscess) ช่องคลอด (vaginal abscess) เยื่อหุ้มปอด (empyema thoracis) การติดเชื้อที่ผิวหนังหรือกระดูก (cellulitis, osteomyelitis หรือ thigh abscess) หรือ เกี่ยวข้องกับการเกิด reactive arthritis เป็นต้น[18, 48]

การเก็บอุจจาระเพื่อส่งตรวจ *C. difficile*

แนะนำให้เก็บอุจจาระส่วนที่เป็นน้ำ (watery, loose หรือ unformed stool) จากผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลว และหลังจากเก็บอุจจาระได้แล้ว ควรเก็บแล้วส่งตรวจทันทีหรือเก็บในอุณหภูมิ 4°ซ ระหว่างรอทำการส่งตรวจ เพื่อให้ได้ความไว และความจำเพาะสูงสุดในการวินิจฉัย CDI[26, 49, 50] เนื่องจาก toxin ไม่เสถียร ที่อุณหภูมิห้องจะสลายไปภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเก็บอุจจาระ เนื่องจากโดนทำลายด้วย proteases enzymes ที่สร้างจาก bacteria ในอุจจาระ[51] ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บอุจจาระได้ เช่น ผู้ป่วย ileus อาจพิจารณาใช้การเก็บสิ่งส่งตรวจจากรอบทวารหนัก (perirectal swab) เพื่อตรวจวินิจฉัยแทนได้[26, 49, 52] นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่า การเก็บอุจจาระส่งตรวจซ้ำมากกว่าหรือเท่ากับ 2 ครั้ง ในช่วง 7 วัน เพิ่มการวินิจฉัยได้เพียงน้อยกว่าร้อย 2 ของกลุ่มที่ผลครั้งแรกเป็นลบ จึงอาจจะไม่มีความคุ้มค่าในการที่จะส่งอุจจาระเพื่อทดสอบด้วยวิธีเดียวกับวิธีแรก ภายในช่วง 7 วัน[49, 53]

การตรวจวินิจฉัย CDI

ในปัจจุบันมีวิธีการทดสอบเพื่อวินิจฉัย CDI ที่เป็นมาตรฐาน ประกอบด้วย 2 ประเภท คือ การตรวจทางจุลชีววิทยา (microbiologic examination) และการตรวจโดยการส่องกล้องลำไส้ใหญ่ (endoscopic examination) ซึ่งอาจจะส่งตรวจหรือไม่ส่งตรวจทางพยาธิวิทยา (histologic examination) โดยลักษณะที่พบในช่วงแรกของ CDI เป็นแผ่นสีขาวเหลือง (raised, white และ yellowish plaques) ติดกระจายอยู่ทั่วไปบนลำไส้ใหญ่ แต่ก็อาจพบกระจายไปจนถึงลำไส้เล็กได้ มักจะ

พบมากบริเวณลำไส้ส่วน rectosigmoid เมื่อโรคดำเนินต่อไป plaques ก็จะรวมตัวกัน ลักษณะเหมือนเป็น pseudomembranous เป็นลักษณะเฉพาะ ที่เรียกว่า pseudomembranous colitis เมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อบริเวณ plaques มาตรวจก็จะพบลักษณะที่มีการอักเสบของเยื่อบุลำไส้เป็นหย่อม คล้ายภูเขาไฟ (volcano) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของเม็ดเลือดขาว neutrophils และเศษ fibrin (fibrinopurulent exudates and debris)[18, 41] แต่จากรายงานพบว่าความไวและความจำเพาะของการส่องกล้องนั้นอาจจะต่ำกว่าร้อยละ 50[49]

สำหรับการตรวจทางจุลชีววิทยามีอยู่ 5 วิธี ประกอบด้วย การตรวจเพาะเชื้อ (culture), cell cytotoxicity neutralization assay (CCNA) การตรวจหา cytotoxin การตรวจหา glutamate dehydrogenase common antigen และ การตรวจ nucleic acid amplification tests[49]

นอกจากนี้ยังมีผู้เสนอวิธีตรวจด้วยวิธีอื่นที่ยังไม่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐาน กล่าวคือ การใช้สุนัขดมกลิ่นของ *C. difficile* จากอุจจาระและผู้ป่วย โดยอาศัยความรู้ที่ว่าอุจจาระในผู้ป่วย CDI มักจะมีกลิ่นเฉพาะตัว (hoarse stable odor)[3] ร่วมกับการที่สุนัขมีความสามารถในการดมกลิ่นสูง พบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 83 และความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 98[54] ภาพสุนัขที่ได้รับการสอนให้ดมกลิ่นของ *C. difficile* แสดงดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 สุนัขที่ได้รับการสอนให้ดมกลิ่นของ *C. difficile*[54]

Cliff has been trained to sniff out the bacteria clostridium difficile

ปัจจุบัน การวินิจฉัย CDI ที่ใช้กันทั่วไป คือ การตรวจ cytotoxins A และ B ในอุจจาระ ด้วยวิธี enzyme immunoassay (EIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) หรือ immunochromatography ซึ่งมีข้อจำกัดในการส่งตรวจอย่างมาก แม้ว่าจะสามารถให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว (EIA และ ELISA ประมาณ 2 ชั่วโมง immunochromatography น้อยกว่า 1 ชั่วโมง) และมีความจำเพาะสูง (มากกว่าร้อยละ 85) แต่ก็มีความไวต่ำ เพียงร้อยละ 30–80 จะสามารถตรวจพบ toxin ได้จำเป็นต้องอาศัยปริมาณ toxin ที่มากกว่า 100-1,000 พิโคกรัม (picogram, pg) นอกจากนี้ชุดทดสอบบางประเภท ยังสามารถตรวจได้เพียง toxin A ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อกลุ่ม toxin A ลบ toxin B บวกได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นการทดสอบเพื่อคัดกรอง CDI แต่เหมาะสมสำหรับใช้เพื่อยืนยันว่าการตรวจพบเชื้อ *C. difficile* นั้นเป็นสาเหตุก่อโรคจริง มิใช่เป็นเพียง colonization ซึ่งชุดทดสอบที่ใช้ แนะนำให้ใช้ชุดตรวจทั้ง toxin A และ toxin B เนื่องจาก พบว่า strain ที่ก่อโรคอาจสร้างเพียง toxin A หรือ toxin B เพียงชนิดเดียว[3, 26, 49]

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี direct cell cytotoxicity neutralization assay (CCNA) เป็นการตรวจคุณสมบัติ cytopathic effect ของ toxigenic strain *C. difficile* (functional assay) โดยนำอุจจาระที่ต้องการตรวจมาทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่เตรียมไว้ และสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์ในช่วง 48 ชั่วโมง และแปลผลเป็นบวกเมื่อมีการแสดงลักษณะ rounding ของเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 ร่วมกับอาศัยหลักการของ neutralization ทำให้ลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้หายไปเมื่อใช้ *C. difficile* antitoxin ซึ่งมีความไวสูงขึ้นกว่าการตรวจ cytotoxins A/B เนื่องจากสามารถตรวจ toxin ในอุจจาระได้ แม้มีปริมาณน้อยเพียงน้อยกว่า 10 pg เท่านั้นและยังมีความจำเพาะสูง[49] แต่มีข้อจำกัดคือใช้เวลา 48-72 ชั่วโมงในการทดสอบและแปลผลรวมถึงจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการทำการทดสอบ ทำให้รายงานความไวของการตรวจชนิดนี้อาจจะต่ำถึงร้อยละ 60 และอาจจะสูงถึงร้อยละ 100 แปรผันตามปัจจัยต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นการทดสอบเพื่อคัดกรองเช่นกัน เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยการเพาะเชื้อ (culture) ซึ่งเดิมเคยถูกใช้เป็น gold standard ในการวินิจฉัย แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องการอาหารเพาะเลี้ยง (media) ที่มีการเตรียมเป็นพิเศษ ตัวอย่างเช่น

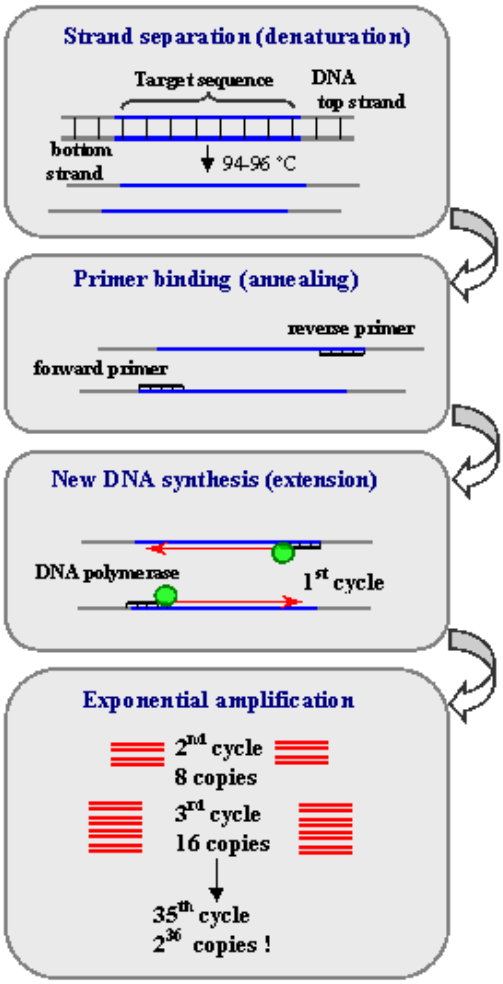
media ที่มีส่วนประกอบของ cycloserine, cefoxitin และ fructose (CCFA) หรือมีส่วนประกอบของ taurocholate หรือ lysozyme เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลานานในการรอผลการตรวจ และยังไม่สามารถบอกได้ว่าการเพาะเชื้อพบ *C. difficile* นั้น เป็นสาเหตุก่อโรคจริงหรือไม่ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น *C. difficile* จะสามารถเจริญเติบโตได้ทั้ง toxigenic และ non-toxigenic stain จำเป็นต้องอาศัยการตรวจต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็น toxin proteins หรือ toxin genes ยืนยันการสร้าง toxin เพื่อบอกว่าเป็นสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic strain) จึงนิยมใช้เพื่อเป็นการตรวจยืนยันในงานวิจัย มากกว่าใช้เพื่อตรวจคัดกรองโรคเพื่อการรักษาในผู้ป่วยจริง[26, 49]

สำหรับ cytotoxic culture ได้แก่การเพาะเชื้อก่อน เมื่อได้เชื้อแล้วต้องนำมา subculture อีกครั้งแล้วจึงนำมาทดสอบ cytotoxicity neutralization assay บน tissue culture อีกที เป็นการเพิ่ม sensitivity ได้ใกล้เคียงร้อยละ 100 และจัดเป็นหนึ่งใน gold standard test ในปัจจุบัน แต่ข้อจำกัดได้แก่ specificity ที่อาจจะต่ำกว่า CCNA เนื่องจากสามารถให้ผลเป็นบวกได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี colonization ของ *C. difficile* โดยเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุ หรือผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการทดสอบนานเกือบ 1 สัปดาห์[3, 55-58]

ส่วนการทดสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) สำหรับยีน (gene) ที่แสดงออกถึง toxin A และ toxin B ได้แก่ *tcdA และ tcdB* ตามลำดับ (ภาพที่ 6) เป็นการตรวจหายีนในสายพันธุ์ toxin-producing or toxigenic *C. difficile* จัดว่าเป็นการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูงที่สุดจนเรียกได้ว่าเป็นการทดสอบที่มีมาตรฐานสูงสุด (gold standard)[49] ในปัจจุบันองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาให้การรับรองชุดทดสอบ [the United States-Food and Drug Administration (US FDA)-approved kits] 4 รายการ ดังนี้ GeneOhm (BD), proGastro (Prodesse), GeneXpert (Cepheid) และ Illumigene (Meridian) *C. difficile* assays และยังสามารถให้ผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม การตรวจ PCR ก็ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ นอกเหนือจากค่าใช้จ่ายในการทดสอบที่สูงเกินกว่าจะนำมาใช้เพื่อการคัดกรอง (ประมาณ 1,500–2,000 บาทต่อ 1 การทดสอบ) กล่าวคือ ปัญหาในการแปลผลการทดสอบ ตัวอย่างเช่น เนื่องจากมีรายงาน colonization ของ toxigenic strain *C. difficile* ได้สูงถึงร้อยละ 50 หรือในผู้ป่วย CDI ที่ได้รับการรักษาแล้วยังสามารถมี

colonization ของ toxigenic strain *C. difficile* ต่อเนื่องได้อีกหลายสัปดาห์ จึงเป็นการยากในการแปลผล ว่าอาการถ่ายเหลวในแต่ละครั้งของผู้ป่วยนั้นๆ ครั้งใดเป็นโรคจริงและครั้งใดไม่เป็นโรคแต่เป็นเพียง colonization[49]

ภาพที่ 6. แสดงหลักการของการทดสอบ PCR



รูปภาพจาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml

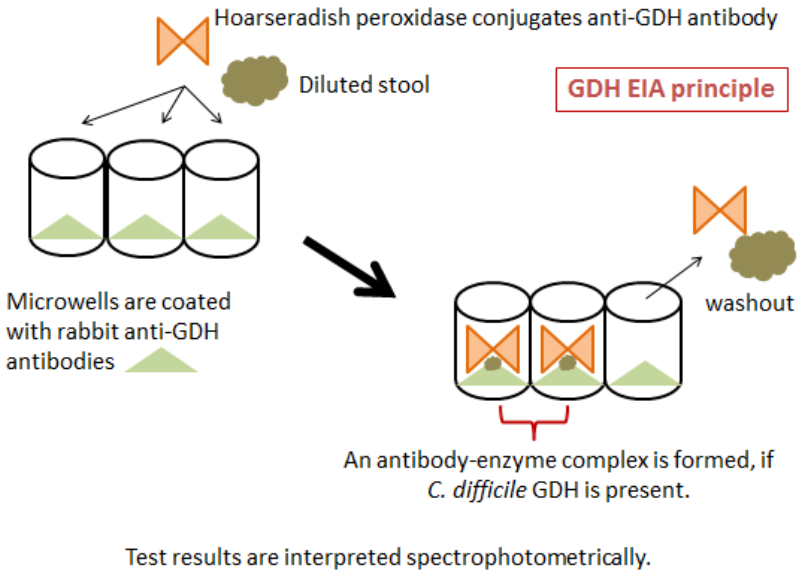
วิธีสุดท้าย คือการทดสอบ glutamate dehydrogenase (GDH) ซึ่งเป็น *Clostridium* common antigen ที่ดอกเตอร์ Hafiz รายงานไว้เมื่อปีค.ศ. 1974 โดยพบ antigen ที่เป็นส่วนประกอบของ capsule และ *C. difficile* ทั้ง toxigenic และ nontoxigenic strains สามารถสร้าง antigen ชนิดนี้ได้

เมื่อศึกษาต่อไปในระดับพันธุกรรม พบว่ามี gene sequence และมีการทำงานในแบบเดียวกับเอนไซด์ glutamate dehydrogenase อื่นๆ จึงตั้งชื่อว่าเป็น common antigen, glutamate dehydrogenase (GDH)[6, 59]

เนื่องจาก GDH เป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตออกมาในปริมาณมาก จึงมีการนำมาใช้เพื่อเป็นเป้าหมายในการทดสอบหาเชื้อ *C. difficile* แทนการตรวจหา toxin แต่อย่างที่ได้กล่าวไว้ GDH ถูกสร้างจาก *C. difficile* ทั้ง toxigenic และ nontoxigenic strains เป็นผลให้การใช้การทดสอบหา GDH เป็นเป้าหมายในการวินิจฉัย CDI มีข้อจำกัด จำเป็นต้องทำการตรวจต่อเนื่องเพื่อพิสูจน์ว่า *C. difficile* นั้นๆ เป็น toxigenic strain จริง[6, 59, 60]

ในช่วงแรกของการพัฒนาการทดสอบ GDH อาศัยหลักการของ latex agglutination หลังจากนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีอื่นๆตามมา ไม่ว่าจะเป็น lateral flow device with a colored latex conjugate and flowthrough tests with enzyme conjugate, ELISA หรือ EIA เป็นต้น ทั้งนี้ก็เพื่อพัฒนาความแม่นยำ และความรวดเร็วในการวินิจฉัย เนื่องจากถึงแม้ว่าจะมีความจำเพาะต่ำกว่าการทดสอบอื่นๆ แต่มีความไวสูง ราคาไม่แพง (ประมาณ 200 – 400 บาทต่อ 1 การทดสอบ) และให้ผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว ภายใน 15 นาทีถึง 2 ชั่วโมงขึ้นกับวิธีที่ใช้ในการทดสอบ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการคัดกรอง[1, 42, 43] ในปัจจุบันองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาให้การรับรองชุดทดสอบ (US FDA-approved kits) 3 รายการ ได้แก่ Premier™ *C. difficile* GDH (Meridian), ImmunoCard® *C. difficile* GDH (Meridian) และ C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE™ (TECHLAB) หลักการของการทดสอบ GDH EIA แสดงดังภาพที่ 7

ภาพที่ 7. แสดงหลักการของการทดสอบ GDH EIA



โดยข้อจำกัดคือเป็นการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองเท่านั้น ไม่เหมาะสมจะใช้เพื่อการวินิจฉัยว่ามีการก่อโรคจากเชื้อ *C. difficile* เนื่องจากเป็นการทดสอบเพียงว่ามีเชื้อ *C. difficile* อยู่จริงในอุจจาระ แต่ไม่ได้บอกว่ามีการสร้าง toxin เพื่อก่อโรคหรือไม่ จึงต้องนำอุจจาระที่ได้รับผลบวกจาก GDH EIA มาทดสอบ cytotoxins A/B EIA อีกครั้ง เพื่อบ่งบอกว่ามีการก่อโรคหรือไม่

Eastwood และคณะ ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบ cytotoxins A/B เพื่อวินิจฉัย CDI ที่มีขายในท้องตลาดทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ VIDAS® *C. difficile* Tox A/B (automated immunoassay), 5 EIA tests ได้แก่ Premier™ toxin A+B, GA *C. difficile* antigen, Ridascreen *C. difficile* toxin A/B, Toxin A/B II, Remel ProSpecT และ 3 membrane assay ได้แก่ Remel Xpect, Tox A/B Quik Chek, Premier™ Immunocard Stat toxin A and B และ *C. diff* Check-60 (GDH EIA) และ GeneOhm *C. difficile* (PCR for *tcdB* gene) พบว่า ชุดทดสอบ cytotoxins A/B มี sensitivity เฉลี่ยร้อยละ 82.8 (range, 66.7-91.7%) และ specificity ร้อยละ 95.4 (range, 90.9-98.8%)[61] แสดงดังตารางที่ 1 นอกจากนี้ Bartlett และคณะ ยังได้เสนอตารางเปรียบเทียบการทดสอบ 5

ชนิด ได้แก่ toxin culture, EIA toxin A or A/B, EIA GDH, EIA GDH and toxin A/B และ RT-PCR โดยรวบรวมจากรายงานต่างๆ และอนุมานว่า ร้อยละ 20-30 ของผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาลมี C. difficile colonization และร้อยละ 50 เป็น toxicgenic strain[60] แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1. แสดงผล sensitivity และ specificity ของผลการทดสอบแต่ละชนิด[61]

การทดสอบ	จำนวนที่ทำการทดสอบ			ผลทดสอบ	Sensitivity	Specificity
	บวก	ลบ	บวก/ลบ	Cytotoxin	(95%CI)	(95%CI)
Premier toxin A + B	99	9	0	บวก	91.7%	97.1%
	14	474	0	ลบ	(84.7-96.1)	(95.1-98.4)
GA *C. difficile* antigen	83	25	0	บวก	76.8%	90.9%
	44	444	0	ลบ	(67.7-84.4)	(88.0-93.3)
Ridascreen toxin A/B	72	36	0	บวก	66.7%	95.1%
	23	464	1	ลบ	(56.9-75.4)	(92.6-96.7)
Techlab toxin A/B II	98	10	0	บวก	90.7%	95.7%
	21	467	0	ลบ	(83.6-95.5)	(93.4-97.3)
Remel ProSpecT	97	11	0	บวก	89.8%	92.6%
	36	452	0	ลบ	(82.5-94.8)	(89.8-94.7)
Vidas *C. difficile* toxin A/B	97	2	9	บวก	89.8%	96.7%
	5	472	11	ลบ	(82.5-94.8)	(94.6-98.0)
Remel Xpect	84	17	7	บวก	77.8%	98.8%
	5	482	1	ลบ	(68.8-85.2)	(97.2-99.5)
Techlab Tox A/B Quik Chek	91	17	0	บวก	84.3%	98.6%
	5	481	1	ลบ	(76.0-90.6)	(96.9-99.4)
Premier Immunocard A + B	84	15	0	บวก	77.8%	92.8%
	4	453	0	ลบ	(68.8-85.2)	(90.1-94.9)
Techlab C. diff Chek-60	82	9	0	บวก	90.1%	92.9%
	33	434	0	ลบ	(81.6-95.1)	(90.1-95.0)
BD GeneOhm *C. difficile*	83	7	0	บวก	92.2%	94.0%
	22	436	0	ลบ	(84.1-96.6)	(91.3-95.9)

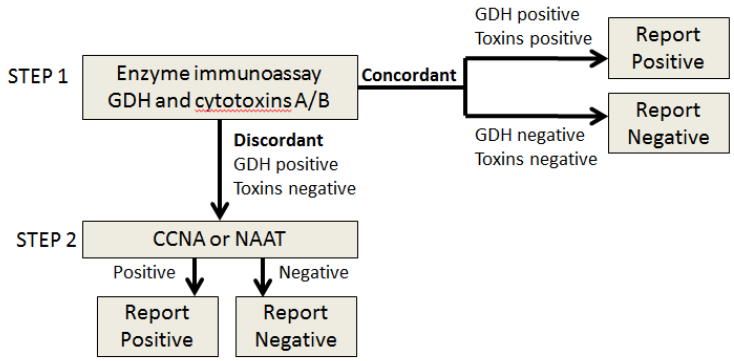
ตารางที่ 2. แสดงตารางเปรียบเทียบการทดสอบ 5 ชนิด เวลาที่ใช้ในการทดสอบ sensitivity และ specificity[60]

การทดสอบ	Substance	เวลา	Sensitiity	Specificity	หมายเหตุ
Toxin culture	Toxigenic *C. difficile*	3-5 วัน	>95%	80-90%	ใช้เวลาทดสอบนาน ทำได้ยาก
EIA toxin A or A/B	Toxin A or A/B	ชั่วโมง	75-80%	97-98%	มีผลลบลวง ได้ผลเร็ว ง่าย
EIA GDH	*C. difficile*	ชั่วโมง	95-100%	70-80%	ผลทดสอบยังไม่คงที่
EIA GDH and toxin A/B	*C. difficile* and toxin	ชั่วโมง	95-100%	97-98%	ผลทดสอบขึ้นกับการทดสอบ toxin
RT-PCR	Toxigenic *C. difficile*	ชั่วโมง	>98%	80-99%	ไม่มีความจำเพาะ ผลบวกรวมถึงพาหะด้วย

EIA, enzyme immunoassay; GDH, glutamate dehydrogenase; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

ล่าสุดได้มีผู้นำเสนอวิธีการวินิจฉัยโดยทำการทดสอบแบบหลายขั้นตอน (multistep approach) เพื่อเพิ่มทั้งความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัย CDI กล่าวคือ วิธี 2 ขั้นตอน (a two-step algorithm) ซึ่งจะใช้การตรวจ GDH EIA ในอุจจาระก่อนเพื่อการคัดกรองเชื้อ *C. difficile* เมื่อให้ผลการทดสอบเป็นบวก จึงจะทำการทดสอบ cytotoxins A/B เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อนั้นๆ เป็น toxigenic *C. difficile* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคจริง หรือในกรณีที่ cytotoxins A/B ให้ผลลบ ก็จะทำการยืนยันด้วยการตรวจ CCNA หรือ PCR for *gluD* gene (GDH gene) หรือ toxigenic culture แล้วจึงรายงานผลว่าพบเชื้อ *C. difficile* ด้วยวิธีดังกล่าวนี้มีผู้ทำการวิจัยพบว่า สามารถให้ผลการคัดกรองได้ถูกต้องสูงถึงร้อยละ 92 และให้ผลการทดสอบได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 4 ชั่วโมง[62] โดยที่การยืนยันการ CDI ด้วย PCR นั้นอาจใช้เป้าหมายอื่นนอกเหนือจาก *gluD* gene ได้แก่รายงานของ Sharp และคณะ ใช้วิธีทดสอบ 2 ขั้นตอนเช่นกัน โดยใช้ Xpert *C. difficile* PCR assay for *tcdB* พบว่าให้ความจำเพาะร้อยละ 99.6 และความไวร้อยละ 100[63] ขั้นตอนการทดสอบอุจจาระเพื่อวินิจฉัย CDI ด้วยวิธี 2 ขั้นตอน แสดงดังภาพที่ 10

ภาพที่ 8. แสดงขั้นตอนการทดสอบอุจจาระเพื่อวินิจฉัย CDI ด้วยวิธี 2 ขั้นตอน[49]



การรักษา CDI

Metronidazole และ vancomycin เป็นยาที่มีการใช้เพื่อรักษา CDI มาเป็นระยะเวลานาน ในปี ค.ศ. 1983 Teasley และคณะได้รายงานการใช้ metronidazole 250 มก. 4 ครั้งต่อวัน เปรียบเทียบกับการใช้ vancomycin 500 มก. 4 ครั้งต่อวัน รับประทานเป็นเวลา 10 วัน ในการรักษา CDI พบว่าอัตรา treatment failure และอัตราการกลับเป็นซ้ำไม่แตกต่างกัน ทั้งในกลุ่มที่มีเพียงอาการถ่ายเหลว และกลุ่ม pseudomembranous colitis[64] เช่นเดียวกับรายงานในช่วงปี ค.ศ. 1996 โดย Wenisch และคณะ ก็ยังสนับสนุนการใช้ metronidazole เป็นยาตัวแรก[65] แต่ในช่วงหลังศตวรรษที่ 20 เริ่มมีรายงานของความล้มเหลวในการรักษา CDI ด้วย metronidazole ในกรณีที่โรคมีความรุนแรงสูงและอาจจะมีอัตราการกลับเป็นซ้ำที่สูงกว่า vancomycin รวมทั้งการติดเชื้อ hypervirulence strain ก็มีรายงานการตอบสนองต่อการรักษาด้วย metronidazole น้อยกว่า vancomycin เช่นกัน[35] อย่างไรก็ตามการเลือกรักษาด้วย vancomycin ตั้งแต่แรก ก็อาจจะไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องผลของการรักษาในกลุ่มความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง (mild-to-moderate severity)[66] และยังเพิ่มความเสี่ยงของการเกิด vancomycin-resistant enterococci อีกด้วย[67] จึงแนะนำให้เลือกพิจารณาให้การรักษาโดยแบ่งตามความรุนแรงของโรค[22, 68, 69] โดยให้ใช้ metronidazole เป็นยาตัวแรกในการรักษา mild-to-moderate severity CDI

นอกเหนือจาก metronidazole และ vancomycin แล้วยังมีการรักษาด้วยยาชนิดอื่นๆ ได้แก่ bacitracin, fusidic acid, teicoplanin และ fidaxomicin ซึ่งผลการรักษาด้วย bacitracin อาจจะให้ผลการรักษาที่ไม่แตกต่างกับ vancomycin แต่ผลการตอบสนองต่อการรักษาในช่วงแรก คือหายจาก

อาการถ่ายเหลวช้ากว่า vancomycin จึงไม่เป็นที่นิยม fucidic acid ก็เช่นเดียวกัน ข้อมูลผลการรักษาอาจจะไม่แตกต่างกับ metronidazole และ vancomycin แต่มีแนวโน้มที่จะกำจัดเชื้อ *C. difficile* จากการเพาะเชื้อในอุจจาระได้น้อยกว่า ส่วน teicoplanin ข้อมูลทั้งผลการรักษาและการกำจัดเชื้อไม่ดีเท่า vancomycin มีเพียงอัตราการกลับเป็นซ้ำที่น้อยกว่าเท่านั้น[66]

Fidaxomicin เป็นยาชนิดที่ 3 ตามหลังจาก metronidazole และ vancomycin ที่ได้รับการรับรองจากองค์กรอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA approval) สำหรับการรักษา CDI ในปีค.ศ. 2011 เป็นยากลุ่ม macrocytic compound ที่ออกฤทธิ์ดีต่อ *C. difficile* โดยมีผลต่อ anaerobic gram-negative bacteria อื่นๆในลำไส้น้อยมาก มีการดูดซึมกลับเข้าร่างกายต่ำ และโอกาสในการทำให้เกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาน้อย มีข้อมูลสนับสนุนว่าการใช้ fidaxomicin 200 มก. 2 ครั้งต่อวัน ให้ผลของการรักษาที่ไม่ด้อยไปกว่าการใช้ vancomycin 125 มก. 4 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 10 วัน รวมการรักษา hypervirulence B1/NAP1/027 strain ด้วย แต่มีอัตราการป้องกันการกลับเป็นซ้ำที่ 25 วัน ต่ำลงถึงร้อยละ 15[47, 70] นอกจากนี้ยังมีข้อมูลการใช้ fidaxomicin ในผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะอื่นร่วมด้วยขณะได้รับการรักษา CDI พบว่าได้ผลการรักษาที่ดีกว่าและมีอัตราการกลับเป็นซ้ำที่ต่ำกว่า[71]

สำหรับการรักษาการติดเชื้อซ้ำนั้น สิ่งสำคัญอย่างแรก คือ ควรหยุดปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค กล่าวคือ การใช้ยาปฏิชีวนะ หรือการใช้ยาลดกรด เป็นต้น เพื่อรอเวลาให้เชื้อประจำถิ่นในลำไส้เติบโตขึ้นมาจนมีสัดส่วนที่เป็นปกติ สิ่งต่อมา ได้แก่ การพิจารณาเลือกใช้ยาในการรักษา ในการติดเชื้อซ้ำครั้งแรกนั้น ข้อมูลยังสนับสนุนการใช้ยาเดิมในการรักษา ไม่ว่าจะเป็น metronidazole หรือ vancomycin ต่างก็ให้ผลการรักษาที่ไม่แตกต่างกัน[22, 26, 72] แต่สำหรับการติดเชื้อในครั้งถัดๆไปนั้น ยังไม่มีมาตรฐานในการรักษา มีเพียงข้อมูลวิธีต่างๆที่อาจจะได้ผลในการรักษา ตัวอย่าง ได้แก่ การรักษาด้วยวิธี tapering doses regimens of vancomycin คือการค่อยๆลด dose ของ vancomycin ช้าๆ เป็นเวลาหลายสัปดาห์ หรือ pulse of a dose of vancomycin คือ หลังให้การรักษาตามปกติครบ 10-14 วันแล้ว ให้ vancomycin 125–500 มก. ทุก 2–3 วัน เป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ โดยหลักการของวิธีการนี้ คือเพื่อรอเวลาให้ spore ของ *C. difficile* โต และให้ยาเพื่อทำลายเชื้อที่เหลือค้างอยู่ในลำไส้[73] การใช้ rifaximin 400 มก. 2 ครั้งต่อวัน นาน 2 สัปดาห์ภายหลังให้การรักษาตามปกติ ก่อนที่ผู้ป่วยจะมี

อาการถ่ายเหลวเป็นกลับมาใหม่ มีรายงานว่าได้ผลดีในการรักษาเช่นเดียวกัน[74] นอกจากการใช้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแล้ว ยังมีการรักษาด้วยวิธีการอื่นๆ อีก ได้แก่ การรักษาด้วย probiotics, immunotherapy (IVIg) หรือ fecal transplantation เป็นต้น การใช้ probiotic อย่างเช่น *Lactobacillus* species หรือ *Saccharomyces boulardii* ร่วมกับ vancomycin มีข้อมูลลดการติดเชื้อซ้ำ แต่มีรายงานการติดเชื้อราในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันผิดปกติ และยังไม่มีข้อมูลในการใช้เพียงชนิดเดียวเพื่อการรักษา จึงยังไม่แนะนำให้มีการใช้โดยทั่วไป[22, 74, 75] การรักษาด้วย immunotherapy อาศัยความรู้ที่ว่า ถ้ามีการสร้าง antitoxin Ig การติดเชื้อ CDI จะเกิดน้อยกว่าและการกลับเป็นซ้ำก็จะน้อยกว่านั้น[42, 43] จากหลักการว่าผู้ป่วยขาด Ig การให้ IVIg ก็คือการให้ IgG anti-toxin A และ B เข้าไปทดแทน โดยมีรายงานประสบผลสำเร็จในการรักษาเมื่อให้ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง และไม่มีทางเลือกอื่นในการรักษาเท่านั้น แต่ข้อมูลยังน้อยและมีข้อจำกัด จึงแนะนำให้เลือกใช้ในกรณีที่ไม่มีทางเลือกอื่นๆ[22, 75, 76] ส่วนการรักษาด้วย fecal transplantation (fecal bacteriotherapy หรือ intestinal microbiota transplantation, IMT) เป็นการนำอุจจาระในคนปกติมาปลูกถ่ายเชื้อประจำถิ่นของลำไส้ให้กับผู้ป่วย โดยอาจให้ทางสายยางเข้าสู่กระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็กส่วนต้น (nasogastric หรือ nasojejunal tube) หรือ สวนเก็บทางทวาร (enema หรือ colonoscope) โดยจะต้องให้การรักษาตามปกติก่อนแล้วตามด้วนการล้างลำไส้ (bowel lavage) เพื่อเตรียมพร้อมในการรับการปลูกถ่าย มีรายงานว่าให้ผลดีในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อซ้ำเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ vancomycin[75, 77-79]

ในปีค.ศ. 2010 Cohen และคณะ ได้เสนอแนวทางการแบ่งความรุนแรงของ CDI ไว้เป็น 3 ระดับ ได้แก่ ความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง (mild or moderate) รุนแรงมาก (severe) และรุนแรงมากและมีภาวะแทรกซ้อน (severe, complicated) ทั้งนี้โดยอาศัยเพียงปริมาณของเม็ดเลือดขาวในเลือดและค่า serum creatinine เพื่อประโยชน์ในการเข้าใจโดยทั่วกัน และส่งผลถึงการพิจารณาการรักษาซึ่งจะแปรผันตามความรุนแรงของโรค[26] แต่ในปีค.ศ. 2010 fidaxomicin ยังเป็นยาที่มีข้อมูลไม่เพียงพอและไม่ได้รับการยอมรับจาก US FDA จนกระทั่งในปีค.ศ. 2011 ภายหลังจากที่ fidaxomicin มีข้อมูลเพิ่มมากขึ้น และได้รับการยอมรับจากองค์กรที่มีมาตรฐาน ซึ่งจะส่งผลต่อการพิจารณาสร้างแนวทางเวชปฏิบัติในครั้งต่อไป แนวทางการรักษาดังแสดงในตารางที่ 3[22, 26]

ตารางที่ 3. แสดงการแบ่งความรุนแรงของ CDI และแนวทางการรักษา[22, 26]

ความรุนแรงของ CDI	จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือด	Serum creatinine	การรักษา
รุนแรงน้อยถึงปานกลาง	≤15,000 cells/μL	<1.5 เท่าของค่าดั้งเดิม	Metronidazole, 500 mg p.o. t.i.d. 10–14 days
รุนแรงมาก	>15,000 cells/μL	≥1.5 เท่าของค่าดั้งเดิม	Vancomycin, 125 mg p.o. q.i.d. 10–14 days
รุนแรงมากและมีภาวะแทรกซ้อน	Hypotension or shock, ileus หรือ megacolon		Vancomycin, 500 mg p.o. q.i.d. or และ metronidazole 500 mg every 8 hours intravenously If complete ileus, consider adding rectal instillation of vancomycin
การติดเชื้อครั้งแรก และการติดเชื้อซ้ำครั้งที่ 1			รักษาแบบเดียวกัน
การติดเชื้อตั้งแต่ครั้งที่ 2 ขึ้นไป			พิจารณาเลือกใช้ • Vancomycin in a tapered and/or pulsed regimen • Vancomycin at a dose of 125 mg orally 4 times daily for 14 days, followed by rifaximin at a dose of 400 mg twice daily for 14 days • Intravenous immune globulin at a dose of 400 mg per kilogram of body weight once every 3 weeks for a total of 2 or 3 doses • Probiotics • Fecal transplantation

การป้องกันและควบคุม CDI

วิธีในการส่งต่อ (transmission) การติดเชื้อ *C. difficile* แบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่โดยหลักการของ feco-oral transmission ได้แก่ การติดต่อโดยตรงกับผู้ป่วย การติดต่อผ่านสิ่งแวดล้อม และสุดท้ายคือการติดต่อผ่านทางบุคลากรทางการแพทย์ที่มี colonization ของเชื้อที่มือ

วิธีการที่สำคัญและง่าย สะดวกต่อการปฏิบัติมากที่สุด คือ การล้างมือ (hand hygiene) เนื่องจาก *C. difficile* ในสิ่งแวดล้อม อยู่ในรูปแบบของ spore การล้างมือด้วย alcohol-based handrub อาจจะไม่เพียงพอในการกำจัด spore โดย Gordin และคณะได้รายงานอุบัติการณ์ของการเกิด CDI ไม่ลดลงในช่วง 3 ปีของการใช้โครงการล้างมือด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol-based handrub implementation) ก่อนและหลังสัมผัสผู้ป่วย[80] และแนะนำให้ใช้การล้างมือด้วยน้ำและสบู่เพื่อกำจัด spore ที่ติดอยู่ที่มือ โดยอาจพิจารณาใช้ถุงมือและเสื้อกาวน์ร่วมด้วย เพื่อลดการ colonization ของ spore ซึ่งควรปฏิบัติต่อเนื่องในช่วงที่ผู้ป่วย CDI ยังมีอาการถ่ายเหลว[26]

สำหรับโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในขณะนี้ยังใช้การทดสอบ EIA ในอุจจาระ เพียงอย่างเดียว เพื่อวินิจฉัย CDI ซึ่งเป็นผลในการทดสอบส่วนใหญ่เป็นผลลบ ถึงแม้ว่าผู้ป่วยจะมีการติดเชื้อจริง จากข้อจำกัดในการส่งตรวจและความไวต่ำของการทดสอบเอง

การวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ของการคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในอุจจาระ เพื่อยืนยัน toxigenic *C. difficile* โดยเปรียบเทียบกับการตรวจด้วย PCR for *tcdA และ tcdB* genes และการเพาะเชื้อ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้จริงสำหรับผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่เข้ารับการรักษาภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ต่อไป

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

(research methodology)

รูปแบบการวิจัย (research design)

เป็นการศึกษาแบบสังเกตเชิงพรรณนาไปข้างหน้า (prospective study) ศึกษาตั้งแต่เดือนธันวาคมพ.ศ. 2555 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2556 เป็นการวิจัยเพื่อทดสอบความไวของเครื่องมือในการวินิจฉัยโรค (sensitivity assay of screening test)

ระเบียบวิธีการวิจัย (research methodology)

1. ประชากร (population) และตัวอย่าง (sample)
   1.1. ประชากรเป้าหมาย (population) คือ ผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี ที่มีอาการถ่ายเหลว และสงสัยว่าจะเป็น CDI
   1.2. ประชากรที่จะทำการเก็บตัวอย่าง (population to be sampled) และกลุ่มตัวอย่าง (sample) คือ ผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี ที่มีอาการถ่ายเหลวและสงสัยว่าจะเป็น CDI ที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคใดๆภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556
2. กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (inclusion criteria)
   2.1. ผู้ป่วยชายหรือหญิงที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี
   2.2. ผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวและสงสัยว่าจะเป็น CDI
3. กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากศึกษา (exclusion criteria)
   3.1. ผู้ป่วยที่ไม่สมัครใจยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

3.2. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถเก็บอุจจาระมาคัดกรองโรคได้

การคำนวณประชากรตัวอย่าง (sample size determination)

$$N = (Z\alpha_{/2}^{2}pq)/(d^{2}xprevalence)$$

Z = Z value = 1.96 for 95% confidence level

p = expected sensitivity = 0.95[62]

q = 1-p = 0.05

d = acceptable error = 10%

prevalence อ้างอิงจากรายงานของว่องวานิชและคณะ[51]

N = $(1.962)(0.95 \times 0.05)/(0.1^{2} \times 0.2)$

= 91 คน

วิธีการเก็บตัวอย่าง (sample techniques)

รวบรวมผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวและสงสัยว่าจะเป็น CDI ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเข้าเกณฑ์การคัดเลือกเข้าการศึกษา เพื่อเก็บอุจจาระเพื่อส่งตรวจหา *C. difficile*

การสังเกตและการวัด (observation and measurement)

การวัดผล คือ จำนวนผู้ป่วยที่ผล GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในอุจจาระเป็นผลตรงกันกับการตรวจด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB genes*

การเก็บรวบรวมข้อมูล (data collection)

ผู้วิจัยทำการบันทึกข้อมูลด้วยตนเอง โดยใช้แบบบันทึกดังภาคผนวกที่ 1

1. ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย

1.1. เพศ

1.2. อายุ

1.3. โรคประจำตัว

1.4. ระยะเวลาที่นอนโรงพยาบาล

2. ข้อมูลเกี่ยวกับความเสี่ยงในการติดเชื้อ

2.1. ประวัติเคยเป็น CDI

2.2. ประวัติการได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาเคมี รวมถึงระยะเวลาที่ได้รับยา

2.3. ระยะเวลาที่ได้รับยาก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว

3. ข้อมูลเกี่ยวกับอาการและอาการแสดงของผู้ป่วย

3.1. ลักษณะอุจจาระ

3.2. ปริมาณอุจจาระ

3.3. ระยะเวลาที่เกิดอาการถ่ายเหลวก่อนทำการทดสอบ

3.4. ความรุนแรงของอาการ

4. ข้อมูลเพื่อนำมาแปลผล

4.1. ผล GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA

4.2. ผลการทดสอบ PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

การเก็บข้อมูล baseline เป็นการเก็บข้อมูลครั้งเดียวก่อนทำการทดสอบ

การควบคุมและตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลทำโดย double checking data

การดำเนินการวิจัย (methodology)

1. เก็บตัวอย่างอุจจาระบริเวณที่เป็นมูกหรืออุจจาระเหลว (unformed stool) จากผู้ป่วย โดยทีมงานที่ได้รับการอบรมวิธีการเก็บอุจจาระที่ถูกต้อง
2. การควบคุมและตรวจสอบคุณภาพในการเก็บอุจจาระเพื่อส่งตรวจ กระทำโดยทีมงานที่ผ่านการอบรมวิธีเก็บสิ่งส่งตรวจโดยผู้วิจัย
3. ทดสอบตัวอย่างด้วยวิธีการทั้ง 4 แบบ ได้แก่

3.1. *C. difficile* GDH EIA ตรวจโดยใช้ The Premier™ *C. difficile* GDH (Meridian Bioscience Inc., Ohio, USA) ซึ่งได้รับการรับรองคุณภาพจาก US FDA โดยกระทำการทดสอบตามที่แนะนำไว้ในคู่มือการทดสอบ อุจจาระที่เก็บเพื่อรอส่งตรวจ จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°ซ และจะทำการทดสอบภายใน 2 เดือน ผลการทดสอบจะทำการแปลผลผ่านเครื่อง spectrophotometrically ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ผล optical density (OD) ที่ต่ำกว่า 0.200 จะถูกแปลผลเป็นลบ ผล OD ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.200 จะถูกแปลผลเป็นบวก ถ้าผลการทดสอบให้ผลบวกในระดับต่ำ (OD ระหว่าง 0.200 and 0.250) มากกว่าร้อยละ 5 จะตัวอย่างในกลุ่มนั้นๆ จะต้องถูกทำการทดสอบใหม่

3.2. *C. difficile* cytotoxins A/B ELFA ชุดทดสอบ VIDAS® *C. difficile* Toxin A & B (bioMérieux, Lyon, France) ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้อยู่ในเวชปฏิบัติของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยอุจจาระที่ทำการทดสอบจะทำภายในวันเดียวกับที่เก็บสิ่งส่งตรวจ โดยวิธีทำการทดสอบจะทำโดยเครื่องทดสอบอัตโนมัติ ด้วยหลักการ enzyme-link fluorescence assay (ELFA) การทดสอบจะใช้เวลาประมาณ 75 นาที ผลการทดสอบจะทำการวัดด้วยแสงฟลูออเรสเซน ผลการทดสอบจะถูกรายงานจากเครื่อง โดยผลการทดสอบ (TV) ที่น้อยกว่า 0.13 จะถูกแปลผลเป็นลบ TV ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.13 และน้อยกว่า 0.37 จะถูกแปลผลเป็น equivocal และผลการทดสอบที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.37 จะถูกแปลผลเป็นลบ

3.3. culture เป็นวิธีทดสอบที่ทำในเวชปฏิบัติของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพื่อเพาะเชื้อ anaerobe โดยการนำอุจจาระมาผ่าน 95% ethanol (alcohol shock) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเพาะเชื้อบน phenylethyl alcohol agar เก็บในภาวะ anaerobe เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำผลที่ได้มา subculture บน *Brucella* agar ซึ่งให้สีและกลิ่นของ Clostridium colony ที่ชัดเจน หลังจากนั้นจึงตรวจยืนยันเชื้อ *C. difficile* ด้วย API® 20 A

3.4. PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นการทดสอบอุจจาระโดยตรง (direct stool PCR) ซึ่งการทำ DNA extraction ใช้เครื่อง ExiPrep™ Bacteria Genomic DNA Kit (Bioneer, California, USA) การทดสอบ PCR ทำโดยอ้างอิงจากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้า[81, 82] primers *tcdA* gene

จากการศึกษาของ Lemee และคณะ กล่าวคือ *tcdA*-specific primers และ *tcdA* gene ที่มี 1.8-kb deletion strains [tcdA-F (5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3') and tcdA-R (5'GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3')][81] สำหรับการทดสอบ *tcdB* ใช้ primers จากการศึกษาของ Kato และคณะ ได้แก่ A primer NK104 (sequence: 5'-GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC-3', positions 2,945 to 2,972) และ primer NK105 (sequence: 5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT-3', positions 3,123 to 3,148) การทำ PCR amplification ของ primer pair NK104 และ NK105 ทำ 35 รอบที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 120 วินาที[82] PCR products นำมาผ่านการบวนการ electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และ ethidium bromide

4. การ validate in-house PCR กระทำโดยทีมงาน microbiology

การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

1. ข้อมูลที่ได้จะถูกรวบรวมและวิเคราะห์ โดยทดสอบทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0
2. ข้อมูลเชิงปริมาณ ใช้ค่าเฉลี่ย หรือ ค่ามัธยฐาน (mean$\pm$SD) หรือ median$\pm$interquartile range)
3. ข้อมูลเชิงคุณภาพใช้ Chi-square test
4. ข้อมูลผลการทดสอบนำมาวิเคราะห์หาค่า sensitivity, specificity, NPV และ PPV

ปัญหาทางจริยธรรม (ethical considerations)

1. *หลักความเคารพในบุคคล (respect for person)* โดยการขอความยินยอมจากผู้ป่วยเพื่อเข้าร่วมในการวิจัย เหตุผลในการขอยกเว้นขอความยินยอม โดยผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้ป่วย โดยไม่มี identifier ในแบบบันทึกข้อมูลที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย
2. *หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (beneficence/non-maleficence)* การศึกษานี้มีประโยชน์ในการทำให้วินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง เพื่อประโยชน์ที่ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมและทันท่วงที โดยผู้ป่วยอาจจะได้รับความเสี่ยงเล็กน้อย เช่นความเสี่ยงในด้าน

ความไม่สะดวกใจในการเก็บอุจจาระตรวจ ซึ่งผู้ป่วยสามารถแจ้งแก่ผู้วิจัย และขอถอนตัวจากงานวิจัยได้

3. *หลักความยุติธรรม (justice)* การศึกษานี้มีเกณฑ์การคัดเข้าการศึกษาอย่างชัดเจน

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (obstacles and strategies to solve the problems)

1. ข้อมูลไม่ครบถ้วนสมบูรณ์
2. จำนวนผู้ป่วยที่เก็บข้อมูลได้ไม่เท่ากับที่คำนวณไว้
3. นัยสำคัญทางสถิติของงานวิจัยในการนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ทางคลินิก

การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (administration & time schedule)

การดำเนินงาน	2554		2555		2556			
	11	12	1-2	3-12	1	2	3	4
1.ศึกษาเตรียมงาน	*	*	*					
2.รวบรวมข้อมูล		*	*	*	*	*		
3.วิเคราะห์ข้อมูล						*	*	
4.สรุปและเขียนรายงาน							*	*
5.รายงานผล								*

งบประมาณ (budget)

1. หมวดค่าใช้จ่ายทางห้องปฏิบัติการ

1.1. ค่าตรวจ GDH EIA 2set/96 tests = 100,000.00 บาท

1.2. ค่าตรวจ cytotoxins A/B ELFA 200x91 = 18,200.00 บาท

1.3. ค่าตรวจ PCR 1,000x91 บาท = 91,000.00 บาท

1.4. ค่าตรวจเพาะเชื้อ 400x91 = 36,400 บาท

1.5. หมวดค่าใช้สอย เช่นค่าถ่ายเอกสาร 10,000.00 บาท

1.6. หมวดค่าตอบแทน 10,000.00 บาท

รวมทั้งสิ้น 265,600.00 บาท

2. แหล่งเงินทุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

บทที่ 4

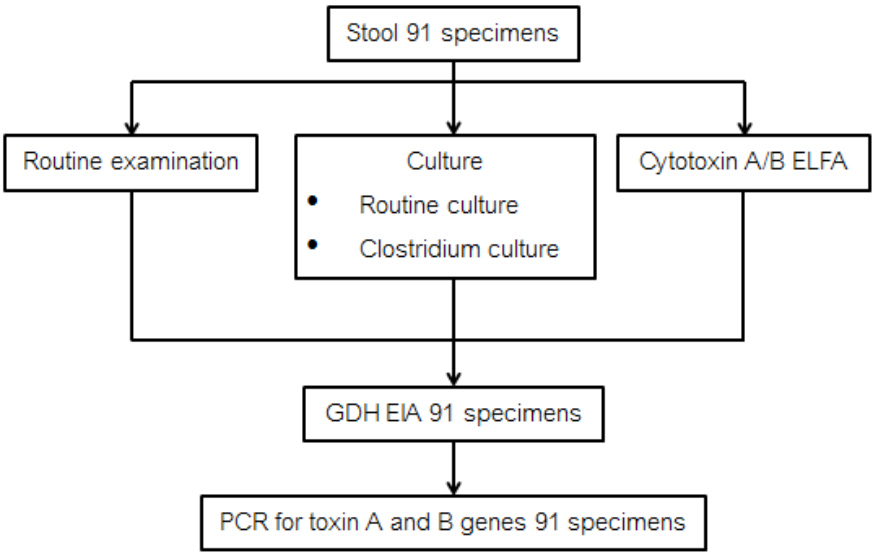
ผลการวิจัย

(results)

ขั้นตอนการเก็บข้อมูลและทำการทดสอบ

รวบรวมผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวและสงสัยว่าจะ มีการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล (*Clostridium difficile* infection, CDI) ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และเข้าเกณฑ์การคัดเลือกเข้าการศึกษา 91 ตัวอย่าง เพื่อเก็บอุจจาระเพื่อส่งตรวจในขั้นต้น ประกอบด้วยการตรวจอุจจาระทั่วไป (routine stool examination) ได้แก่ ตรวจเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และพยาธิในอุจจาระ, ตรวจเพาะเชื้อ ประกอบด้วย ตรวจ *Vibrio* spp., *Shigella* spp, *Salmonella* spp. และตรวจหาเชื้อ *C. difficile* และตรวจหา cytotoxin A และ B ด้วยวิธี enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA) หลังจากนั้นนำ stool มาทดสอบ CDI โดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase enzyme immunoassay, GDH EIA) ทั้งหมด 91 ตัวอย่าง และสุดท้ายนำตัวอย่างทั้งหมดตรวจ polymerase chain reaction (PCR) for *tcdA* และ *tcdB* genes ขั้นตอนแสดงดังรูปภาพที่ 9

ภาพที่ 9. ขั้นตอนการทำการทดสอบอุจจาระ



ระบาดวิทยา

จากกลุ่มประชากรที่ทำการเก็บตัวอย่าง กล่าวคือ ผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี ที่มีอาการถ่ายเหลวและสงสัยว่าจะเป็น CDI ที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคใดๆภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 เป็นจำนวนทั้งหมด 91 ราย ได้รับการคัดเลือกตาม inclusion และ exclusion criteria คิดเป็นผู้ป่วยชายทั้งหมด 37 ราย (ร้อยละ 40.7) เป็นผู้ป่วยหญิงทั้งหมด 54 ราย (ร้อยละ 59.3) อายุเฉลี่ย 59.96$\pm$19.47 ปี โดยจัดเป็นผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวทั้งหมด 88 ราย (ร้อยละ 96.7) และเป็นโรคในกลุ่มมะเร็ง (รวมทั้งกลุ่มโรคมะเร็งโลหิตวิทยาและโรคมะเร็งอื่นๆ เช่น acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, lung cancer (CA), colonic CA เป็นต้น) มากที่สุดจำนวน 45 ราย รองลงมา ได้แก่ กลุ่ม organ failure (เช่น end-stage renal disease, ischemic heart disease เป็นต้น) จำนวน 44 รายไม่พบว่ามีโรคประจำตัวใดที่เป็นความเสี่ยงต่อ CDI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มประชากรตัวอย่างจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI ตามผลการทดสอบ PCR

ลักษณะผู้ป่วย		CDI			P value
		มี (N=22)	ไม่มี (N=69)	รวม (N=91)	
อายุเฉลี่ย (mean±SD) ปี		60.1±21.5	59.9±18.9	59.96±19.5	-
เพศ	ชาย	9 (40.9)	28(40.6)	37	0.99
ระยะเวลาที่นอนโรงพยาบาล (median±IQR) วัน		14±16	15±19	15±17	0.18
โรคประจำตัว		22 (100)	66 (95.7)	88	0.32
โรคมะเร็ง	รวม	9 (40.9)	36 (52.2)	44	0.24
	โรคมะเร็งโลหิตวิทยา	6 (27.3)	21 (30.4)	27	0.29
	• Acute myeloid leukemia	2	11	13	
	• Chronic myeloid leukemia	0	1	1	
	• Chronic lymphocytic leukemia	0	1	1	
	• Non-Hodgkin's lymphoma	4	5	9	
	• Hodgkin's lymphoma	0	1	1	
	• Multiple myeloma	0	1	1	
	• Acute myelofibrosis	0	1	1	
	โรคมะเร็งอื่นๆ	3 (13.6)	15 (21.7)	18	0.19
	• Lung cancer	2	3	5	
	• Colonic cancer	0	3	3	
	• Hepatocellular carcinoma	0	3	3	
	• Cholangiocarcinoma	1	1	2	
	• CA pancreas	0	1	1	
	• CA cervix	0	1	1	
	• CA breast	0	1	1	
	• Medulloblastoma	0	1	1	
	• Thymoma	0	1	1	

ลักษณะผู้ป่วย		CDI			P value
		มี (N=22)	ไม่มี (N=69)	รวม (N=91)	
ปลูกถ่ายอวัยวะ (transplant)	รวม	0	8 (11.6)	8	0.09
	Bone marrow transplant	0	1	1	
	Kidney transplant	0	5	5	
	Liver transplant	0	2	2	
Organ failure	รวม	12 (54.5)	32 (46.4)	44	0.37
	End-stage renal disease	3	7	10	
	Ischemic heart disease	2	5	7	
	Chronic lung disease	2	2	4	
	Cirrhosis	0	2	2	
	Diabetes mellitus	2	15	17	
	Myelodysplastic syndrome	2	1	3	
	Thalassemia disease	1	0	1	
อื่นๆ	Hypertension	2 (9.1)	12 (17.4)	14	-
	HIV	2 (9.1)	2 (2.9)	4	-
	Systemic lupus erythematosus	0	2 (2.9)	2	-

หมายเหตุ 1. ผู้ป่วยแต่ละรายอาจจะมีโรคประจำตัวมากกว่า 1 โรค

2. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

3. P value เป็นการวิเคราะห์ระหว่างผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

อาการสำคัญที่มาโรงพยาบาลเป็นกลุ่มอาการของโรคติดเชื้อมากที่สุด คือ 54 ราย (ร้อยละ 59.3) จัดเป็นกลุ่ม CDI 13 ราย (ร้อยละ 24.1) และกลุ่มที่ไม่ CDI 41 ราย (ร้อยละ 59.4) รองลงมาคือกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนจากโรคมะเร็งจำนวน 21 ราย จัดเป็นกลุ่ม CDI 6 ราย และกลุ่มที่ไม่ใช่ CDI 15 ราย โดยไม่พบว่าทั้ง 2 กลุ่มเป็นความเสี่ยงต่อ CDI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5. แสดงอาการสำคัญและ/หรือโรคที่นำผู้ป่วยมาโรงพยาบาลจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

อาการสำคัญและ/หรือโรคที่นำมาโรงพยาบาล		CDI			P value
		มี (N=22)	ไม่มี (N=69)	รวม (N=91)	
Infection	รวม	13 (59.1)	41 (59.4)	54	0.98
	Bacteria	11(50)	40 (58.0)	51	0.30
	Virus	1 (4.5)	0	1	0.08
	Fungus	1 (4.5)	1 (1.4)	2	0.39
Complications of malignancy		6 (27.3)	15 (21.7)	21	0.80
Others		2	8	10	-

หมายเหตุ 1. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

2. P value เป็นการวิเคราะห์ระหว่างผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

ความเสี่ยงในการก่อโรค CDI

ความเสี่ยงของ CDI โดยพิจารณาจากกลุ่มยาที่ก่อให้เกิดความเสี่ยง แบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ กล่าวคือ กลุ่มยาปฏิชีวนะ กลุ่มยาเคมีบำบัด และกลุ่มยาลดกรด พบว่าผู้ป่วย 88 ราย (ร้อยละ 96.7) เคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ในช่วงเวลาไม่มากกว่า 3 เดือนและไม่น้อยกว่า 3 วันก่อนเกิดอาการ และในจำนวนผู้ป่วย 88 ราย มีผู้ป่วย 21 รายที่มี CDI (ผลตรวจ PCR เป็นบวก) เมื่อพิจารณาจากจำนวนครั้งของการใช้ยาปฏิชีวนะพบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมด 109 ครั้ง โดยยากลุ่ม beta-lactam เป็นยากลุ่มที่มีการใช้มากที่สุดเป็นจำนวน 98 ครั้ง (ร้อยละ 89.9) และมีความชุกของ CDI ร้อยละ 22.4 (22 ครั้งต่อการใช้ยา 98 ครั้ง)

ในยากลุ่ม beta-lactam พบว่า beta-lactam/beta-lactamase inhibitor เป็นประเภทที่มีการสั่งใช้มากที่สุด (39 ครั้ง) แต่พบอัตราของ CDI เพียง 4 ราย (ร้อยละ 16.7) P=0.03 ยาที่มีการสั่งใช้รองลงมาคือยากลุ่ม cephalosporin ซึ่งมีการสั่งใช้ทั้งหมด 27 ครั้ง แต่มีอัตราการเกิด CDI สูงสุดคือ

ร้อยละ 41.7 (10 ราย) ส่วนยากลุ่ม carbapenem มีอัตราการติดเชื้อเป็นอันดับ 2 คือ ร้อยละ 33.3 มีการสั่งใช้ 32 ครั้ง

ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ มีเพียง colistin และ aminoglycoside ที่พบความชุกของ CDI 1 ครั้ง (ร้อยละ 4.2) และ 1 ครั้ง (ร้อยละ 4.2) ตามลำดับนอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังมีการใช้ยากลุ่ม fluoroquinolone, macrolide, sulfonamide และ fosfomycin แต่ไม่พบมีความชุกของ CDI ข้อมูลแสดงในตารางที่ 6

ค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่ได้รับยาก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว 10.5 วัน (IQR 8 วัน)

ตารางที่ 6. แสดงจำนวนครั้งของการสั่งใช้ยาปฏิชีวนะจำแนกตามประเภทของยาปฏิชีวนะและผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

ยาปฏิชีวนะ	CDI			P value
	มี (N=24)	ไม่มี (N=85)	รวม (N=109)	
มีการใช้ยาปฏิชีวนะ	24 (22.0)	85 (78.0)	109	0.39
Beta-lactam	22 (91.6)	76 (89.3)	98	0.75
Beta-lactam/beta-lactamase inhibitor	4 (16.7)	35 (41.2)	39	0.03
• Piperacillin/tazobactam	1	20	21	
• Cefoperazone/sulbactam	1	6	7	
• Ampicillin/sulbactam	2	8	10	
• Amoxicillin/clavulanic acid	0	1	1	
Cephalosporin	10(41.2)	17(20)	27	0.08
● Ceftazidime	6	14	20	
● Ceftriaxone	4	3	7	
Carbapenem	8(33.3)	24(28.2)	32	0.47
• Meropenem	4	18	22	
• Imipenem	4	4	8	
• Ertapenem	0	2	2	
Quinolone (ciprofloxacin)	0	2(2.4)	2	0.45
Macrolide (azithromycin)	0	1(1.2)	1	0.59
Sulfonamide (TMP/SMX)	0	1(1.2)	1	0.59
Colistin	1(4.2)	4(4.7)	5	0.91
Aminoglycoside (gentamicin)	1(4.2)	0	1	0.06
Fosfomycin	0	1 (1.2)	1	0.59
ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ	1	1	2	-
จำนวนวันของการใช้ยาปฏิชีวนะก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว (median±IQR) วัน	12.14+8.9	13.25+8.4	12.98+8.5	0.61

หมายเหตุ 1. ผู้ป่วยแต่ละรายอาจมีการใช้ยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด

2. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

เมื่อพิจารณาความเสี่ยงของการเกิด CDI ที่มีความเกี่ยวข้องกับการได้รับยาเคมีบำบัด พบว่ามีการใช้ยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยทั้งหมด 22 ราย (ร้อยละ 24.2) คิดเป็นจำนวนทั้งหมด 55 ครั้งของการใช้ยาเคมีบำบัด โดยสามารถแบ่งประเภทของยาเคมีบำบัดออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ คือ กลุ่ม cell cycle-specific, cell cycle-nonspecific และ retinoids โดยยากลุ่ม cell cycle-specific เป็นกลุ่มที่มีการใช้มากที่สุด ทั้งหมด 50 ครั้ง พบความชุกของ CDI 7 ครั้ง (ร้อยละ 14) ส่วนกลุ่ม cell cycle-nonspecific ไม่พบความชุกของ CDI นอกจากนี้ยังมีการใช้ยากลุ่ม retinoids 1 ครั้งและเกิด CDI ข้อมูลแสดงในตารางที่ 7

ค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่ได้รับยาก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว 14 วัน (IQR 19 วัน)

ตารางที่ 7. แสดงจำนวนครั้งของการสั่งใช้ยาเคมีบำบัดจำแนกตามประเภทของยาเคมีบำบัดและผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

ยาเคมีบำบัด		CDI			P value
		มี (N=8)	ไม่มี (N=47)	รวม (N=55)	
มีการใช้ยาเคมีบำบัด		8 (14.5)	47 (85.5)	55	0.07
Cycle-specific	รวม	7 (87.5)	43 (91.5)	50	0.34
	Antimetabolyte	1	14	15	0.31
	Antibiotic, anthracycline	4	23	27	0.96
	Vinca alkaloid	2	6	8	0.36
Cycle-nonspecific	Alkylating agent	0	4	4	0.55
Retinoids		1 (100%)	0	1	-
จำนวนวันของการใช้ยาเคมีบำบัดก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว (median±IQR) วัน		11.5±13	14±28	14±19	0.09

หมายเหตุ 1. ผู้ป่วย 1 รายอาจได้รับยาเคมีบำบัดมากกว่า 1 ชนิด

2. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

เมื่อพิจารณาความเสี่ยงของ CDI ที่มีความเกี่ยวข้องกับการได้รับยาลดกรด พบว่ามีการใช้ยาลดกรดในผู้ป่วยทั้งหมด 53 ราย (ร้อยละ 58.2) คิดเป็นจำนวนทั้งหมด 53 ครั้งของการใช้ยาลดกรด โดย

สามารถแบ่งประเภทของยาลดกรดออกเป็น 2 ประเภท คือ proton pump inhibitors (PPIs) และ histamine 2 receptor antagonists (H2RAs) พบว่ายากลุ่ม PPIs เป็นกลุ่มที่มีการใช้มากที่สุด ทั้งหมด 45 ครั้ง พบความชุกของ CDI 11 ครั้ง (ร้อยละ 24.4) ส่วนกลุ่ม H2RA พบความชุกของ CDI 1 ครั้ง (ร้อยละ 4.5) ข้อมูลแสดงในตารางที่ 8

ค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่ได้รับยาก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว 6 วัน (IQR 26 วัน)

ตารางที่ 8. แสดงจำนวนครั้งของการสั่งใช้ยาลดกรดจำแนกตามประเภทของยาลดกรดและและผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

Acid-neutralizing agents		CDI			P value
		มี (N=12)	ไม่มี (N=41)	รวม (N=53)	
มีการใช้ยาลดกรด		12 (22.6)	41 (77.4)	53	0.69
Proton pump inhibitors	รวม	11 (91.7)	31 (75.6)	45	0.95
	Omeprazole	9	25	34	
	Pantoprazole	2	3	5	
	Esomeprazole	0	3	3	
	Lansoprazole	0	3	3	
H2 blockers	Ranitidine	1 (8.3)	7 (24.4)	8	0.42
จำนวนวันของการใช้ยาลดกรดก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว (median±IQR) วัน		4.5±15	6±39	6	0.13

หมายเหตุ 1. ผู้ป่วย 1 รายอาจได้รับยายาลดกรดมากกว่า 1 ชนิด

2. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

ลักษณะทางคลินิก

เมื่อพิจารณาอาการและอาการแสดงที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด CDI อาการทาง systemic (systemic symptoms) ซึ่งประกอบด้วย อาการไข้ (อุณหภูมิ ≥38°ซ), อาการปวดท้องและการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต พบอาการไข้และอาการปวดท้องในจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 38 รายและ 40 ราย ตามลำดับและไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตจากกลุ่มตัวอย่างเลย

ในผู้ป่วยที่มีอาการไข้ 38 ราย พบว่า 12 รายมี CDI (ร้อยละ 54.5) ส่วนอาการเฉพาะที่ ได้แก่ อาการปวดท้องพบว่า 11 รายมี CDI (ร้อยละ 50) โดยตำแหน่งของการปวดท้องพบ 2 แบบ กล่าวคือ ปวดท้องทั่วๆ (generalized) และปวดบริเวณรอบสะดือ (periumbilicus) 8 และ 3 ราย ตามลำดับ

ส่วนอาการถ่ายเหลวพบในผู้ป่วยทุกรายในการศึกษานี้ โดยไม่พบอาการ ileus และ megacolon ลักษณะการถ่าย ส่วนใหญ่ 57 รายถ่ายเหลวเป็นน้ำ (watery diarrhea) แต่พบอัตราการเกิด CDI เพียง 9 ราย (ร้อยละ 15.8) อีก 34 ราย ถ่ายเหลวแบบที่มีการอักเสบ (inflammatory diarrhea) และพบอัตราการเกิด CDI สูงถึง 13 ราย (ร้อยละ 38.2) ลักษณะถ่ายเหลวแบบที่มีการอักเสบ จำแนกเป็น 3 ประเภท คือ ถ่ายเหลวเป็นมูก (mucous) ถ่ายเหลวเป็นมูกปนเลือด (mucous/bloody) และถ่ายเป็นเลือด (bloody) พบ 10, 2 และ 1 ราย ตามลำดับ ข้อมูลแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9. แสดงอาการและอาการแสดงจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI.

อาการและอาการแสดง		CDI			P value
		มี (N=22)	ไม่มี (N=69)	รวม (N=91)	
อาการทาง systemic	อาการไข้	12 (54.5)	26 (37.7)	38	0.16
อาการเฉพาะที่	อาการปวดท้อง	11 (50.0)	29 (42.0)	40	0.51
	• ปวดทั่วๆ	8	18	26	0.35
	• ปวดรอบสะดือ	3	9	12	0.94
	• ปวดช่องท้องด้านขวาล่าง	0	2	2	0.42
	อาการถ่ายเหลว	22 (100)	69 (100)	91	
	Watery diarrhea	9 (40.9)	48 (69.6)	57	0.02
	Inflammatory diarrhea	13 (59.1)	21 (30.4)	34	
	• Mucous	10	19	29	0.12
	• Mucous/bloody	2	2	4	0.08
	• Bloody	1	0	1	0.22

หมายเหตุ 1. ผู้ป่วย 1 รายอาจจะมีอาการและอาการแสดงมากกว่า 1 อาการ

2. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ปริมาณเม็ดเลือดขาวในเลือด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) กลุ่มเม็ดเลือดขาวปกติ และกลุ่มเม็ดเลือดขาวที่มากกว่าปกติ (leukocytosis เม็ดเลือดขาว ≥15,000/ไมโครลิตร) ในการศึกษานี้พบกลุ่มเม็ดเลือดขาวปกติมากที่สุดเป็นจำนวน 64 ราย มีความชุกของ CDI 15 ราย (ร้อยละ 23.4) รองลงมาคือ กลุ่มเม็ดเลือดขาวต่ำ 16 ราย มีความชุกของ CDI 4 ราย (ร้อยละ 25) และกลุ่มเม็ดเลือดขาวที่มากกว่าปกติ และ 11 ราย มีความชุกของ CDI 3 ราย (ร้อยละ 27.3)

พิจารณาผลกระทบต่อการทำงานของไต พบว่ามีเพียง 1 รายที่เป็น CDI และมีค่าการทำงานของไต (serum creatinine) เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 เท่า ในการศึกษานี้มีผู้ป่วย 12 รายที่มีการทำงานของไตอยู่ในระยะสุดท้าย (end-stage renal disease, ESRD) และมีความชุกของ CDI 4 ราย (ร้อยละ 33.3)

การตรวจเม็ดเลือดขาวในอุจจาระซึ่งแสดงถึงการอักเสบเฉพาะที่ของลำไส้ใหญ่ (colitis) พบเม็ดเลือดขาว ≥10/high power field (HPF) 13 ราย มีความชุกของ CDI 6 ราย (ร้อยละ 20.5) ส่วนเม็ดเลือดแดงในอุจจาระ พบ 19 ราย (ร้อยละ 22.4) ข้อมูลแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10. แสดงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจำแนกตามผู้ป่วยที่มีและไม่มี CDI

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ		CDI			P value
		มี (N=22)	ไม่มี (N=69)	รวม (N=91)	
White cell count	เม็ดเลือดขาวต่ำ	4 (18.2)	12 (17.4)	16	0.81
	เม็ดเลือดขาวปกติ	15 (68.2)	49 (71.0)	64	0.80
	เม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ	3 (13.6)	8 (11.6)	11	0.80
Creatinine	Relative stability	17 (77.3)	61(88.4)	78	0.19
	Rising of >1.5 มก./ดล.	1 (4.5)	0	1	0.08
	ESRD on hemodialysis	4 (18.2)	8 (11.6)	12	0.43
Stool white cell	< 10/HPF	16 (72.7)	62 (89.9)	78	0.046
	≥ 10/HPF	6 (27.3)	7 (10.1)	13	
Stool red cells	มี	19 (86.4)	66 (95.7)	85	0.13
	ไม่มี	3 (13.6)	3 (4.3)	6	

หมายเหตุ 1. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

ESRD: end-stage renal disease, HPF: high power field

ผลการทดสอบจำแนกตามวิธีการทดสอบแต่ละประเภท

จากกลุ่มประชากรที่ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 91 ราย พบความชุกของการเกิด CDI โดยวิธี PCR for toxin A (*tcdA*) และ toxin B (*tcdB*) genes ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มีอาการถ่ายเหลว 22 ราย (ร้อยละ 24.2) โดยจำแนกเป็นกลุ่ม *tcdA* และ *tcdB* genes บวก (A+B+) 15 ราย (ร้อยละ 16.5) กลุ่ม *tcdB* gene บวกและ *tcdA* gene deletion (B+Adel) 5 ราย (ร้อยละ 5. 5) และกลุ่ม *tcdB* gene บวก และ *tcdA* gene ลบ (A-B+) 2 ราย (ร้อยละ 2.2) เมื่อพิจารณาตามความรุนแรงของโรค พบว่าผู้ป่วย 21 รายติดเชื้อด้วยความรุนแรงระดับน้อยหรือปานกลาง (mild หรือ moderate severity) มีเพียง 1 รายที่ติดเชื้อด้วยความรุนแรงมาก (severe severity) และไม่พบผู้ป่วยที่มีความรุนแรงประเภท severe complicated

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบทั้ง 3 ประเภท โดยเปรียบเทียบกับ PCR (gold standard test) พบว่าการคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA สามารถตรวจพบผลเป็นบวก 21 รายจากทั้งหมด 22 ราย คิดเป็น sensitivity ร้อยละ 95.5 [95% confidence interval (CI) 0.91-0.99] และตรวจพบผลเป็นลบ 46 รายจากทั้งหมด 69 ราย คิดเป็น specificity ร้อยละ 66.7 (95%CI 0.57-0.77), positive predictive value ร้อยละ 47.7 (95%CI 0.43-0.50), negative predictive value ร้อยละ 97.9 (95%CI 0.97-0.99) และ accuracy ร้อยละ 73.6 (95%CI 0.68-0.80) การทดสอบโดยใช้ enzyme-linked fluorescent assays สำหรับ cytotoxins A และ B (cytotoxins A/B ELFA) พบว่า สามารถตรวจพบผลเป็นบวก 18 รายจากทั้งหมด 22 ราย คิดเป็น sensitivity ร้อยละ 72.7 (95%CI 0.68-0.78) และตรวจพบผลเป็นลบ 66 รายจากทั้งหมด 69 ราย คิดเป็น specificity ร้อยละ 95.7 (95%CI 0.94-0.98), ส่วนการทดสอบโดยวิธีเพาะเชื้อ พบว่า สามารถตรวจพบผลเป็นบวก 16 รายจากทั้งหมด 22 ราย คิดเป็น sensitivity ร้อยละ 81.8 (95%CI 0.78-0.86) และตรวจพบผลเป็นลบ 61 รายจากทั้งหมด 69 ราย คิดเป็น specificity ร้อยละ 88.4 (95%CI 0.85-0.91) ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11. แสดงผลการทดสอบ GDH EIA, cytotoxins A/B ELFA และ culture โดยเปรียบเทียบกับ PCR

Test	Result	PCR (N)		Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Accuracy (95%CI)
		+	-					
GDH	+	21	23	95.5	66.7	47.7	97.9	73.6
	-	1	46	(0.91-0.99)	(0.57-0.77)	(0.43-0.50)	(0.97-0.99)	(0.68-0.80)
Cytotoxin A&B	+	18	3	72.7	95.7	84.2	91.7	92.3
	-	4	66	(0.68-0.78)	(0.94-0.98)	(0.80-0.88)	(0.89-0.95)	(0.89-0.95)
Culture	+	16	8	81.8%	88.4	69.2	93.9	84.6
	-	6	61	(0.78-0.86)	(0.85-0.91)	(0.64-0.74)	(0.92-0.96)	(0.81-0.89)

หมายเหตุ 1. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

การรักษา (treatment)

พิจารณาการให้การรักษาแบ่งตามการประเมินความรุนแรงของ CDI ตามคำนิยามในเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย (ดังที่กล่าวไว้เบื้องต้น) พบว่ามีการให้การรักษาทั้งหมด 17 ครั้ง จากผลตรวจพบ CDI จาก PCR 22 ครั้ง (ร้อยละ 77.3) ความรุนแรงของ CDI สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มความรุนแรงน้อยถึงปานกลางทั้งหมด 21 ราย (ร้อยละ 95.5) ภายในกลุ่มนี้มีการรักษา 2 แบบ คือ แบบที่ 1 metronidazole 500 มก. ให้รับประทานทุก 8 ชั่วโมง 15 ราย (ร้อยละ 71.4) และแบบที่ 2 คือ vancomycin 125 มก. ให้รับประทานทุก 6 ชั่วโมง 1 ราย นอกจากนี้กลุ่ม CDI ที่มีความรุนแรงมาก 1 ราย ได้รับการรักษาด้วย vancomycin 500 มก. ให้รับประทานทุก 6 ชั่วโมง ร่วมกับ metronidazole 500 มก. ให้ทางหลอดเลือดดำทุก 8 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12. แสดงความรุนแรงของ CDI และการรักษา

	No treatment	Oral metronidazole 500 mg q 8 h	Oral vancomycin 125 mg q 6 h	Oral vancomycin 500 mg q 6 h	Oral vancomycin + IV metronidazole	Total
Mild/moderate	5 (23.8)	15 (71.4)	1 (4.8)	0	0	21
severe	0	0	0	0	1(100)	1
Total	5	15	1	0	1	22

หมายเหตุ 1. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

IV: intravenous, h: hour, q: every

ผลการรักษา (outcomes)

ประเมินผลการรักษาโดยพิจารณาตามความรุนแรง ความเหมาะสมของการรักษาและการหยุดยาที่อาจจะเป็นสาเหตุ โดยความเหมาะสมในการรักษาพิจารณาจากการให้การรักษาด้วยยาตามความรุนแรง ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น พบว่าในกลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยหรือปานกลาง ได้รับการรักษาด้วยยาอย่างเหมาะสมและมีการหยุดยาที่อาจจะก่อให้เกิดความเสี่ยงของ CDI 9 ราย โดย 5 รายหายจาก CDI 1 รายยังมีอาการถ่ายเหลวหลังการรักษา 1 รายเป็น CDI ซ้ำหลังจากหายแล้วครั้งแรก และ 2 ราย

เสียชีวิต กลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยหรือปานกลาง ได้รับการรักษาด้วยยาอย่างเหมาะสมแต่ไม่มีการหยุดยาที่อาจจะก่อให้เกิดความเสี่ยงของ CDI 6 ราย โดย 4 รายหายจาก CDI 1 รายยังมีอาการถ่ายเหลวหลังการรักษา 1 และ 1 รายเสียชีวิต กลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยหรือปานกลาง ได้รับการรักษาด้วยยาอย่างไม่เหมาะสมและไม่มีการหยุดยาที่อาจจะก่อให้เกิดความเสี่ยง กล่าวคือ 5 ราย วินิจฉัย CDI จาก PCR แต่ cytotoxins A/B ELFA ผลเป็นลบ จึงไม่ได้รับการรักษา แต่ผลที่ตามมาผู้ป่วยหายจากอาการถ่ายเหลวทั้ง 5 ราย ส่วนอีก 1 รายที่ได้รับการรักษาอย่างไม่เหมาะสม คือ ให้ยาผิดขนาดเสียชีวิต สุดท้ายกลุ่ม CDI ที่มีความรุนแรงมากได้รับการรักษาด้วยยาอย่างเหมาะสมแต่ไม่มีการหยุดยาที่อาจจะก่อให้เกิดความเสี่ยง 1 รายเสียชีวิต ข้อมูลแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13. แสดงความรุนแรงของ CDI การรักษาและผลการรักษา

ความรุนแรง	ความเหมาะสมในการรักษา	หยุดยาที่เป็นความเสี่ยงของ CDI	ผลการรักษา				
			Cure (N=14)	Persistence (N=2)	Recurrence (N=1)	Death (N=5)	Total
Mild/moderate	เหมาะสม	หยุด	5 (35.7)	1 (50)	1 (100)	2 (40)	9
		ไม่หยุด	4 (28.6)	1 (50)	0	1 (20)	6
	ไม่เหมาะสม	หยุด	0	0	0	0	0
		ไม่หยุด	5 (35.7)	0	0	1 (20)	6
Severe	เหมาะสม	หยุด	0	0	0	0	0
		ไม่หยุด	0	0	0	1 (20)	1
	ไม่เหมาะสม	หยุด/ไม่หยุด	0	0	0	0	0

หมายเหตุ 1. ผลที่แสดงเป็นจำนวนผู้ป่วย (ร้อยละ) ยกเว้นที่บ่งชี้ไว้

บทที่ 5

บทวิจารณ์

(discussion)

กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยหญิง (ร้อยละ 59.3) อายุเฉลี่ย 59.96±19.47 ปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัว (ร้อยละ 96.7) โดยจัดเป็นโรคในกลุ่มมะเร็งมากที่สุดจำนวน ร้อยละ 50 อาการสำคัญที่มาโรงพยาบาลจัดเป็นกลุ่มอาการของโรคติดเชื้อสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 59.3 และในจำนวนนี้มีความชุกของ CDI ร้อยละ 24.2

ระบาดวิทยา

จากจำนวนผู้ป่วย 91 รายที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อเข้าศึกษา พบความชุกของ CDI ร้อยละ 24.2 เมื่อทำการวินิจฉัยด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes คิดเป็น 0.97 ต่อ 10,000 patient-days จะเห็นว่าความชุกของการติดเชื้อสูงขึ้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลจากโรงพยาบาลต่างๆในประเทศไทยซึ่งส่งอุจจาระมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ anaerobic bacteria กระทรวงสาธารณสุข ในปีค.ศ. 2000-2001 พบความชุกของ CDI วินิจฉัยโดย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes ร้อยละ 18.64[51] ต่อมาในปีค.ศ. 2008 โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ทำการเก็บข้อมูลในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่มีอาการถ่ายเหลว รายงานความชุกของ CDI เพียงร้อยละ 12.3 แต่การศึกษาจากโรงพยาบาลศิริราชมีข้อจำกัด ได้แก่ การวินิจฉัยจาก ผล cytotoxins A/B หรือ การพบลักษณะ pseudomembranous colitis จาก colonoscopy หรือ ลักษณะเฉพาะจาก CT scan ช่องท้อง เนื่องจาก PCR มีความไวที่สูงกว่า[2] ส่วนข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีรายงานความชุกของ CDI ที่เพิ่มขึ้นเท่าตัว จากปีค.ศ. 1996 ถึงปีค.ศ. 2003 (31 ต่อ 100,000 ประชากร เป็น 61 ต่อ 100,000 ประชากร) โดยความชุกเพิ่มมากที่สุดในช่วงปีค.ศ. 2000-2003 และในประชากรที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปี[83] ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศไทยจะเห็นว่ามีความชุกที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ร้อยละ

15-25 คิดเป็น 13.1 รายต่อผู้ป่วย 1,000 ราย ในค.ศ. 2008 [3, 4] ในทวีปเดียวกัน ได้แก่ ข้อมูลจากประเทศแคนาดา Pepin และคณะก็ได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการติดเชื้อ CDI ใน Quebec ช่วงปีค.ศ. 1991 จนถึงปีค.ศ. 2003 โดยพบความชุกที่เพิ่มขึ้น จาก 35.6 ต่อ 100,000 ประชากร เป็น 156.3 ต่อ 100,000 ประชากร ซึ่งร่วมไปกับความรุนแรงที่เพิ่มมากขึ้น อัตราเสียชีวิตและภาวะแทรกซ้อนเพิ่มมากขึ้น โดยความชุกที่เพิ่มขึ้นมากอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปีเช่นเดียวกัน[84] นอกจากนี้ในเดือนมีนาคม ค.ศ. 2003 Loo และคณะได้รายงานการระบาดของ CDI จากโรงพยาบาลใน Quebec ประเทศแคนาดา โดยพบอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นจาก 6 ต่อ 1,000 ของการรับผู้ป่วยเข้าในโรงพยาบาล (incidence per 1,000 admissions) และอัตราเสียชีวิตร้อยละ 1.5 ในปีค.ศ. 1997 เพิ่มขึ้นเป็น 22.5 ต่อ 1000 ของการรับผู้ป่วยเข้าในโรงพยาบาล (incidence per 1,000 admissions) และอัตราเสียชีวิตที่ 30 วันเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 6.9 (30-day attributable mortality rate) โดยได้ทำการศึกษาพบว่ามีการระบาดของสายพันธุ์ B1/NAP1/027 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการได้รับยา fluoroquinolones [odds ratio (OR) 3.9; 95%CI 2.3-6.6] และ cephalosporins (OR 3.8; 95%CI 2.2-6.6) รวมถึงมีการสร้าง binary toxins มากกว่าร้อยละ 80[29] เช่นเดียวกับข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริกา McDonald และคณะรายงานความชุกของการติดเชื้อ CDI B1/NAP1/027 strain ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 50[85]

แต่เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลจากประเทศในทวีปยุโรป พบว่า ความชุกของ CDI ทั้งในประเทศไทยและสหรัฐอเมริกานั้น สูงมากเมื่อเทียบกับประเทศในกลุ่มยุโรป กล่าวคือ ข้อมูลจาก 73 โรงพยาบาลใน 26 ประเทศ รวบรวมข้อมูลการวินิจฉัย CDI ด้วยวิธีการตรวจ cytotoxins ทั้งจาก cytotoxins EIA A/B หรือ PCR for *tcdA* หรือ *tcdB* genes พบว่า เฉลี่ยความชุกของ CDI เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก 2.45 ต่อ 10,000 patient-days ในปีค.ศ. 2005 เป็น 4.1 ต่อ 10,000 patient-days ในปีค.ศ. 2008[86] ถ้าดูข้อมูลรายประเทศ ตัวอย่าง ได้แก่ ประเทศสเปนซึ่งวินิจฉัย CDI ด้วย cytotoxins A/B EIA มีความชุกของ CDI 1.93 ต่อ 10,000 patient-days ในปีค.ศ. 2009[87] หรือประเทศอิตาลีซึ่งวินิจฉัย CDI ด้วย cytotoxins A/B EIA เช่นเดียวกันมีความชุกของ CDI จากร้อยละ 4.9 ในปีค.ศ. 2006 เป็นร้อยละ 11.2 ในปีค.ศ. 2011 คิดเป็น 2.3 ต่อ 10,000 patient-days[16] อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าปัญหา CDI พบมาก

ขึ้นในประเทศแถบยุโรปเช่นกัน จึงสามารถเรียกได้ว่า CDI เป็นปัญหาใหญ่ของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลทั่วโลก

ในการศึกษานี้ ได้ทำการทดสอบ PCR ทั้ง *tcdA* และ *tcdB* genes พบว่า กลุ่ม *tcdA* geneบวก และ *tcdB* gene (A+B+) บวก เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 68.2 รองลงมา คือ กลุ่ม *tcdA* gene บวกและ *tcdA* gene deletion (B+Adel) ร้อยละ 22.7 สุดท้ายกลุ่ม *tcdB* gene บวกและ *tcdA* gene (A-B+) ลบ ร้อยละ 9.1 สำหรับ กลุ่ม *tcdB* gene บวกและ *tcdA* gene deletion (B+Adel) นั้นหมายถึง ในการทำ PCR สามารถ amplification *tcdA* gene ได้ ในตำแหน่งที่ต่างไปจากตำแหน่งของ *tcdA* gene ปกติ ด้วย primers ที่ใช้ทดสอบ[81] ส่วนกลุ่ม *tcdB* gene บวกและ *tcdA* gene ลบ (A-B+) นั้นอาจจะเกิดจากปริมาณเชื้อที่น้อยเกินไปจนกระทั้งไม่สามารถ amplify ได้ (false negative) หรือเป็น *tcdA* gene variant ที่ตำแหน่งแตกต่างไปจากเดิม และสามารถตรวจพบได้ด้วย primers ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

ในปีค.ศ. 2000-2001 ว่องวานิชและคณะได้ทำการศึกษาโดยเก็บอุจจาระจากผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวและสงสัยว่าจะเป็น CDI จากโรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย และจากอุจจาระที่ส่งไปที่ห้องปฏิบัติการ anaerobic bacteria กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 574 ราย ทำการศึกษาโดยทำ in-house PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes โดยใช้ primers จากการศึกษาของ Kato และคณะ[82] พบว่าสามารถตรวจพบผล PCR เป็นบวกร้อยละ 18.64 โดยทุกรายตรวจพบทั้ง *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นบวก ยกเว้นเพียงรายเดียวที่ตรวจพบเพียง *tcdB* gene เป็นบวกจากอุจจาระ แต่เมื่อนำอุจจาระมาเพาะเชื้อ *C. difficile* เสียก่อนแล้วจึงนำมาตรวจหา *tcdA* และ *tcdB* genes กลับพบทั้ง 2 genes แสดงให้เห็นว่าการตรวจพบ *tcdB* gene เป็นบวกเพียงอย่างเดียว (A-B+) จากอุจจาระน่าจะเป็นจาก *tcdA* gene สลายไปก่อนที่จะทำการตรวจมากกว่าเป็น strain A-B+[51] จึงเห็นได้ว่ายังไม่มีรายงานการพบ strain A-B+ ในประเทศไทยมาก่อน

เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชีย ประเทศญี่ปุ่น ในปีค.ศ. 2000 พบอัตราชุกของ CDI A-B+ strain ร้อยละ 39 โดยอาการและอาการแสดงไม่แตกต่างกับ strain A+B+

อย่างมีนัยสำคัญ[88] เช่นเดียวกับข้อมูลจากประเทศเกาหลี รายงานความชุกร้อยละ 21.4 ในปีค.ศ. 2008[89] แต่ข้อมูลจากประเทศทวีปยุโรป พบว่ารายงานจากสหราชอาณาจักร และประเทศฝรั่งเศสมีความชุกของ strain A-B+ เพียงร้อยละ 3 และ 3 ตามลำดับ[21] ส่วนข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริการายงานความชุกของ strain A-B+ ก็อยู่ที่เพียงร้อยละ 1-2[26] อย่างไรก็ตามถึงแม้อัตราชุกจะแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เมื่อศึกษา ribotype ของ *C. difficile* พบว่าส่วนใหญ่ strain A-B+ จัดอยู่ในกลุ่ม ribotype 17, toxinotype VIII กล่าวคือ มี 1.8 kb deletion ที่ *tcdA* gene เหมือนกันทั้งจากทวีปเอเชีย อเมริกาและยุโรป

โรคประจำตัวของผู้ป่วย CDI

ข้อมูลจากการศึกษานี้ ประกอบด้วยผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะเพียง 8 ราย เป็นการปลูกถ่ายไขกระดูก 1 รายและไม่พบการติดเชื้อ CDI ในผู้ป่วยทั้ง 8 รายนี้เลย จึงยังไม่สามารถบอกถึงอัตราชุกของการเกิด CDI ในผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะในสถาบันของเราได้อย่างแน่ชัดนัก เนื่องจากผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะจะต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งการขาด humoral immune response (HMI) เป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค CDI มากขึ้น 4-5 เท่า และยังส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อประจำถิ่น จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะที่เกิด CDI มีอัตราการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงร้อยละ 80 นอกจากความเสี่ยงที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการใช้ยาลดกรด และอาจจะได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อร่วมอีกด้วย ในปัจจุบันจึงมีรายงานการติดเชื้อ CDI ในผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะเพิ่มมากขึ้น โดยเฉลี่ยความชุกในผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะต่างๆ เป็นดังนี้ ตับ ไต ตับอ่อนร่วมกับไต ลำไส้ หัวใจ และปอด อยู่ที่ร้อยละ 3-19, 3.5-16, 1.5-7.8, 9, 8-15 และ 7-31 ตามลำดับ[90] เมื่อดูข้อมูลรายประเทศ พบว่าเดิมในประเทศสเปนรายงานอัตรา CDI ยังต่ำเพียงร้อยละ 0.94[91] ในช่วงปีค.ศ. 2003-2006 แต่ในประเทศแคนาดา รายงานอัตราเกิด CDI ใน solid organ transplant (SOT) recipients ช่วงปีค.ศ. 2010 ร้อยละ 9.5[92] ส่วนในสถาบันของเราที่เริ่มมีการถูกถ่ายอวัยวะเพิ่มมากขึ้น แต่ยังไม่ทราบข้อมูลการติดเชื้อ CDI ควรจะเริ่มมีการเฝ้าระวัง ป้องกันและศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงกลุ่มนี้

ความเสี่ยงของการก่อโรค CDI

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นความเสี่ยงของ CDI ที่สำคัญที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาเคมีบำบัด และยาลดกรด โดยมีความชุก CDI ร้อยละ 22.4 และ cephalosporins เป็นยากลุ่มที่มีอัตราการเกิด CDI สูงสุดคือ ร้อยละ 41.7 เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในอดีตของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบว่าข้อมูลในช่วงปีค.ศ. 2002-2005 cephalosporins เป็นยาที่มีการสั่งใช้มากที่สุด ถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานความชุกของ CDI ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาแต่ละชนิดโดยตรง แต่เป็นการเก็บข้อมูลจากผู้ป่วย CDI ทั้งหมด[38] แตกต่างจากการศึกษานี้ แม้ว่า cephalosporins จะเป็นยาที่มีการสั่งใช้เป็นอันดับ 2 รองจากกลุ่ม beta-lactam/beta-lactamase inhibitors (BL/BIs) ก็ตาม แต่เป็นยาที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด CDI มากที่สุด ส่วนข้อมูลจากโรงพยาบาลศิริราช ในปีค.ศ. 2008 ทิพย์มนตรีและคณะยังคงรายงานอัตราการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporins สูงที่สุดในกลุ่มผู้ป่วย CDI และส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ได้รับยามากกว่าหรือเท่ากับ 2 ชนิดขึ้นไป[2] จากรายงานประเทศไต้หวัน ในปีค.ศ. 2011 พบว่าการได้รับยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดเป็นความเสี่ยงต่อการ colonization ด้วย toxigenic *C. difficile* คิดเป็น p=0.01 (OR 6.67; 95%CI 1.41–31.56) ซึ่งจากการศึกษานี้ผู้ป่วยที่มี toxigenic *C. difficile* colonization เกิด CDI ตามมาร้อยละ 4.2 (7 จาก 168 ราย)[93] เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ เป็นที่ทราบกันดีว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ เป็นความเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของการเกิด CDI และ cephalosporins เป็นยาที่ได้รับการรายงานในการก่อโรคสูงที่สุด ไม่ว่าจะเป็นข้อมูลจากทางทวีปอเมริกา[18, 94] หรือยุโรป[86] ซึ่งส่วนหนึ่งอาจจะเป็นเพราะ cephalosporins เป็นยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมกว้างกว่า narrow-spectrum penicillins จึงมีผลต่อเชื้อประจำถิ่นในลำไส้มากกว่า ร่วมกับยากลุ่มนี้เป็นยาที่มีการสั่งใช้จำนวนมาก จึงมีรายงานความชุกของ CDI มากกว่ายาชนิดอื่น[18, 95] ดังจะเห็นว่าจากการศึกษานี้ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับยาและไม่ได้รับ cephalosporins อัตราการเกิด CDI จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.08) นอกจากนี้เมื่อประเมินความเสี่ยงของ cephalosporins ต่อการเกิด hypervirulence B1/NAP1/027 strain กลับพบว่ามีแนวโน้มที่จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด strain อื่นๆมากกว่า (OR 0.70; 95%CI 0.46–1.07)[96]

ข้อมูลที่น่าสนใจคือ ข้อมูลของยาในกลุ่ม BL/BI ซึ่งพบว่ามีอัตราการใช้สูงที่สุดในการศึกษานี้ มีรายงานการเกิด CDI เพียงร้อยละ 16.7 (4 จาก 39 ราย) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เกิด CDI 35 ราย จาก 39 ราย พบว่าในกลุ่มที่ใช้ยาและไม่เกิด CDI น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.03) ในปีค.ศ. 2005 Baines และคณะได้ทำการศึกษาผลของ piperacillin/tazobactam ซึ่งเป็นยากลุ่ม BL/BI ต่อการเกิด CDI ในโมเดลของลำไส้มนุษย์ พบว่า piperacillin/tazobactam ส่งผลให้เชื้อประจำถิ่นลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบได้ รวมถึงเชื้อกลุ่ม anaerobes ได้แก่ *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ในขณะที่ *C. difficile* คงอยู่ในปริมาณเท่าเดิมในรูปแบบของ spores โดยไม่พบปริมาณหรือการสร้าง cytotoxins ที่เพิ่มขึ้น[97] ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดโรคในมนุษย์ Shah และคณะรายงานความเสี่ยงของการเกิด CDI และการได้รับยา piperacillin/tazobactam มากกว่า 7 วันว่ามีความเกี่ยวข้องกันอย่างมีนัยสำคัญ (OR 2.4; 95% CI 1.3– 4.5; P=0.0067)[98] เช่นเดียวกับข้อมูลของการใช้ amoxicillin/clavulanic acid ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิด CDI อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน[99] การที่ผลของการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลที่มีมาก่อน อาจเกิดจากปริมาณผู้ป่วยไม่พอ จึงไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของยากลุ่ม BL/BI กับ CDI ได้

สำหรับยาในกลุ่ม fluoroquinolones จากการศึกษานี้พบว่ามีอัตราการใช้ต่ำเพียง 2 รายจากประชากรตัวอย่างทั้งหมด และไม่เกิด CDI ซึ่งแตกต่างกับข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีการใช้ยากลุ่มนี้เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการระบาดของ hypervirulence strain B1/NAP1/027[35]

ในเรื่องของจำนวนวันเฉลี่ยของการได้รับยาปฏิชีวนะก่อนเกิด CDI คือ 12.14$\pm$8.9 วัน มีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลจากการศึกษาของ Hensgens และคณะ ซึ่งพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะมากกว่าหรือเท่ากับ 14 วันภายในช่วง 3 เดือนมีความสัมพันธ์กับการเกิด CDI (OR 8.5; 95%CI 4.56–15.9) และความเสี่ยงยังคงอยู่ในช่วง 3 เดือนหลังหยุดยา โดยจะสูงสุดมากกว่า 6 เท่าในช่วง 1 เดือนแรกหลังหยุดยา[94]

จากการศึกษานี้ ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีประวัติได้รับยาเคมีบำบัดทั้งหมด 55 ราย เกิด CDI ร้อยละ 14.5 โดยไม่พบความสัมพันธ์ของการได้รับยาเคมีบำบัดและ CDI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.07) โดยยาเคมีบำบัดกลุ่ม antibiotic หรือ anthracyclin พบ CDI มากที่สุด คือ 4 ราย คิดเป็นร้อย

ละ 50 ของผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดและเกิด CDI นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วย CDI 1 รายที่ได้รับยาเคมีบำบัด คือ doxorubicin และ vincristine แต่ไม่เคยได้รับยาปฏิชีวนะเลย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของภู่ไพบูลย์และคณะ รายงานผู้ป่วย CDI ได้รับยาเคมีบำบัดสูงถึง ร้อยละ 21.4 แต่ไม่มีข้อมูลของการได้รับยาปฏิชีวนะที่ควบคู่ไปกับยาเคมีบำบัด[38] ส่วนรายงานของทิพย์มนตรีและคณะแสดงความสัมพันธ์ของผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดและเกิด CDI ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.04; OR 2.11; 95%CI 1.03-4.41) และมีผู้ป่วย CDI ที่ได้รับยาเคมีบำบัดแต่ไม่มีประวัติการได้รับยาปฏิชีวนะเลย 2 ราย[2] ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งรายงานอัตราชุกของ CDI ที่เพิ่มขึ้น 2 เท่าในผู้ป่วยมะเร็งหรือเปลี่ยนถ่ายไขกระดูกเมื่อเทียบกับผู้ป่วยทั่วไป ได้แก่ 15.8 และ 7.4 ต่อ 10,000 patient-days ตามลำดับ[100] ในปีค.ศ. 2001 Gorschluter และคณะ รายงานความชุกของ CDI สูงถึงร้อยละ 7 ต่อการได้รับยาเคมีบำบัด 1 รอบ และเกิด CDI แบบที่มีความรุนแรงมากร้อยละ 8.2[101] de Blank และคณะรายงานความสัมพันธ์ของ CDI ในผู้ป่วยเด็กและภายหลังการได้รับยาเคมีบำบัด 8-14 วัน โดยทำ multivariate analysis พบว่า OR=1.942 (95%CI 1.491-2.529)[102] โดยไม่พบความสัมพันธ์ในช่วง 7 วันแรกของการรับยาเคมีบำบัด ส่วนชนิดของยาที่มีรายงานความเกี่ยวข้อง ได้แก่ methotrexate, fluorouracil, cyclophosphamide, doxorubicin, cisplatin, paclitaxel and vinorelbine[103] ในเรื่องของปัจจัยที่ก่อให้เกิด CDI ในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด ยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจนนัก นอกจากเรื่องชนิดของยาเคมีบำบัด ซึ่งชนิดที่มีรายงานมากที่สุด ก็คือยาเคมีบำบัดกลุ่ม cytotoxic antibiotics ได้แก่ doxorubicin, idarubicin เป็นต้น ความสัมพันธ์ในการเกิด CDI กับยาเคมีบำบัด จึงเป็นผลจากปัจจัยอื่นนอกเหนือจากตัวยาเคมีบำบัดแต่ละชนิดเองโดยตรง กล่าวคือ เรื่องของ neutropenia, mucositis หรือ การขาด IgG ที่ตอบสนองต่อ *C. difficile* colonization[102, 103]

จะเห็นได้ว่าจากการศึกษานี้ผลไม่สอดคล้องกับข้อมูลจากการศึกษาอื่นๆ รวมถึงการศึกษาภายในสถาบันเดียวกันในอดีตด้วย[38] ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่จำนวนผู้ป่วยไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์นี้ได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ในเรื่องของจำนวนวันที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว จากการศึกษานี้เฉลี่ย 11.5$\pm$13 วัน (median$\pm$IQR) ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับการศึกษาของ de Blank และคณะที่รายงาน

ระยะเวลาที่เกิด CDI ภายหลังได้รับยาเคมีบำบัด 8-14 วัน[102] อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เกิด CDI ได้รับยาปฏิชีวนะควบคู่ไปกับยาเคมีบำบัด จึงเป็นเรื่องลำบากที่จะระบุได้ว่าระยะเวลาของการได้ยาเคมีบำบัดนั้นๆสัมพันธ์กับการเกิด CDI หรือไม่ อย่างไร

จากการศึกษานี้ ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีประวัติได้รับยาลดกรดทั้งหมดร้อยละ 58.2 เกิด CDI ร้อยละ 22.6 จะเห็นได้ว่ามีอัตราใกล้เคียงกับข้อมูลในสถาบันของเราเมื่อในอดีต กล่าวคือ การศึกษาของภู่ไพบูลย์และคณะ รายงานอัตราการใช้ยาลดกรดร้อยละ 55.4 ในผู้ป่วย CDI[38] เช่นเดียวกับรายงานของทิพย์มนตรีและคณะแสดงความสัมพันธ์ของผู้ป่วยที่ได้รับยาลดกรดและเกิด CDI ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P=0.014 (OR 3.27; 95%CI 1.27-8.4)[2] เป็นที่รู้กันมานานแล้วว่า ยาลดกรดกลุ่ม proton-pump inhibitors (PPIs) มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด CDI อย่างมีนัยสำคัญ โดยความเสี่ยงจะสูงชัดเจนในกลุ่มที่ได้รับ PPIs ควบคู่ไปกับยาปฏิชีวนะภายในช่วง 2 สัปดาห์แรก (number needed to harm, NNH 50) แต่ถ้าเป็นการใช้ PPIs ในประชากรทั่วไป ความสัมพันธ์กับการเกิด CDI นั้นไม่ชัดเจน (NNH 3,925 ที่ 1 ปี)[104] จากการศึกษาของ Janarthanan และคณะ รายงานความชุกที่เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 65 ในผู้ที่ใช้ PPIs และรายงานความเสี่ยงของ CDI ที่เพิ่มขึ้นอีก 1.5-2.5 เท่า[39] นอกจากการติดเชื้อครั้งแรกแล้ว Kwok และคณะยังรายงานการใช้ PPIs ที่สัมพันธ์กับการเกิดการติดเชื้อซ้ำ (recurrent CDI) อีกด้วย (OR 2.5; 95%CI 1.16–5.44; P=0.005)[105] สำหรับยาลดกรดในกลุ่ม histamine 2 receptor antagonists (H2RAs) ข้อมูลจากการศึกษานี้ ประกอบด้วยผู้ได้รับ H2RAs เพียง 8 ราย มีความชุกของการเกิด CDI ร้อยละ 8.3 (1 ราย) จึงไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของการเกิด CDI และ H2RAs ได้ แต่จากรายงานของ Tleyjeh และคณะพบว่าความเสี่ยงของ CDI จะสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ H2RAs ควบคู่ไปกับยาปฏิชีวนะภายในช่วง 2 สัปดาห์แรก (NNH 58) และเช่นเดียวกับการใช้ PPIs ในประชากรทั่วไป ความสัมพันธ์ของ H2RAs กับการเกิด CDI นั้นไม่ชัดเจน (NNH 4,549 ที่ 1 ปี)[104] ในเรื่องของจำนวนวันที่ได้รับยาลดกรดก่อนเกิดอาการถ่ายเหลว จากการศึกษานี้เฉลี่ย 4.5$\pm$15 (median$\pm$IQR) วัน ซึ่งการที่จำนวนวันใช้ยาค่อนข้างสั้น น่าจะเป็นผลมาจากการที่การใช้ยาลดกรดใน

ผู้ป่วย CDI ของการศึกษานี้เป็นเพียงความเสี่ยงร่วมในการเกิด CDI เท่านั้น เนื่องจากผู้ป่วยในการศึกษานี้ไม่มีผู้ใดที่ได้รับยาลดกรดเป็นความเสี่ยงเพียงชนิดเดียว

ลักษณะทางคลินิก

กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่นำมาศึกษาครั้งนี้ มีอาการและอาการแสดงทาง systemic กล่าวคือ อาการไข้ ร้อยละ 54.5 อาการปวดท้องร้อยละ 50 ตรวจพบเม็ดเลือดขาวที่สูงกว่าปกติร้อยละ 13.6 และพบค่าการทำงานของไต (serum creatinine) ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 เท่า เพียง 1 ราย ซึ่งสอดคล้องไปกับระดับความรุนแรงของ CDI จะเห็นว่าในการศึกษานี้ ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระดับความรุนแรงน้อยถึงปานกลางถึงร้อยละ 95.5 อย่างที่เคยกล่าวมาแล้วข้างต้น อาการและอาการแสดงของ CDI มีความหลากหลายอย่างมาก แปรผันตามความรุนแรงของโรค ในระยะที่ความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง อาการก็มักจะจำกัดอยู่ที่ลำไส้ คือมีอาการถ่ายเหลวและ/หรืออาการปวดท้องเท่านั้น[3] สำหรับอาการไข้ที่พบถึงร้อยละ 54.4 จากการศึกษานี้ เป็นผลมาจากการที่ผู้ป่วยทั้งหมดร้อยละ 100 ในการศึกษานี้มีโรคร่วมอื่นๆ ที่อาจส่งผลให้เกิดไข้ได้เช่นกัน

สำหรับอาการและอาการแสดงเฉพาะที่ ได้แก่อาการถ่ายเหลว พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย watery diarrhea มีความชุกของการเกิด CDI ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.02) เนื่องจาก CDI เป็นโรคที่มี toxin ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้[19-21] จึงพบว่าผู้ป่วย CDI มักจะมีอาการถ่ายเหลวเป็นมูก หรือมีเม็ดเลือดแดงที่พบจากการตรวจ แต่อาการถ่ายเป็นเลือดสดนั้นพบน้อย[26] สอดคล้องกับการศึกษานี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการถ่ายเป็น watery diarrhea มีความสัมพันธ์กับการไม่เป็น CDI และการตรวจพบเม็ดเลือดขาวในอุจจาระมากกว่าหรือเท่ากับ 10 เซลล์/HPF มีความสัมพันธ์กับการเกิด CDI อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.046)

ผลการทดสอบจำแนกตามวิธีการทดสอบแต่ละประเภท

การศึกษานี้ พบว่าผลการคัดกรอง CDI ด้วย GDH EIA มี sensitivity ร้อยละ 95.5 และ specificity ร้อยละ 66.7 ส่วนการทดสอบโดยใช้ cytotoxins A/B ELFA ซึ่งเดิมในสถาบันของเราใช้เป็นการทดสอบเพื่อวินิจฉัย CDI นั้น พบว่ามี sensitivity ร้อยละ 72.7 และ specificity ร้อยละ 95.7

การทดสอบนี้ใช้ชุดทดสอบ Premier™ *C. difficile* GDH (Meridian®) ซึ่งได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับจาก US FDA โดยข้อมูลจากบริษัทให้ sensitivity ร้อยละ 94 แต่ด้วยวิธีการทดสอบในการศึกษานี้ได้ sensitivity มากกว่าเป้าหมาย แสดงถึงการไม่มีข้อจำกัดในการทดสอบด้วยผู้ที่ไม่เคยใช้การทดสอบนี้มาก่อน แต่ก็มีข้อจำกัดของชุดทดสอบ ได้แก่ ถ้าอุจจาระมีการปนเปื้อนด้วย *S. aureus* (Cowan strain I) และ *Clostridium sporogenes* ผลการทดสอบอาจให้ผลเป็นบวกได้ (ข้อมูลจาก package insert data: Premier™ *C. difficile* GDH (Meridian®)) นอกจากนี้การทดสอบ GDH EIA ยังไม่เคยมีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยมาก่อน การนำชุดทดสอบเข้ามาเพียงเพื่องานวิจัยเป็นผลให้ชุดทดสอบยังมีราคาสูง (ประมาณ 450 บาทต่อ 1 ชุดทดสอบ) และเวลาที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นการตรวจ EIA ใช้เวลาจนกระทั่งได้ผลทดสอบ ประมาณ 3 ชั่วโมง

สำหรับการทดสอบ cytotoxins A/B ELFA ในการศึกษานี้ใช้ชุดทดสอบ VIDAS® ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้ในเวชปฏิบัติของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้ใช้มีความชำนาญในการทดสอบอยู่แล้ว โดยข้อมูลจากบริษัทให้ sensitivity ร้อยละ 88.3 และ specificity ร้อยละ 99.8 ส่วนการศึกษาของ Eastwood และคณะ ในการนำ VIDAS® *C. difficile* Toxin A& B มาศึกษาในอุจจาระ เปรียบเทียบกับ cytotoxigenic culture พบว่ามี sensitivity ร้อยละ 80 และ specificity ร้อยละ 97.3[61] แต่การนำมาใช้ทดสอบจริงในการศึกษานี้กลับพบ sensitivity เพียงร้อยละ 72.7 ซึ่งผลการทดสอบอาจได้รับผลกระทบจากความถูกต้องในการเก็บอุจจาระเพื่อนำส่งตรวจ และ toxin เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำในสิ่งแวดล้อม [26] เป็นผลให้ sensitivity ต่ำกว่าที่ควร โดยปริมาณขั้นต่ำที่สุดของ toxin ที่จะสามารถตรวจพบได้คือมากกว่าหรือเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ toxin A และ มากกว่าหรือเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ toxin B (ข้อมูลจาก package insert data: VIDAS® *C. difficile* Toxin A& B)

สำหรับการตรวจเพาะเชื้อ ในการศึกษานี้ใช้ phenylethyl alcohol agar เพื่อแยกเชื้อ anaerobe ก่อน หลังจากนั้นเมื่อพบเชื้อจะทำการ subculture ด้วย Brucella agar และนำ colony มาทดสอบ API 20A เพื่อยืนยันว่าเป็น *C. difficile* โดยในการศึกษานี้มี sensitivity ร้อยละ 81.8 และ specificity ร้อยละ 88.4 โดยจากการศึกษาของ Roe และคณะ พบว่า *Brucella* agar ที่มีส่วนผสมของ vitamin K และ hemin ซึ่งใช้ในการศึกษานี้เช่นกันสามารถเพาะเชื้อ anaerobe รวมถึง *C. difficile* ได้มากกว่าร้อยละ 95[106] โดย sensitivity จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.003$) ถ้ามีการผสม sodium taurocholate ร้อยละ 0.01-0.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ซึ่งจะมีผลให้ sensitivity ในการเพาะเชื้อไม่แตกต่างกับการใช้ cycloserine-cefoxitin-fructose agar (CCFA)[107]

สำหรับการตรวจ PCR ในการศึกษานี้ ใช้เป็น in-house PCR โดยใช้ primers *tcdA* gene จากการศึกษาของ Lemee และคณะ[81] และ primers *tcdB* gene จากการศึกษาของ Kato และคณะ[82] และเป็นการทดสอบที่กระทำขึ้นเพื่องานวิจัยเท่านั้น โดยยังมิได้ใช้จริงในเวชปฏิบัติ

Orendi และคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผู้ป่วยที่ผล cytotoxins A/B ELFA เป็นบวก และ GDH EIA เป็นบวก กับกลุ่มผู้ป่วยที่ผล cytotoxins A/B ELFA เป็นลบ GDH EIA เป็นบวก และผล PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นบวก พบว่าในกลุ่มแรก มีปริมาณเม็ดเลือดขาวในเลือดซึ่งเป็นค่าที่แสดงออกถึงความรุนแรงของ CDI มีค่ามากกว่ากลุ่มหลังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) ซึ่งอาจจะเป็นการบอกว่าในกลุ่มแรกที่ cytotoxins เป็นบวก กล่าวคือมีการสร้าง toxin ในปริมาณที่มากกว่าก็อาจจะมีความรุนแรงมากกว่ากลุ่ม CDI ที่ผล toxin เป็นลบ ซึ่งอาจจะเป็นกลุ่มที่มีการสร้าง toxin ในปริมาณที่น้อยกว่าก็เป็นได้[108] จากการศึกษาของ Orendi เมื่อนำมาประกอบในการแปลผลการทดสอบการศึกษานี้ พบว่ามีผู้ป่วยที่ผล cytotoxins A/B ELFA เป็นลบ แต่ผล PCR เป็นบวก 6 ราย โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้ 4 รายตรวจพบ GDH EIA เป็นบวกและปริมาณเม็ดเลือดขาวในอุจจาระน้อยกว่า 10 เซลล์/HPF จึงอาจเป็นไปได้ว่านอกเหนือจากการที่ cytotoxins A/B ELFA ได้ผลลบลวงจากการขั้นตอนการส่งตรวจที่ไม่เหมาะสม หรืออาจเกิดจากการที่มีปริมาณ cytotoxins ที่น้อย เป็นผลให้การอักเสบของลำไส้ไม่มากพอ จึงตรวจไม่พบเม็ดเลือดขาวในอุจจาระ แต่มีการติดเชื้อ CDI จริง และเป็น toxigenic

strain จึงเป็นผลให้ผลตรวจ GDH EIA และ PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นบวก โดยในจำนวนผู้ป่วย 4 ราย 2 รายสามารถเพาะเชื้อพบ *C. difficile* แต่อีก 2 รายไม่พบ เช่นเดียวกับผู้ป่วย 1 รายที่ผล cytotoxins A/B ELFA เป็นลบ ปริมาณเม็ดเลือดขาวในอุจจาระน้อยกว่า 10 เซลล์/HPF GDH EIA เป็นลบ ผลเพาะเชื้อไม่พบเชื้อ แต่ผล PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นบวก เนื่องจาก PCR มีความไวสูงกว่าการทดสอบชนิดอื่น จึงเป็นเพียงวิธีเดียวที่สามารถตรวจพบ toxigenic strain *C. difficile* ในปริมาณที่น้อยมากได้ สำหรับผู้ป่วย 2 รายที่ผล cytotoxins A/B ELFA borderline ปริมาณเม็ดเลือดขาวในอุจจาระน้อยกว่า 10 เซลล์/HPF แต่ GDH EIA เป็นบวก ผลเพาะเชื้อตรวจพบเชื้อ และผล PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นบวก นั้นก็อาจจะอธิบายได้ด้วยเหตุผลเดียวกันดังที่กล่าวข้างต้น หรืออาจเป็นผลจากการที่ toxin ถูกทำลายโดย proteases enzyme ในอุจจาระ[51]ก็เป็นได้ แต่สำหรับผู้ป่วย 1 รายที่ผล cytotoxins A/B ELFA เป็นลบแต่ปริมาณเม็ดเลือดขาวในอุจจาระมากกว่า 10 เซลล์/HPF GDH EIA เป็นบวก ผลเพาะเชื้อตรวจพบเชื้อ และผล PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นบวก นั้นน่าจะเป็นผลมาจากขั้นตอนการส่งตรวจที่ไม่เหมาะสม เป็นผลให้ toxin ที่ไม่สามารถคงสภาวะได้ในขณะทำการทดสอบ ข้อมูลแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14. แสดงผลการทดสอบ PCR, culture, GDH EIA และปริมาณเม็ดเลือดขาวในอุจจาระ (stool WBC) แบ่งตามผลการทดสอบ cytotoxins A/B ELFA

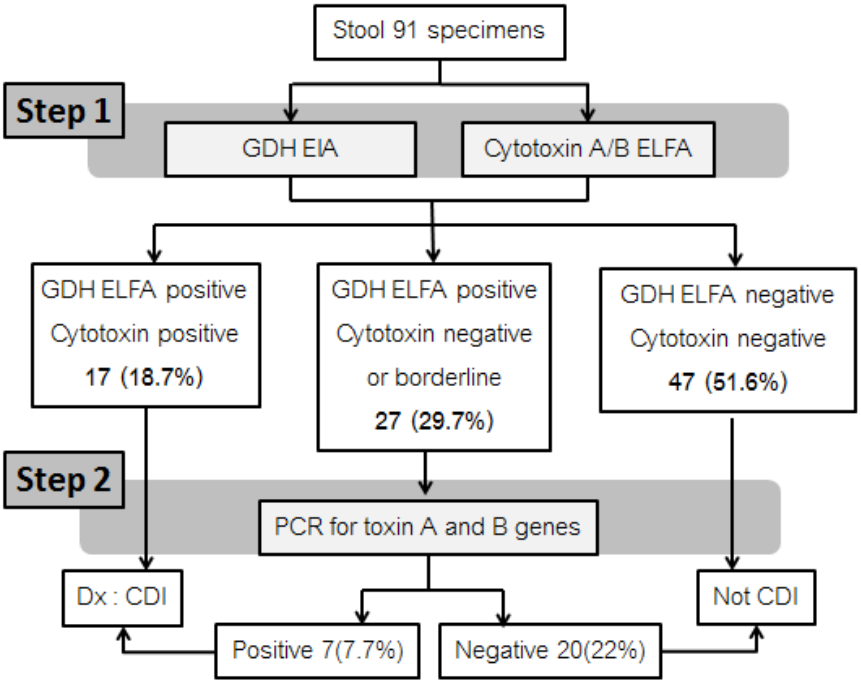
PCR	Culture	GDH	Stool WBC	Cytotoxins A/B		
				Borderline	ลบ	บวก
บวก	พบเชื้อ	บวก	Stool WBC < 10/HPF	2	2	9
			Stool WBC ≥10/HPF	0	1	4
	ไม่พบเชื้อ	บวก	Stool WBC <10/HPF	0	2	0
			Stool WBC ≥10/HPF	0	0	1
		ลบ	Stool WBC <10/HPF	0	1	0

การทดสอบเพื่อวินิจฉัย CDI แบบ 2 ขั้นตอน

การทดสอบแบบ 2 ขั้นตอน กล่าวคือขั้นตอนแรกทดสอบ GDH EIA ร่วมกับ cytotoxins A/B ELFA ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทแรก ผลของ GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA สอดคล้องกัน กล่าวคือถ้าผลเป็นบวกทั้ง 2 tests สามารถวินิจฉัยว่าเป็น CDI ได้เลย ถ้าผลเป็นลบทั้ง 2 tests สามารถวินิจฉัยว่าไม่เป็น CDI ได้เลยเช่นกัน ส่วนประเภทที่ 2 ผลของ GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ไม่สอดคล้องกัน แนะนำให้ทำการทดสอบขั้นที่ 2 ได้แก่ การตรวจ PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เพื่อยืนยันการวินิจฉัย

จากผลการทดสอบในการศึกษานี้ พบว่าเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในแบบทดสอบ 2 ขั้นตอน (two-step algorithm) พบว่าสามารถให้วินิจฉัยจากขั้นตอนแรกได้ถึงร้อยละ 70.3 โดยวินิจฉัย CDI ได้ร้อยละ 18.7 (17 ราย) อีกร้อยละ 51.6 วินิจฉัยได้ว่าอาการถ่ายเหลวนั้นไม่เป็น CDI และจำเป็นต้องทำการทดสอบในขั้นตอนที่ 2 คือ PCR อีกร้อยละ 29.7 และเพิ่มอัตราการวินิจฉัย CDI ได้อีกร้อยละ 7.7(7 ราย) โดยพบว่าในจำนวน 17 รายที่ผลการทดสอบ GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA เป็นบวก ได้ทำการทดสอบด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เพื่อยืนยันความถูกต้องของการใช้ GDH EIA และ cytotoxins A/B ELFA ในการวินิจฉัย CDI พบว่ามีผลบวกลวง 3 ราย (ร้อยละ 17.6) คิดเป็น sensitivity ร้อยละ 93.3 และผลลบลวง 1 ราย (ร้อยละ 2.1) specificity ร้อยละ 93.9 รูปแสดงดังภาพที่ 10

ภาพที่ 10. แสดงการทดสอบ 2 ขั้นตอนและผลการทดสอบ



สำหรับรายงานของ Fenner และคณะ เมื่อทำการทดสอบการวินิจฉัย CDI ด้วยวิธี two-step algorithm โดยทดสอบ GDH (C. DIFF CHEK-60) และตรวจยืนยันการพบ GDH test เป็นบวกด้วย *C. difficile* stool culture หรือ PCR for *gluD* gene (GDH gene) พบ sensitivity ของ GDH test ร้อยละ 93.6 และ specificity ร้อยละ 96.9 เมื่อนำอุจจาระที่ GDH test เป็นบวก มาทำการทดสอบขั้นที่ 2 ได้แก่ cytotoxins A/B (TOX A/B QUIK CHEK) ต่อ พบว่า sensitivity ของ GDH test ร้อยละ 97.1 และ specificity ร้อยละ 96.5 ส่วนอีกร้อยละ 8 ที่ผล GDH และ cytotoxins ไม่สอดคล้องกัน นำไปทำการเพาะเชื้อและตรวจ cytotoxins A/B ต่อ พบว่า มี GDH test ที่ให้ผลบวกลวง (false positive) ร้อยละ 2.7 โดยสรุปจากการศึกษานี้ เมื่อนำผลการทดสอบมาประยุกต์ใช้ในแบบของ two-step algorithm กล่าวคือ ขั้นตอนแรกทดสอบ GDH และ cytotoxins สามารถให้ผลที่สอดคล้องกัน และไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบต่อในขั้นตอนที่ 2 รวมร้อยละ 92[62]

แต่เดิม Gilligan ได้ทำการศึกษาการใช้ two-step algorithm ด้วยการทดสอบ GDH (GDH C. Diff Quik Chek (TechLab, Blacksburg, VA) ในขั้นตอนแรกและทดสอบ tissue culture cytotoxicity

neutralization assay (CTN) ในขั้นตอนที่ 2 เปรียบเทียบกับการตรวจ cytotoxins A/B EIA ซึ่งเป็นการทดสอบที่โรงพยาบาลส่วนใหญ่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยการศึกษานี้ใช้ชุดทดสอบ cytotoxins 2 ชนิด ได้แก่ solid-phase EIA, the Premier toxin A and B EIA (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH) และ EIA for *C. difficile* toxins A and B (Tox A/B Quik Chek; TechLab) พบว่าการผลตรวจ cytotoxins A/B มี sensitivity เพียงร้อยละ 59.5 และ 43.2 และ specificity ร้อยละ 99.4 และ 98.5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ two-step algorithm แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของการทดสอบ two-step algorithm ในการศึกษานี้ คือ ขั้นตอนที่ 2 การตรวจ CTN เป็นการทดสอบที่ใช้เวลาประมาณ 3 วัน ราคาแพง และต้องการผู้เชี่ยวชาญในการทำการทดสอบ[55]

ด้วยข้อจำกัดของวิธี CTN Goldenberg และคณะได้ทำการศึกษาการใช้ two-step algorithm อีกวิธีหนึ่ง ด้วยการทดสอบ GDH EIA (C. Diff Chek assay) ในขั้นตอนแรกและทดสอบ PCR for *tcdB* gene (BD GeneOhm *C. difficile* real-time PCR) ในขั้นตอนที่ 2 เปรียบเทียบกับการตรวจ cytotoxins A/B EIA (the Meridian Premier EIA) โดยใช้ culture/CTN เป็น gold standard test พบว่า ตรวจ cytotoxins A/B EIA มี sensitivity เพียงร้อยละ 39 และ specificity ร้อยละ 99 ส่วนวิธี two-step algorithm มี sensitivity ที่สูงกว่า คิดเป็นร้อยละ 94 และ specificity ร้อยละ 99 โดยจำนวนอุจจาระที่ต้องทำการทดสอบขั้นที่ 2 (PCR) ลดลงเหลือเพียงจำนวนร้อยละ 20 แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจ PCR ยังเป็นข้อจำกัดในประเทศของเรา การใช้ชุดทดสอบ PCR ที่ให้ผลได้รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูงนั้น ยังต้องการค่าใช้จ่ายจำนวนมาก ส่วนใหญ่แล้วในประเทศของเราการทดสอบ PCR มักจะใช้เป็นวิธี in-house PCR เพื่อลดต้นทุนในการทดสอบ ซึ่งจะใช้เวลานานกว่าในการให้ผลการทดสอบ ดังนั้นการใช้วิธี two-step algorithm ในแบบของ Goldenberg นั้น จึงยังมีข้อจำกัดในการนำมาประยุกต์ใช้[56]

เนื่องมาจากข้อจำกัดของทั้ง 2 วิธีข้างต้น Culbreath และคณะ จึงได้ทำการศึกษาเพื่อค้นหาขั้นตอนที่เหมาะสมที่สุดของวิธี two-step algorithm โดยทำการศึกษาชุดทดสอบ TechLab C. Diff Quik Chek Complete (GDH-toxin A/B ICA) ซึ่งสามารถทดสอบทั้ง 2 อย่างได้ในคราวเดียว และทดสอบ PCR (GeneXpert *C. difficile*) เปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีข้างต้นกับการทดสอบ CTN พบว่า ถ้าใช้ GDH-toxin A/B ICA เพียงขั้นตอนเดียว จะได้ผล sensitivity เพียงร้อยละ 42.3 และ specificity ร้อยละ

90.9 ถ้าใช้ CTN ในการทดสอบ จะได้ผล sensitivity เพียงร้อยละ 66.2 และ specificity ร้อยละ 86 แต่ถ้าใช้ PCR จะได้ผล sensitivity สูงถึงร้อยละ 98.6 และ specificity ร้อยละ 89.7 จึงเป็นที่มาของการเสนอให้ใช้วิธี GDH EIA ควบคู่ไปกับทดสอบ cytotoxins เป็นขั้นตอนแรก และ PCR เป็นขั้นตอนที่ 2 เพื่อลดข้อจำกัดดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงเป็นวิธีที่น่าจะเหมาะสมที่สุดสำหรับวิธี two-step algorithm[109]

เช่นเดียวกับรายงานของ Sharp และคณะซึ่งใช้แนวทางเดียวกับ Culbreath[109] กล่าวคือ ทดสอบ GDH และ cytotoxins A/B ในขั้นตอนแรก และทดสอบ PCR for *tcdB* gene ในการวินิจฉัยขั้นตอนที่ 2 พบว่าให้ความจำเพาะร้อยละ 99.6 และความไวร้อยละ 100 โดยการศึกษาของ Sharp อาศัย commercial kit test ทั้งหมด สามารถให้ผลการทดสอบทั้ง 2 ขั้นตอนได้ภายในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ในราคาเฉลี่ย 11.5 ดอลล่าสหรัฐ และ 44.8 ดอลล่าสหรัฐต่อ 1 ตัวอย่างถ้าตัวอย่างนั้นๆ ทดสอบและไม่ทดสอบ PCR ตามลำดับ [63]

ทั้งนี้ความไวของวิธีการทดสอบ two-step algorithm นั้น ที่สำคัญคือแปรผันตามความไวของการทดสอบ GDH[26] ซึ่งความไวของการทดสอบ GDH นั้นก็ยังมีข้อจำกัดในแต่ละ stain *ของ C. difficile* โดยจากการศึกษาของ Tenover และคณะ พบว่าการทดสอบ GDH EIA มี sensitivity ที่ต่ำกว่าการตรวจ PCR for *tcdB* gene ในบาง strain ได้แก่ ribotypes 002, 027, 106 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.005$)[110] นอกจากนี้ความถูกต้อง (accuracy) ของ algorithm ยังแปรผันตามการทดสอบที่ใช้ในการยืนยันการวินิจฉัย (confirmatory test) เนื่องจากการทดสอบที่ถือว่าเป็น gold standard สำหรับ CDI นั้น ยังเป็นที่ถกเถียง ระหว่าง tissue culture cytotoxicity neutralization หรือ การตรวจพบ toxigenic strain *C. difficile* ในอุจจาระ เนื่องจากแต่ละการทดสอบยังคงมีข้อดีและข้อด้อยของแต่ละการทดสอบที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามเป็นที่ยอมรับอย่างทั่วไปในปัจจุบันว่าการตรวจ PCR for *tcdB* gene มี sensitivity และ specificity ที่ดีกว่า toxigenic *C. difficile* culture โดยจากการศึกษาของ Larson และคณะทำการทดสอบ in-house PCR for *tcdB* gene โดยใช้ primers จากการศึกษาของ Kato และคณะ แบบเดียวกับการศึกษาของเรา เปรียบเทียบกับ modified gold standard ซึ่งประกอบด้วย tissue culture cytotoxicity และการตรวจ PCR for *tcdB* gene จากอุจจาระ มี

sensitivity ร้อยละ 97.5 และ specificity ร้อยละ 99.7[58] นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ CDI ร้อยละ 56 สามารถตรวจพบ *C. difficile* ในอุจจาระได้นานถึง 1-4 สัปดาห์ โดยไม่มีข้อมูลชัดเจนว่าการตรวจ PCR จะสามารถตรวจพบ toxigenic strain *C. difficile* ในอุจจาระภายหลังการรักษาได้อีกนานเท่าใด[111] ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะเลือกใช้วิธีการทดสอบเพื่อวินิจฉัย CDI ที่เป็นมาตรฐาน แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับ CDI ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Clinical Practice Guidelines for *C. difficile* Infection in Adults: 2010 updated by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)) ในปีค.ศ. 2010 จึงเสนอคำแนะนำให้ใช้วิธีทดสอบ 2 ขั้นตอนเป็นแนวทางปฏิบัติเพื่อการวินิจฉัย CDI อยู่ในระดับ B-II[26]

จากการศึกษานี้เราได้นำเสนอวิธี two-step algorithm ว่าเป็นวิธีที่เหมาะสม ด้วยความไวและความจำเพาะสูงที่สุดในการวินิจฉัย CDI เมื่อคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการทดสอบ GDH 450 บาท/test cytotoxins A/B ELFA 200 บาท/test และ in-house PCR 1,000 บาท/test ในกรณีที่ต้องทำขั้นตอนที่ 2 ร้อยละ 30 เพื่อยืนยันการวินิจฉัย รวมแล้วคิดเป็นราคา 68,000 บาทต่อการทำการวินิจฉัย 100 ครั้งหรือ 680 บาทต่อผู้ป่วย 1 ราย ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการทดสอบด้วย cytotoxins A/B ELFA เพียงอย่างเดียวประมาณ 3 เท่า หรือถ้าใช้การวินิจฉัย CDI ด้วย PCR เพียงอย่างเดียวในราคา 1,000 บาทจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบว่าต้องการค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น 2 เท่าและ 3 เท่าเมื่อเปลี่ยนมาใช้วิธี two-step algorithm หรือ PCR เพียงอย่างเดียว ตามลำดับ [112] หรือจากข้อมูลความชุกของ strain toxin A เป็นบวก และ toxin B เป็นลบ ซึ่งไม่พบในการศึกษาของเรา และยังไม่พบมีรายงานการก่อโรคด้วย strain นี้เลย อาจพิจารณาทำการทดสอบ PCR เพียงเฉพาะ *tcdB* gene เท่านั้น ซึ่งจะเป็นการลดค่าใช้จ่าย และเพิ่มความคุ้มค่าในการตรวจวินิจฉัยอีกด้วย

เมื่อคำนึงถึงประโยชน์ที่จะได้รับ จากเดิม cytotoxins A/B ELFA มี sensitivity ร้อยละ 72.7 ส่วนวิธี two-step algorithm มี sensitivity ร้อยละ 93.3 จะเห็นว่าสามารถวินิจฉัย CDI ได้เพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 20.6 แสดงให้เห็นถึงความคุ้มค่าของการทำการทดสอบเมื่อคำนึงถึงประโยชน์ที่จะได้รับ (cost-effectiveness)

การรักษา (treatment) และผลการรักษา (outcomes)

ในการศึกษานี้ ประกอบด้วยผู้ป่วยที่มีความรุนแรงระดับน้อยถึงปานกลางได้รับการรักษาด้วย metronidazole 500 มิลลิกรัม 3 ครั้งต่อวัน เป็นจำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 68.2 ได้รับการรักษาด้วย vancomycin ร้อยละ 4.5 (1 ราย) โดยผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย metronidazole ให้ผลการรักษาหายขาด (cure) ร้อยละ 40.9 ยังมีอาการถ่ายเหลวหลังการรักษา ร้อยละ 9.1 CDI กลับเป็นซ้ำ ร้อยละ 4.5 และเสียชีวิตร้อยละ 13.6 โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตนั้น ผู้ป่วยทุกรายเสียชีวิตด้วยสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่ CDI รวมถึงผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงเช่นกัน แม้ว่าจะได้รับการรักษาที่เหมาะสมแล้ว แต่ยังคงไม่ได้หยุดยาปฏิชีวนะ เนื่องจากมีการติดเชื้อแทรกซ้อนในกระแสเลือด โดยมีอัตราการหยุดยายาปฏิชีวนะในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย metronidazole เพียงร้อยละ 53.3 เมื่อเปรียบเทียบผลการรักษาของ metronidazole ในการศึกษาของเรากับ Zar และคณะพบว่าในกลุ่มผู้ป่วย CDI ที่มีความรุนแรงน้อยถึงปานกลางนั้น การรักษาด้วย metronidazole ยังให้ผลการรักษาหายขาดถึงร้อยละ 84[69] ดังนั้นการที่ผลการรักษาจากการศึกษานี้ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น อาจจะเนื่องมาจากการไม่ได้หยุดยาที่เป็นปัจจัยเสี่ยง

ข้อจำกัดของการศึกษานี้

1. การศึกษานี้ทำขึ้นโดยเก็บข้อมูลจากโรงพยาบาลเพียงแห่งเดียว และทำขึ้นเพื่อศึกษาในผู้ใหญ่เท่านั้น โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยของแผนกอายุรกรรม เนื่องจากการวางแผนเพื่อการศึกษาในขั้นต้นนั้น ตั้งใจทำในประชากรกลุ่มผู้ใหญ่ในสถาบันของเราก่อนที่จะมีการพัฒนาไปสู่ผู้ป่วยเด็ก ผู้ป่วยในแผนกและโรงพยาบาลอื่นๆ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาทั้งsensitivity และ specificity ควรจะเป็นค่าที่ไม่มีการแปรผันตามกลุ่มประชากร ในทางกลับกัน PPV และ NPV เป็นค่าที่แปรผันตามความชุกของ CDI เราเชื่อว่าผล sensitivity และ specificity จากการทดสอบทั้ง 4 ชนิดในสถาบันของเราสามารถเชื่อถือได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้า พบว่าผลไม่แตกต่างกัน

2. gold standard ในการวินิจฉัย CDI แต่เดิม ได้แก่ cytotoxigenic culture แต่ในการศึกษานี้เลือกใช้ PCR for toxin A และ toxin B แทน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการทดสอบด้วย PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป ว่าสามารถนำมาใช้ทดแทนได้[55-58]
3. การทดสอบ in-house PCR ในการศึกษานี้เป็นการทำขึ้นเป็นครั้งแรกในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เนื่องจากยังไม่ได้ทำการทดสอบกับ US FDA-approved commercial PCR test อย่างไรก็ตามการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้และมีการตีพิมพ์ในวารสารที่เป็นที่ยอมรับ ได้แก่ Journal of Clinical Microbiology, Journal of Hospital Infection เป็นต้น ได้ใช้ primers PCR จากการศึกษาของ Kato และคณะ[82] เช่นเดียวกับการศึกษานี้ ดังนั้นผู้จัดทำจึงไม่คิดว่าการทดสอบด้วย in-house PCR นี้จะเป็นข้อจำกัดในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามในอนาคตทางคณะผู้จัดทำได้วางแผนที่จะศึกษา in-house PCR นี้กับ US FDA-approved commercial PCR test
4. การทดสอบ GDH EIA เป็นการทดสอบที่มีการนำมาใช้เป็นครั้งแรกในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แต่เนื่องจากการทำ EIA เป็นวิธีที่ง่าย ขั้นตอนไม่ซับซ้อนและในการทดสอบทุกครั้งจะต้องมีการทำ negative และ positive controls เสมอ ดังนั้นการนำการทดสอบ GDH EIA มาประยุกต์ใช้ในทางเวชปฏิบัติจึงเป็นเรื่องที่กระทำได้อย่างง่ายดาย
5. การศึกษานี้ตั้งเป้าหมายในการประเมินความเสี่ยงของ CDI ไว้เป็นคำถามรอง เป็นผลให้ไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของ CDI ร่วมกับปัจจัยต่างๆได้ เนื่องจากจำนวนประชากรตัวอย่างไม่เพียงพอ

ข้อได้เปรียบของการศึกษานี้

1. เป็นการศึกษาแรกที่ทำการทดสอบในประเทศไทย ทั้งการทดสอบ GDH EIA ในการตรวจอุจจาระเพื่อคัดกรอง CDI และเปรียบเทียบผลการทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ GDH EIA, cytotoxins ELFA, culture และ PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes

2. เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้าการศึกษาแรก ที่ทดสอบ *C. difficile* strain ที่มีการสร้าง toxin A และ toxin B และพบ strain *tcdA* gene และ *tcdB* gene บวก (A+B+), *tcdA* gene ลบและ *tcdB* gene บวก (A-B+) และ *tcdB* gene บวกและ *tcdA* gene deletion (B+Adel) ซึ่งในความรู้ของเราการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงข้อมูลนี้ในสถาบันของเราและในประเทศไทย

การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

1. ทำการศึกษาเพื่อให้นำมาประยุกต์ใช้กับประชากรทั่วไปได้ โดยการเพิ่มจำนวนประชากรในแผนกและโรงพยาบาลอื่นๆ โดยอาจเปิดให้บริการการทดสอบกับโรงพยาบาลทั่วไป เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น
2. ทำการทดสอบความถูกต้อง แม่นยำของ in-house PCR กับ US FDA-approved commercial PCR test

การประยุกต์ใช้ผลการศึกษาในเวชปฏิบัติ

เราเสนอให้มีการประยุกต์ใช้วิธีทดสอบ 2 ขั้นตอนเพื่อการวินิจฉัย CDI ในเวชปฏิบัติ เพื่อที่จะได้จำนวนประชากรตัวอย่างที่เพิ่มมากขึ้น รวมถึงประชากรตัวอย่างจากแผนกอื่นๆนอกเหนือจากแผนกอายุรกรรม หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาการทดสอบ 2 ขั้นตอนซ้ำต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง (references)

1. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med 2002;346(5):334-9.
2. Thipmontree W, Kiratisin P, Manatsathit S, Thamlikitkul V. Epidemiology of suspected Clostridium difficile-associated hospital-acquired diarrhea in hospitalized patients at Siriraj Hospital. J Med Assoc Thai 2011;94 Suppl 1:S207-16.
3. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis 2008;46 Suppl 1:S12-8.
4. Jarvis WR, Schlosser J, Jarvis AA, Chinn RY. National point prevalence of Clostridium difficile in US health care facility inpatients, 2008. Am J Infect Control 2009;37(4):263-70.
5. Johnson S, Kent SA, O'Leary KJ, Merrigan MM, Sambol SP, Peterson LR, et al. Fatal pseudomembranous colitis associated with a variant clostridium difficile strain not detected by toxin A immunoassay. Ann Intern Med 2001;135(6):434-8.
6. Bartlett JG. Clostridium difficile infection: historic review. Anaerobe 2009;15(6):227-9.
7. Brazier JS. The diagnosis of Clostridium difficile-associated disease. J Antimicrob Chemother 1998;41 Suppl C:29-40.
8. Newman CR. Pseudomembranous enterocolitis and antibiotics. Ann Intern Med 1956;45(3):409-44.
9. Goulston SJ, McGovern VJ. Pseudo-membranous colitis. Gut 1965;6(3):207-12.
10. Larson HE, Parry JV, Price AB, Davies DR, Dolby J, Tyrrell DA. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. Br Med J 1977;1(6071):1246-8.
11. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of Clostridium in hamsters. J Infect Dis 1977;136(5):701-5.

12. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978;298(10):531-4.
13. Kelly P, Lamont JT. Antibiotic-Associated Diarrhea, Pseudomembranous Enterocolitis, and *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea and Colitis. In: Feldman M, Friedman L, Brandt L, editors. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 10 ed. Philadelphia: Saunders, An Imprint of Elsevier; 2010. p. 1889-909.
14. Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB, Eriksson S, Granstrom G, Lagergren L, et al. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. J Antimicrob Chemother 2001;47(1):43-50.
15. Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998;27(4):702-10.
16. Di Bella S, Musso M, Cataldo MA, Meledandri M, Bordi E, Capozzi D, et al. *Clostridium difficile* infection in Italian urban hospitals. Data from 2006 through 2011. BMC Infect Dis 2013;13(1):146.
17. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Infections caused by anaerobic bacteria. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical microbiology. 25 ed: McGraw-Hill; 2010.
18. Thielman NM, Wilson KH. Antibiotic-associated colitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7 ed. Philadelphia: Elsevier; 2009. p. 1375-87.
19. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev 1996;60(1):167-215.

20. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. J Clin Invest 1995;95(5):2004-11.
21. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Int J Infect Dis 2007;11(1):5-10.
22. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. N Engl J Med 2008;359(18):1932-40.
23. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, et al. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature 2009;458(7242):1176-9.
24. Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Moncrief S, Neville LM, Al-Barrak A, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000;38(7):2706-14.
25. van den Berg RJ, Claas EC, Oyib DH, Klaassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, et al. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping. J Clin Microbiol 2004;42(3):1035-41.
26. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol 2010;31(5):431-55.
27. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature 2010;467(7316):711-3.

28. Szczesny A, Martirosian G, Cohen S, Silva J, Jr. Co-infection of hamsters with toxin A or toxin B-deficient *Clostridium difficile* strains. Pol J Microbiol 2005;54(4):301-4.
29. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med 2005;353(23):2442-9.
30. Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A, et al. Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. Euro Surveill 2008;13(41).
31. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet 2013;45(1):109-13.
32. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev 2010;23(3):529-49.
33. Miller M, Gravel D, Mulvey M, Taylor G, Boyd D, Simor A, et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. Clin Infect Dis 2010;50(2):194-201.
34. Blossom DB, McDonald LC. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2007;45(2):222-7.
35. Pepin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. Clin Infect Dis 2005;41(9):1254-60.

36. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 2008;47(9):1162-70.
37. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. N Engl J Med 2011;365(18):1693-703.
38. Pupaibool J, Khantipong M, Suankratay C. A study of *Clostridium difficile*-associated disease at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand. J Med Assoc Thai 2008;91(1):37-43.
39. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2012;107(7):1001-10.
40. Owens RC, Jr., Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2008;46 Suppl 1:S19-31.
41. Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011;8(1):17-26.
42. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet 2001;357(9251):189-93.
43. Wilcox M, Minton J. Role of antibody response in outcome of antibiotic-associated diarrhoea. Lancet 2001;357(9251):158-9.
44. Marsh JW, Arora R, Schlackman JL, Shutt KA, Curry SR, Harrison LH. Association of relapse of *Clostridium difficile* disease with BI/NAP1/027. J Clin Microbiol 2012;50(12):4078-82.

45. Nair S, Yadav D, Corpuz M, Pitchumoni CS. Clostridium difficile colitis: factors influencing treatment failure and relapse--a prospective evaluation. Am J Gastroenterol 1998;93(10):1873-6.

46. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, et al. Fulminant *Clostridium difficile:* an underappreciated and increasing cause of death and complications. Ann Surg 2002;235(3):363-72.

47. DuPont HL. The search for effective treatment of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 2011;364(5):473-5.

48. Feldman RJ, Kallich M, Weinstein MP. Bacteremia due to *Clostridium difficile:* case report and review of extraintestinal *C. difficile* infections. Clin Infect Dis 1995;20(6):1560-2.

49. Kufelnicka AM, Kirn TJ. Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2011;52(12):1451-7.

50. Katz DA, Lynch ME, Littenberg B. Clinical prediction rules to optimize cytotoxin testing for *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea. Am J Med 1996;100(5):487-95.

51. Wongwanich S, Rugdeekha S, Pongpech P, Dhiraputra C. Detection of *Clostridium difficile* toxin A and B genes from stool samples of Thai diarrheal patients by polymerase chain reaction technique. J Med Assoc Thai 2003;86(10):970-5.

52. Kundrapu S, Sunkesula VC, Jury LA, Sethi AK, Donskey CJ. Utility of perirectal swab specimens for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2012;55(11):1527-30.

53. Aichinger E, Schleck CD, Harmsen WS, Nyre LM, Patel R. Nonutility of repeat laboratory testing for detection of *Clostridium difficile* by use of PCR or enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 2008;46(11):3795-7.

54. Bomers MK, van Agtmael MA, Luik H, van Veen MC, Vandenbroucke-Grauls CM, Smulders YM. Using a dog's superior olfactory sensitivity to identify *Clostridium difficile* in stools and patients: proof of principle study. BMJ 2012;345:e7396.
55. Gilligan PH. Is a two-step glutamate dehyrogenase antigen-cytotoxicity neutralization assay algorithm superior to the premier toxin A and B enzyme immunoassay for laboratory detection of *Clostridium difficile*? J Clin Microbiol 2008;46(4):1523-5.
56. Goldenberg SD, Cliff PR, Smith S, Milner M, French GL. Two-step glutamate dehydrogenase antigen real-time polymerase chain reaction assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile.* J Hosp Infect 2010;74(1):48-54.
57. Knetsch CW, Bakker D, de Boer RF, Sanders I, Hofs S, Kooistra-Smid AM, et al. Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2011;49(1):227-31.
58. Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of tcdB real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2010;48(1):124-30.
59. Wilkins TD, Lyerly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003;41(2):531-4.
60. Bartlett JG. Detection of *Clostridium difficile* infection. Infect Control Hosp Epidemiol 2010;31 Suppl 1:S35-7.
61. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. J Clin Microbiol 2009;47(10):3211-7.

62. Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2008;46(1):328-30.

63. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. J Clin Microbiol 2010;48(6):2082-6.

64. Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Gebhard RL, Schwartz MJ, et al. Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea and colitis. Lancet 1983;2(8358):1043-6.

65. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1996;22(5):813-8.

66. Nelson RL, Kelsey P, Leeman H, Meardon N, Patel H, Paul K, et al. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Cochrane Database Syst Rev 2011(9):CD004610.

67. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). MMWR Recomm Rep 1995;44(RR-12):1-13.

68. Al-Nassir WN, Sethi AK, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Jump RL, Donskey CJ. Comparison of clinical and microbiological response to treatment of *Clostridium difficile*-associated disease with metronidazole and vancomycin. Clin Infect Dis 2008;47(1):56-62.

69. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin Infect Dis 2007;45(3):302-7.

70. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 2011;364(5):422-31.
71. Cornely OA. Current and emerging management options for *Clostridium difficile* infection: what is the role of fidaxomicin? Clin Microbiol Infect 2012;18 Suppl 6:28-35.
72. Pepin J, Routhier S, Gagnon S, Brazeau I. Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec, Canada. Clin Infect Dis 2006;42(6):758-64.
73. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. Am J Gastroenterol 2002;97(7):1769-75.
74. Johnson S, Schriever C, Galang M, Kelly CP, Gerding DN. Interruption of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. Clin Infect Dis 2007;44(6):846-8.
75. Gerding DN, Johnson S. Management of *Clostridium difficile* infection: thinking inside and outside the box. Clin Infect Dis 2010;51(11):1306-13.
76. Abougergi MS, Kwon JH. Intravenous immunoglobulin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a review. Dig Dis Sci 2011;56(1):19-26.
77. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2011;53(10):994-1002.
78. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. N Engl J Med 2013;368(5):407-15.
79. Kelly CP. Fecal microbiota transplantation--an old therapy comes of age. N Engl J Med 2013;368(5):474-5.

80. Gordin FM, Schultz ME, Huber RA, Gill JA. Reduction in nosocomial transmission of drug-resistant bacteria after introduction of an alcohol-based handrub. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26(7):650-3.

81. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, et al. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2004;42(12):5710-4.

82. Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J Clin Microbiol 1998;36(8):2178-82.

83. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. Emerg Infect Dis 2006;12(3):409-15.

84. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ 2004;171(5):466-72.

85. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Jr., Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile.* N Engl J Med 2005;353(23):2433-41.

86. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011;377(9759):63-73.

87. Rodriguez-Pardo D, Almirante B, Bartolome RM, Pomar V, Mirelis B, Navarro F, et al. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: Results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. J Clin Microbiol 2013.

88. Komatsu M, Kato H, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, et al. High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22(9):525-9.
89. Kim H, Riley TV, Kim M, Kim CK, Yong D, Lee K, et al. Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. J Clin Microbiol 2008;46(3):1116-7.
90. Dubberke ER, Burdette SD. *Clostridium difficile* Infections in Solid Organ Transplantation. Am J Transplant 2013;13 Suppl 4:42-9.
91. Len O, Rodriguez-Pardo D, Gavalda J, Aguado JM, Blanes M, Borrell N, et al. Outcome of *Clostridium difficile*-associated disease in solid organ transplant recipients: a prospective and multicentre cohort study. Transpl Int 2012;25(12):1275-81.
92. Boutros M, Al-Shaibi M, Chan G, Cantarovich M, Rahme E, Paraskevas S, et al. *Clostridium difficile* colitis: increasing incidence, risk factors, and outcomes in solid organ transplant recipients. Transplantation 2012;93(10):1051-7.
93. Hung YP, Tsai PJ, Hung KH, Liu HC, Lee CI, Lin HJ, et al. Impact of toxigenic *Clostridium difficile* colonization and infection among hospitalized adults at a district hospital in southern Taiwan. PLoS One 2012;7(8):e42415.
94. Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. J Antimicrob Chemother 2012;67(3):742-8.
95. Wilcox MH, Shetty N, Fawley WN, Shemko M, Coen P, Birtles A, et al. Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national ribotyping-based surveillance scheme in England. Clin Infect Dis 2012;55(8):1056-63.

96. Vardakas KZ, Konstantelias AA, Loizidis G, Rafailidis PI, Falagas ME. Risk factors for development of *Clostridium difficile* infection due to BI/NAP1/027 strain: a meta-analysis. Int J Infect Dis 2012;16(11):e768-73.

97. Baines SD, Freeman J, Wilcox MH. Effects of piperacillin/tazobactam on *Clostridium difficile* growth and toxin production in a human gut model. J Antimicrob Chemother 2005;55(6):974-82.

98. Shah K, Pass LA, Cox M, Lanham M, Arnold FW. Evaluating contemporary antibiotics as a risk factor for *Clostridium difficile* infection in surgical trauma patients. J Trauma Acute Care Surg 2012;72(3):691-5.

99. Vesteinsdottir I, Gudlaugsdottir S, Einarsdottir R, Kalaitzakis E, Sigurdardottir O, Bjornsson ES. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31(10):2601-10.

100. Kamboj M, Son C, Cantu S, Chemaly RF, Dickman J, Dubberke E, et al. Hospital-onset *Clostridium difficile* infection rates in persons with cancer or hematopoietic stem cell transplant: a C3IC network report. Infect Control Hosp Epidemiol 2012;33(11):1162-5.

101. Gorschluter M, Glasmacher A, Hahn C, Schakowski F, Ziske C, Molitor E, et al. *Clostridium difficile* infection in patients with neutropenia. Clin Infect Dis 2001;33(6):786-91.

102. de Blank P, Zaoutis T, Fisher B, Troxel A, Kim J, Aplenc R. Trends in *Clostridium difficile* Infection and Risk Factors for Hospital Acquisition of *Clostridium difficile* among Children with Cancer. J Pediatr 2013.

103. Chopra T, Alangaden GJ, Chandrasekar P. *Clostridium difficile* infection in cancer patients and hematopoietic stem cell transplant recipients. Expert Rev Anti Infect Ther 2010;8(10):1113-9.

104. Tleyjeh IM, Bin Abdulhak AA, Riaz M, Alasmari FA, Garbati MA, AlGhamdi M, et al. Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection: a contemporary systematic review and meta-analysis. PLoS One 2012;7(12):e50836.

105. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK. Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. Am J Gastroenterol 2012;107(7):1011-9.

106. Roe DE, Finegold SM, Citron DM, Goldstein EJ, Wexler HM, Rosenblatt JE, et al. Multilaboratory comparison of growth characteristics for anaerobes, using 5 different agar media. Clin Infect Dis 2002;35(Suppl 1):S36-9.

107. Nerandzic MM, Donskey CJ. Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2009;47(2):397-400.

108. Orendi JM, Monnery DJ, Manzoor S, Hawkey PM. A two-stage algorithm for *Clostridium difficile* including PCR: can we replace the toxin EIA? J Hosp Infect 2012;80(1):82-4.

109. Culbreath K, Ager E, Nemeyer RJ, Kerr A, Gilligan PH. Evolution of testing algorithms at a university hospital for detection of *Clostridium difficile* infections. J Clin Microbiol 2012;50(9):3073-6.

110. Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, Peterson LR, Davis T, Schreckenberger P, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. J Clin Microbiol 2010;48(10):3719-24.

111. Wilcox MH, Planche T, Fang FC, Gilligan P. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? J Clin Microbiol 2010;48(12):4347-53.

112. Vasoo S, Stevens J, Portillo L, Barza R, Schejbal D, Wu MM, et al. Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Microbiol Immunol Infect 2012.

ภาคผนวก ก. แบบฟอร์มที่ใช้ในการเก็บข้อมูลผู้ป่วย

Demographic data

1. Sex ☐ 1.Male ☐ 2.Female ….SEX

2. Age nominal data…….year-old: mean +/- SD ….AGE

3. Underlying diseases before admission ….UD

- ☐ 0 No
- ☐ 1 Cardiovascular
- ☐ 2 Endocrine
- ☐ 3 Pulmonary
- ☐ 4 Renal
- ☐ 5 Neuro
- ☐ 6 Autoimmune disease
- ☐ 7 Hematologic malignancy
- ☐ 8 Solid tumors
- ☐ 8 HIV infection
- ☐ 9 GI
- ☐ 10. Others, specify……..

Risks

4. Current or recent use of drug at risk ….USE

- ☐ 1 current
- ☐ 2 recent

5. Antimicrobial ….ATB

- ☐ 0 No

☐ 1 Penicillins

☐ 2 cephalosporins

☐ 3 BL/BI

☐ 4 aminoglycosides

☐ 5 quinolones

☐ 6 carbapenems

☐ 7 vancomycin

6. Antimicrobial, specify…… ….ATBd

7. Chemotherapy ….CMTd

☐ 0 No

☐ 1 5-FU plus cisplatin

☐ 2 VP-16 plus cisplatin

☐ 3 vincristine plus doxorubicin

☐ 4 Ara-C plus idarubicin

☐ 5 capecitabine

☐ 6 MTX

☐ 8. chemotherapy, specify……

9. Duration of exposure to drug (ATB or CMT) before developed diarrhea

(starting date – date begins diarrhea, days) ….TIME

nominal data ……months: mean +/- SD

10. Exposure to gastric acid suppressive medications ….ACID

☐ 0 No

☐ 1 PPI

☐ 2 H2 blockers

11. gastric acid suppressive, specify…….. ….ACIDd

12. Duration of exposure to anti-ulcer medications before developed diarrhea

(starting date – date begins diarrhea, days) ….ACIDt

nominal data …….months: mean +/- SD

13. Duration of admission before developed diarrhea

….ADMIT nominal data …….months: mean +/- SD

Clinics

14. Department of admission ….DEPART

☐ 1 Medicine

☐ 2 Surgery

☐ 3 Others, specify……..

15. In case of Medicine department: Dx during current hospitalization …..DX

☐ 1 Cardiovascular , specify……

☐ 2 Endocrine, specify……..

☐ 3 Pulmonary, specify…….

☐ 4 Renal, specify……..

☐ 5 Neuro, specify…….

☐ 6 Autoimmune disease, specify……..

☐ 7 Hematologic malignancy, specify……..

☐ 8 Solid tumors, specify…….

☐ 8 Infection, specify…….

☐ 9 GI, specify……

☐ 10. Others, specify……

16. Other department: Dx during current hospitalization (before CDI DX) ….OTDEP

☐ 1 Surgery, specify……..

☐ 2 OB-GYN, specify……

☐ 3 others, specify……

17. Category ….CAT

☐ 1 Healthcare facility (HCF)-onset HCF-associated

☐ 2 Community-onset HCF-associated

☐ 3 Community-associated

18. Type of CDI ….TYPE

☐ 1 diarrhea

☐ 2 ileus

☐ 3 megacolon

☐ 4 peritonitis

☐ 5 others, specify…….

19. Severity ….SEVERE

☐ 1 mild or moderate

☐ 2 severe

☐ 3 severe complicated

20. Times of CDI ….TIMES

☐ 1 first

☐ 2 second

☐ 3 third or more

21. Hypotension ☐ 0 No ☐ 1 Yes, specify ….HYPO

22. Shock ☐ 0 No ☐ 1 Yes, specify ….SHOCK

23. Fever (BT≥38.3^{O}C) ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….FEVER

24. Fever nominal data ……^{O}c mean +/- SD ….BT

25. Abdominal pain ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….ABD

26. Abdominal tenderness ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….TENDER

27. Position; abdominal pain ….POSI

☐ 1 generalized

☐ 2 localized, specify……

28. Diarrhea ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….DIARR

29. Type of diarrhea ….DTYPE

☐ 1 watery

☐ 2 mucous

☐ 3 bloody

☐ 4 mucous/bloody

30. Frequency of diarrhea per day ….FREQ

nominal data ……/day : mean +/- SD

31. Duration of diarrhea before Dx ….DURA

nominal data ……/days : mean +/- SD

Investigations

32. CBC:WBC ☐ 1 ≤15,000 ☐ >15,000 ….CBC

33. Total WBC count nominal data ……/days : mean +/- SD ….WBCC

34. Cr ☐ 1 <1.5 times of preCDI ….Cr

☐ 2 ≥1.5 times of preCDI

35. Cr, specify from …….. to……. ….CrLEV

36. Colonoscopy ….COLO

Gross finding, specify……

Pathology, specify……..

37. GI procedure during admission ….GI

☐ 0 No

☐ 1 EGD

☐ 2 Colonoscope

☐ 3 abdominal surgery

Stool specimens

38. Stool WBC ☐ 1 <10/HPF ☐ 2 >10/HPF ….WBC

39. Stool RBC ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….RBC

Results

40. GDH EIA ☐ 0 Negative ☐ 1 positive ….GDH

41. cytotoxins A/B ☐ 0 Negative ☐ 1 positive ….Toxin

42. PCR ☐ 0 Negative ☐ 1 positive ….PCR

Treatment

44. D/C offending drug ….DC

☐ 1 Yes

☐ 2 No

☐ 3 already no current drug use

45. Antibiotics treatment ….Rx

☐ 1 oral metronidazole

☐ 2 IV metronidazole

☐ 3 oral vancomycin 125 mgX4

☐ 4 oral vancomycin 500mgX4

☐ 4 oral vancomycin + IV metronidazole Dose

☐ 5 others, specify……..

30. Surgery ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….Sx

31. Appropriateness of Rx ☐ 0 No ☐ 1 Yes ….APRx

32. In case of inappropriateness ….WRONG

☐ 1 Wrong choice of ATB, according to severity

☐ 2 Wrong dose of vancomycin (125 and 500 mgX4 in case of severe and severe complicated severity)

☐ 3 Wrong route of vancomycin (oral, not intravenous)

☐ 4 Wrong duration (10-14 days in case of mild/moderate and severe severity)

☐ Other Specify……

Outcome

31. outcome at 30 days ….30D

☐ 1 cure ☐ 2 persistent diarrhea

☐ 3 recurrence ☐ 4 death

ภาคผนวก ข. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การคัดกรองการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลโดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ผู้สนับสนุนการวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ผู้ทำวิจัย พ.ญ.รติมา อิสระชัยกุล

ที่อยู่ หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4578, 085-833-2221

ผู้ร่วมในโครงการวิจัย ศาสตราจารย์นายแพทย์ดอกเตอร์ ชุษณา สวนกระต่าย

ที่อยู่ หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4578

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล (*Clostridium difficile*) ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

ปัจจุบันการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล (*Clostridium difficile*) เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของโรคท้องร่วงที่เกิดขึ้นระหว่างเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยในประเทศไทยข้อมูลจากโรงพยาบาลศิริราช พบว่า ความชุกของโรคท้องร่วงที่เกิดจากการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล สูงถึงร้อยละ 12.3

จึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องมีการวินิจฉัยโรคติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลในผู้ป่วยที่รับไว้ในโรงพยาบาลอย่างถูกต้อง รวดเร็ว เพื่อให้ได้รับการรักษาที่เหมาะสมอย่างทันท่วงทีเพื่อป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้

ปัจจุบันในประเทศไทย การวินิจฉัยโรคติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลที่ใช้กันทั่วไป คือการตรวจสารพิษจากเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล (*Clostridium difficile* cytotoxins A/B) ในอุจจาระ ซึ่งมีข้อจำกัดในการส่งตรวจอย่างมาก เนื่องจากมีความไวต่ำ เป็นผลในการทดสอบส่วนใหญ่เป็นผลลบ ถึงแม้ว่าผู้ป่วยจะมีการติดเชื้อจริง จากข้อจำกัดในการส่งตรวจและความไวต่ำของการทดสอบเอง ทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

การวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ของการคัดกรองโรคท้องร่วงจากเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิด้วยการทดสอบเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในอุจจาระ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้จริงสำหรับผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่เข้ารับการรักษาภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือเพื่อวิเคราะห์ความไว (sensitivity) ของการคัดกรองโรคท้องร่วงจากเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิด้วยการทดสอบเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในอุจจาระ จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 91 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเก็บข้อมูลส่วนตัว อาการเจ็บป่วยและเก็บตัวอย่างอุจจาระของท่านเพื่อทำการทดสอบ โดยไม่มีการเจาะเลือดเพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่ผู้ทำวิจัยนัดหมาย คือ .....(วัน/เวลา)..... เพื่อสอบถามอาการ โดยตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ 1 ปีและมาพบผู้วิจัยหรือผู้ร่วมทำวิจัยทั้งสิ้น 1 ครั้ง

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ท่านจะได้รับความเสี่ยงเล็กน้อยที่ไม่มากกว่าความเสี่ยงในชีวิตประจำวัน เช่น เสียเวลา ไม่สะดวก และอาจจะมีความเสี่ยงต่อร่างกาย ต่อจิตใจ

กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบท่านประสบความเสี่ยงที่ไม่สามารถยอมรับได้ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสุขภาพของท่าน ขอให้ท่านรายงานให้ผู้ทำวิจัยทราบโดยเร็ว

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านอาจจะได้รับประโยชน์จากการวิจัย กล่าวคือในกรณีที่ผลการทดสอบของท่านพบว่าท่านเป็นโรคติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิล ท่านจะได้รับการรักษาที่ถูกต้องอย่างทันท่วงที และผลการศึกษาที่ได้จะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยรายอื่นๆต่อไป การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้นหรืออาจจะลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการวินิจฉัยโรคด้วยวิธีอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใช้ยาอื่น รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา

- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านไม่สามารถปฏิบัติตามข้อตกลงเบื้องต้นได้

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที และท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ พ.ญ.รติมา อิสระชัยกุล ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะได้รับการทดสอบอุจจาระในโครงการวิจัยจากผู้สนับสนุนการวิจัยโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย (ค่าใช้จ่ายอื่นที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าธรรมเนียมทางการแพทย์ และ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด รวมทั้งค่าเดินทางตามความถี่ที่ท่านได้มาพบแพทย์)

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการ

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีที่ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของผู้ป่วย

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย

4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการวินิจฉัยด้วยวิธีอื่น หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่าน รวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ภาคผนวก ค. ใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

การวิจัยเรื่อง การคัดกรองการติดเชื้อคลอสตริเดียมดิฟฟิซิลโดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับกลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่รับไว้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว..... ที่อยู่..... .....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และวันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย อย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย โดยจะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณา

จริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่าง

ละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

\

ภาคผนวกที่ ง. แสดงผลการทดสอบ

ตารางที่ 15. แสดงผลการทดสอบGDH EIA, cytotxins A/B ELFA, culture, PCR for *tcdA* และ *tcdB* genes (raw data)

CDI	GDH		Cytotoxins		Culture	PCR	Note
	OD	Result	Result	TV			
1	0.676	Y	N	0.02	N	N	
2	0.089	N	N	0.04	N	N	
3	0.210	Y	N	0.05	N	N	
4	1.688	Y	Y	4.23	Y	A^+B^+	
5	2.289	Y	Y	5.54	Y	A^+B^+	
6	0.011	N	N	0.01	N	N	
7	0.062	N	N	0.02	N	N	
8	0.148	N	N	0.01	N	N	
9	0.032	N	N	0.02	N	N	
10	0.014	N	N	0.02	N	B^+	A-Neg
11	0.019	N	N	0.01	N	N	
12	3.088	Y	Y	1.64	Y	A^-B^+	A-del
13	0.189	Y	N	0.01	N	N	
14	0.128	N	N	0.01	N	N	
15	0.041	N	N	0.00	N	N	
16	0.019	N	N	0.00	N	N	
17	0.024	N	N	0.02	N	N	
18	1.829	Y	N	0.05	Y	N	
19	0.092	N	N	0.02	N	N	
20	1.283	Y	Y/N	0.14	N	N	
21	0.111	N	N	0.01	N	N	
22	1.635	Y	N	0.06	Y	N	

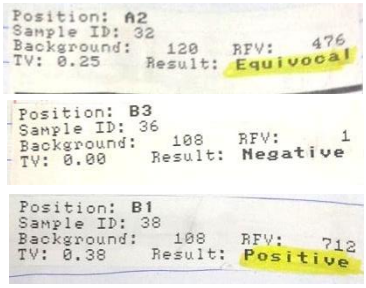
CDI	GDH		Cytotoxins		Culture	PCR	Note
	OD	Result	Result	TV			
23	0.318	Y	N	0.01	N	N	
24	0.838	Y	Y	0.68	Y	A^+B^+	
25	0.029	N	N	0.01	N	N	
26	0.124	N	N	0.01	N	N	
27	2.846	Y	Y	1.00	Y	N	
28	0.043	N	N	0.02	N	N	
29	3.097	Y	N	0.02	Y	N	
30	3.126	Y	Y	2.75	Y	A^-B^+	A-del
31	3.122	Y	Y	3.74	Y	A^-B^+	A-del
32	0.041	N	N	0.01	N	N	
33	1.851	Y	N	0.05	N	N	
34	0.928	Y	N	0.01	N	A^+B^+	
35	0.021	N	N	0.02	N	N	
36	0.311	Y	N	0.01	N	N	
37	2.588	Y	Y	4.76	Y	A^+B^+	
38	2.124	Y	Y	0.56	Y	A^+B^+	
39	0.330	Y	N	0.01	N	N	
40	3.072	Y	Y	0.39	Y	A^+B^+	
41	0.034	N	N	0.01	N	N	
42	0.017	N	N	0.01	N	N	
43	0.019	N	N	0.05	N	N	
44	0.016	N	N	0.01	N	N	
45	0.024	N	N	0.01	N	N	
46	0.014	N	N	0.00	N	N	
47	2.891	Y	Y	0.41	N	A^-B^+	A-del

CDI	GDH		Cytotoxins		Culture	PCR	Note
	OD	Result	TV	Result			
48	0.030	N	N	0.01	N	N	
49	0.799	Y	N	0.01	N	N	
50	3.098	Y	Y	4.32	Y	A^+B^+	
51	3.125	Y	N	0.04	Y	A^+B^+	
52	2.251	Y	N	0.02	Y	N	
53	0.020	N	N	0.01	N	N	
54	0.022	N	N	0.01	N	N	
55	0.533	Y	N	0.01	N	B^+	A-Neg
56	3.056	Y	N	0.03	Y	A^-B^+	A-del
57	0.034	N	N	0.03	N	N	
58	0.230	Y	N	0.01	N	N	
59	1.624	Y	Y	3.67	Y	A^+B^+	
60	0.024	N	N	0.01	N	N	
61	0.042	N	N	0.01	N	N	
62	0.016	N	N	0.03	N	N	
63	3.111	Y	Y	0.70	N	N	
64	0.009	N	N	0.01	N	N	
65	0.025	N	N	0.01	N	N	
66	0.181	Y	N	0.01	N	N	
67	0.046	N	N	0.02	N	N	
68	0.041	N	N	0.02	N	N	
69	2.935	Y	Y	3.81	Y	A^+B^+	
70	1.597	Y	N	0.02	Y	A^+B^+	
71	0.015	N	N	0.01	N	N	
72	0.018	N	N	0.01	N	N	

CDI	GDH		Cytotoxins		Culture	PCR	Note
	OD	Result	Result	TV			
73	0.800	Y	N	0.03	Y	N	
74	0.015	N	N	0.00	N	N	
75	0.121	N	N	0.02	N	N	
76	0.802	Y	Y	3.48	Y	A^+B^+	
77	0.409	Y	N	0.01	N	N	
78	0.023	N	N	0.01	N	N	
79	1.410	Y	±	0.32	Y	A^+B^+	
80	0.019	N	N	.0.01	N	N	
81	0.298	Y	N	0.04	Y	N	
82	0.026	N	N	0.04	N	N	
83	0.254	Y	N	0.02	N	N	
84	2.980	Y	±	0.36	Y	A^+B^+	
85	0.014	N	N	0.02	N	N	
86	3.126	Y	Y	3.35	Y	N	
87	3.000	Y	N	0.01	N	N	
88	0.019	N	N	0.02	N	N	
89	0.037	N	N	0.01	N	N	
90	0.040	N	N	0.02	N	N	
91	0.026	N	N	0.01	N	N	

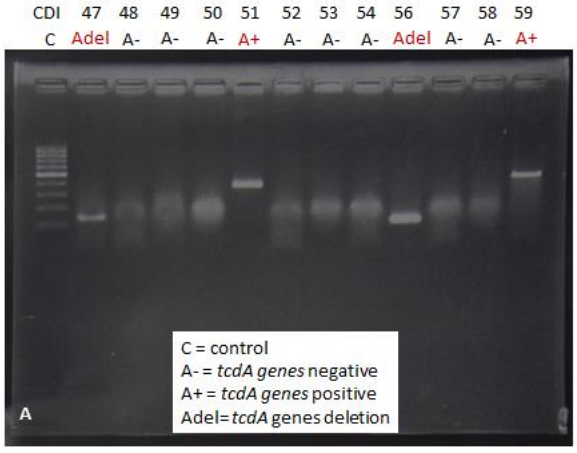
CDI, *C. difficile* infection; GDH, glutamate dehydrogebase; OD, optical density; TV, test value; PCR, polymerase chain reaction; Y, Yes; N, No

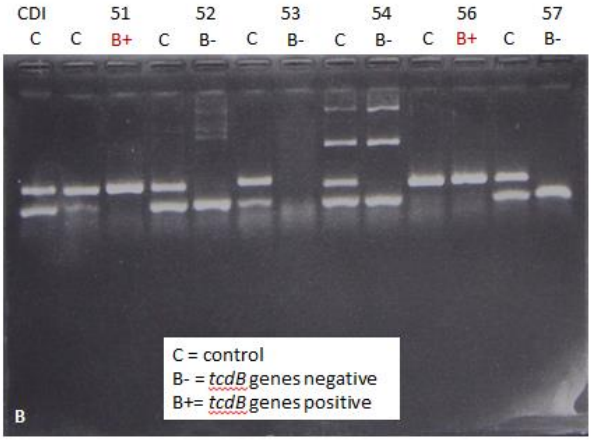
ภาพที่ 11. แสดงผลการทดสอบ VIDAS® cytotoxins A/B



ภาพที่ 12. (A) แสดงผลการทดสอบ PCR for *tcdA* gene

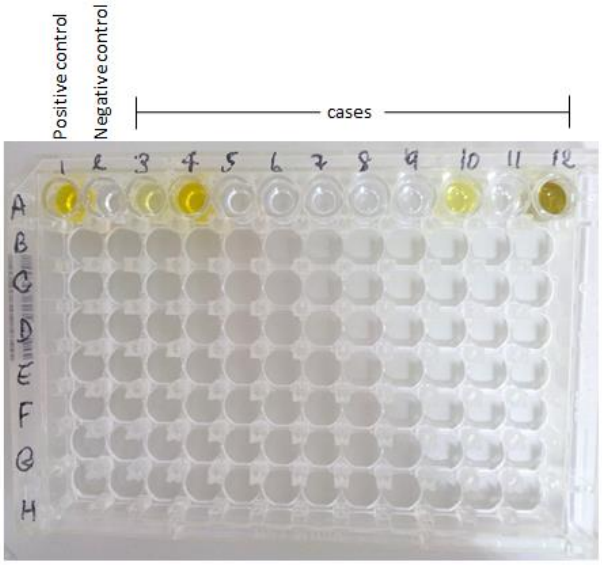
(B) แสดงผลการทดสอบ PCR for *tcdB* gene





ภาคผนวก จ. แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ

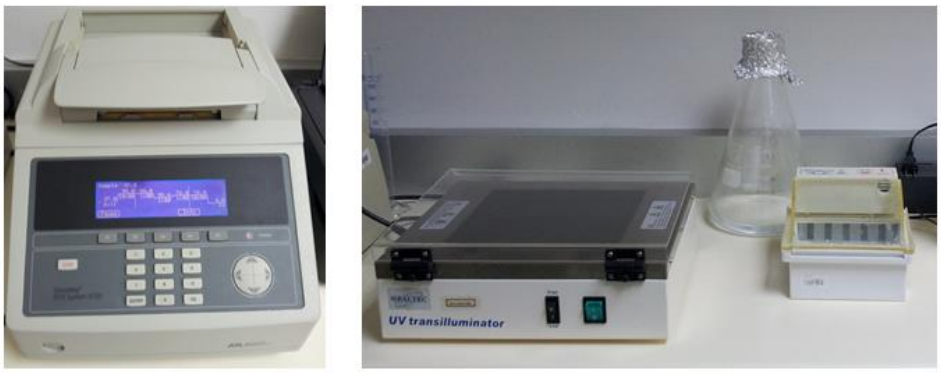
ภาพที่ 13. แสดง microwells ที่ใช้ในการทดสอบ GDH EIA



ภาพที่ 14. แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ VIDAS® cytotoxins A/B

ภาพที่ 15. แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ

ภาพที่ 16. แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ PCR



อุปกรณ์ในการทำ **PCR**

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อสกุล	แพทย์หญิงรติมา อิสระชัยกุล
วัน เดือน ปีเกิด	3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525
สถานภาพสมรส	สมรส
ตำแหน่งในปัจจุบัน	แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ชั้นปีที่ 2
สถานที่ทำงาน	สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330 ประเทศไทย

ประวัติการศึกษาและเกียรติบัตร

พ.ศ. 2547	แพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2553	วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรกรรม ภาควิชาอายุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

1. Piyaphanee W, Issarachaikul R, Soontarach P, Silachamroon U. Concurrent Salmonella Bacteremia in *P. Vivax* Infection - A Report of 2 Cases at The Hospital for Tropical Diseases, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007; 38(4):616-18.
2. Issarachaikul R, Suankratay C. Listeria in Pregnancy. Review article. Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents 2012; 29(1):39-42.
3. Issarachaikul R, Suankratay C. Antibiotic Prescription for Adults with Acute Upper Respiratory Tract Infection in Ambulatory Care Settings. Asian Biomedicine 2013;7:15-20.