บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การพิจารณาทางด้านจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคน

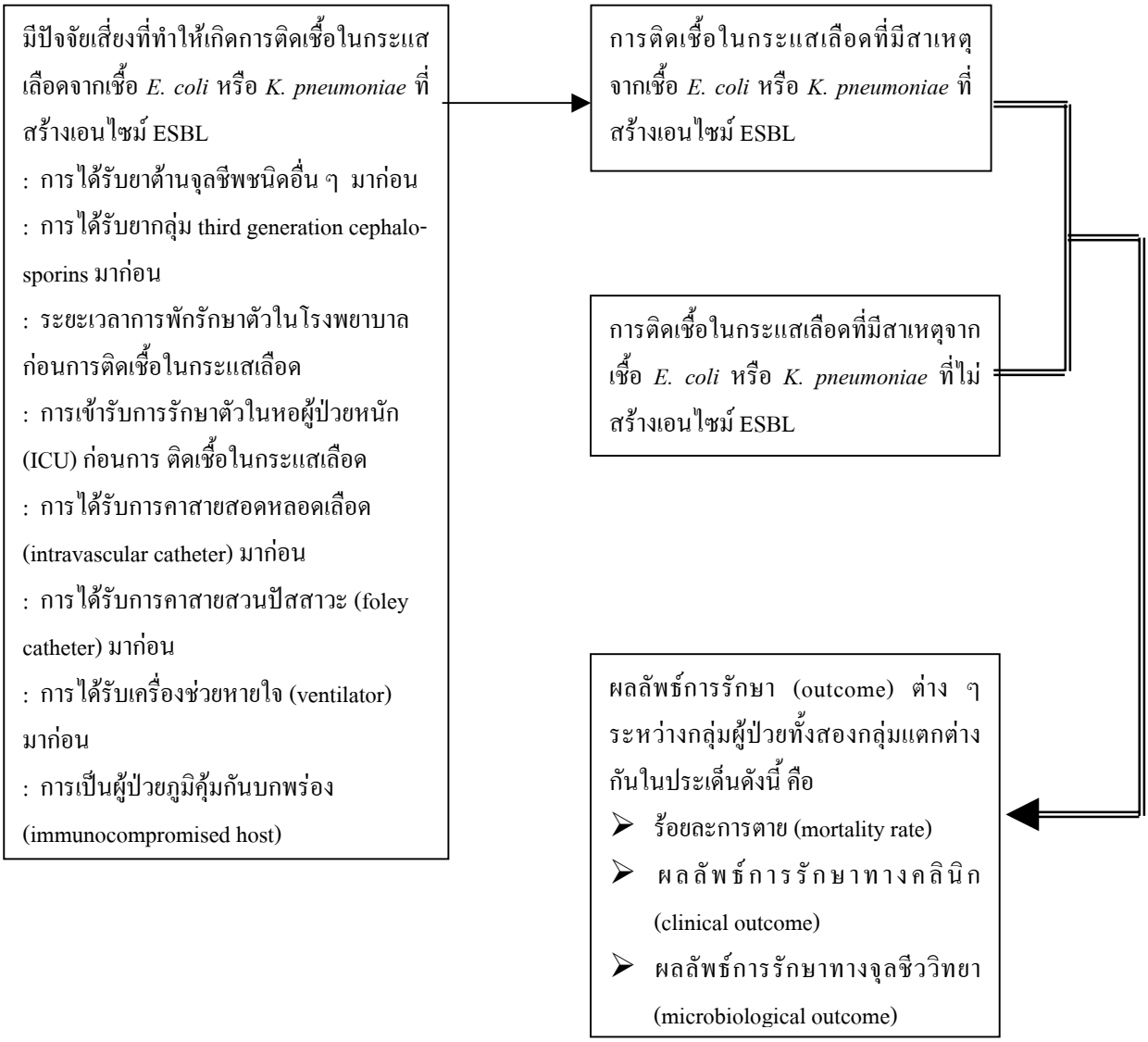
โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคนของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยลงขลานครินทร์

3.2 รูปแบบการวิจัยและประชากรที่ศึกษา

3.2.1 รูปแบบการวิจัย

A matched prospective study

3.2.2 กรอบแนวคิดการวิจัย



3.2.3 ประชากรที่จะศึกษา

3.2.3.1 ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ 2 แห่งในจังหวัดสงขลา คือ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา (สังกัดทบวงมหาวิทยาลัย) และโรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (โรงพยาบาลศูนย์) เก็บตัวอย่างเชื้อเป็นระยะเวลา 10 เดือน ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม ปี ค.ศ.2003 ถึง 31 กรกฎาคม ปี ค.ศ.2004

3.2.3.2 ผู้ป่วยที่มีภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ 2 แห่ง คือ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา (สังกัดทบวงมหาวิทยาลัย) และโรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (โรงพยาบาลศูนย์) โดยเก็บข้อมูลตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม ปี ค.ศ.2003 ถึง 31 สิงหาคม ปี ค.ศ.2004 ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่แยกได้ตัวอย่างเชื้อตามข้อ 3.2.3.1

โรงพยาบาลสงขลานครินทร์เป็นโรงเรียนแพทย์ขนาด 750 เตียง ประกอบด้วยแพทย์และนักศึกษาแพทย์สาขาต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ส่วนโรงพยาบาลหาดใหญ่เป็นโรงพยาบาลศูนย์ขนาด 500 เตียง มีแพทย์สาขาต่าง ๆ หลายสาขารวมทั้งเป็นสถานที่ฝึกปฏิบัติงานของนักเรียนแพทย์สาขาต่าง ๆ ด้วยเช่นกัน โรงพยาบาลทั้งสองที่ทำการศึกษานี้เป็นโรงพยาบาลขนาดใหญ่ให้การรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะโรคซับซ้อนเป็นจำนวนมากและมีการสั่งใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อการรักษาผู้ป่วยเป็นปริมาณมากรวมทั้งมีปัญหาเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาด้วย

3.3 วิธีการคัดเลือกตัวอย่างที่จะศึกษา

3.3.1 ขนาดตัวอย่าง

คำนวณขนาดตัวอย่างในการทดลองสองกลุ่มที่ทราบค่าสัดส่วนของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น โดยอ้างอิงผลการศึกษาของ Kim และคณะ (2002)

1. H_0 : สัดส่วนการรอดตายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL เท่ากับอัตรารอดตายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E.coli* หรือ *K.pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL

H_1 : สัดส่วนการรอดตายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ต่ำกว่าอัตรารอดตายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL

2. p_1 = อัตรารอดตายที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ให้เท่ากับ 0.943 (Kim, *et al.*, 2002)

p_2 = อัตรารอดตายที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ให้เท่ากับ 0.733 (Kim, *et al.*, 2002)

$p = (p_1 + p_2)/2 = 0.835$

3. อำนาจการทดสอบ = 80%, β = 0.20

$Z_{1-\beta} = Z_{0.80} = 0.84$

ระดับนัยสำคัญ = 0.05, ทดสอบทางเดียว $Z_{1-0.05} = Z_{0.95} = 1.64$

4. จากสูตร (ทัสสนี นุชประยูร, 2541; สังวาลย์ รักษ์เผ่า, 2538)

$$\text{n/กลุ่ม} = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 2p(1-p)}{(p_1 - p_2)^2}$$

$$= \frac{(1.64 + 0.84)^2 2(0.835)(0.165)}{(0.943 - 0.733)^2}$$

$$= 38.42$$

ดังนั้นจะต้องใช้ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 40 คน

โดยสรุปวางแผนเก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ ESBL จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลดังกล่าวข้างต้นอย่างน้อยกลุ่มละ 40 ตัวอย่างและวางแผนในการศึกษา ติดตาม และบันทึกข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ในกระแสเลือดในอัตราส่วน 1:1 รวมทั้งสิ้น 80 รายหรือ 40 คู่

3.3.2 เกณฑ์และวิธีการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าศึกษา

3.3.2.1 เชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ดื้อและไวต่อยา ceftazidime (จากรายงานผลการเพาะเชื้อและผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของโรงพยาบาลที่ศึกษา) จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย

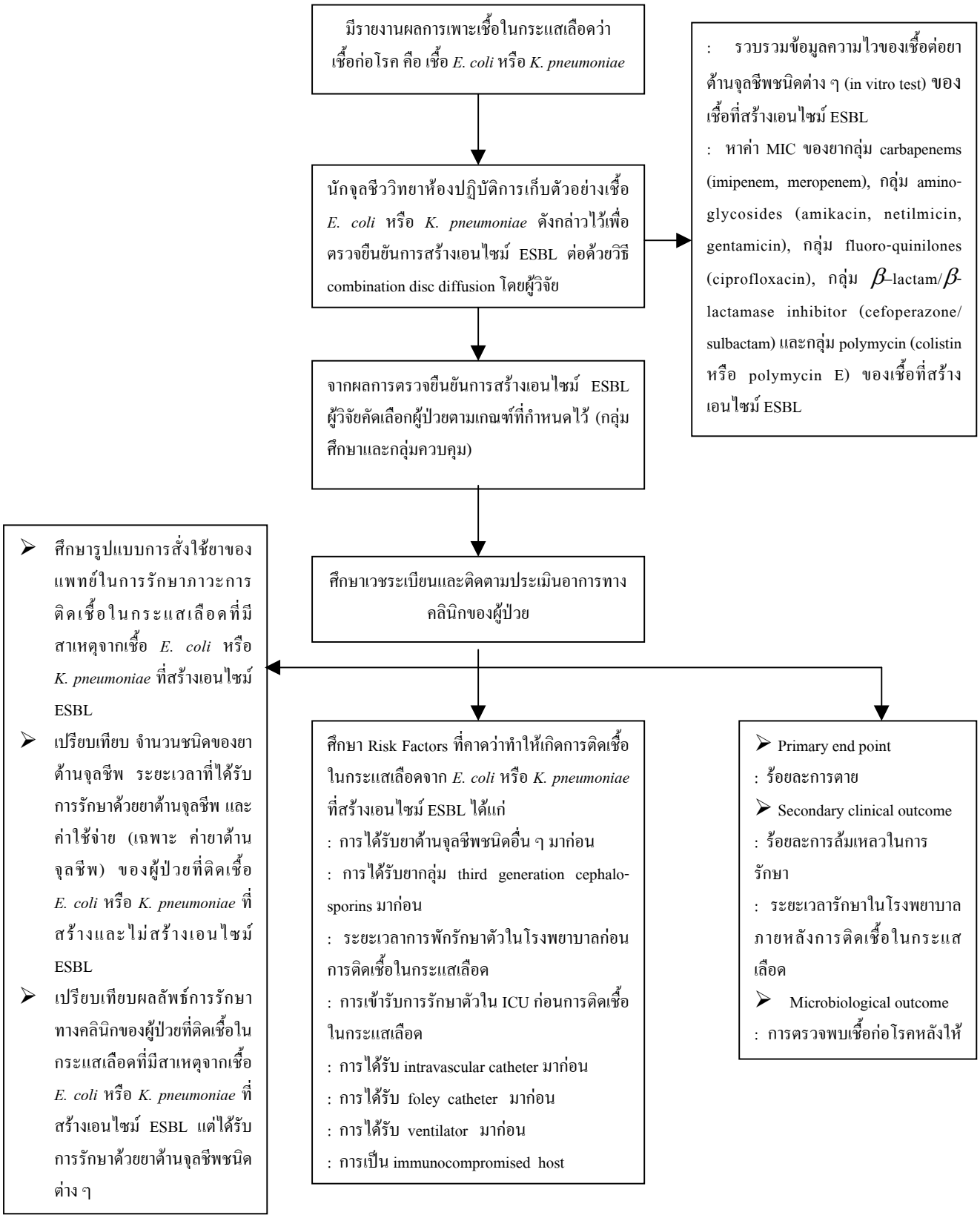
3.3.2.2 ผู้ป่วยในกลุ่มศึกษา (study group) หมายถึง ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ภายหลังเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง (nosocomial infection)

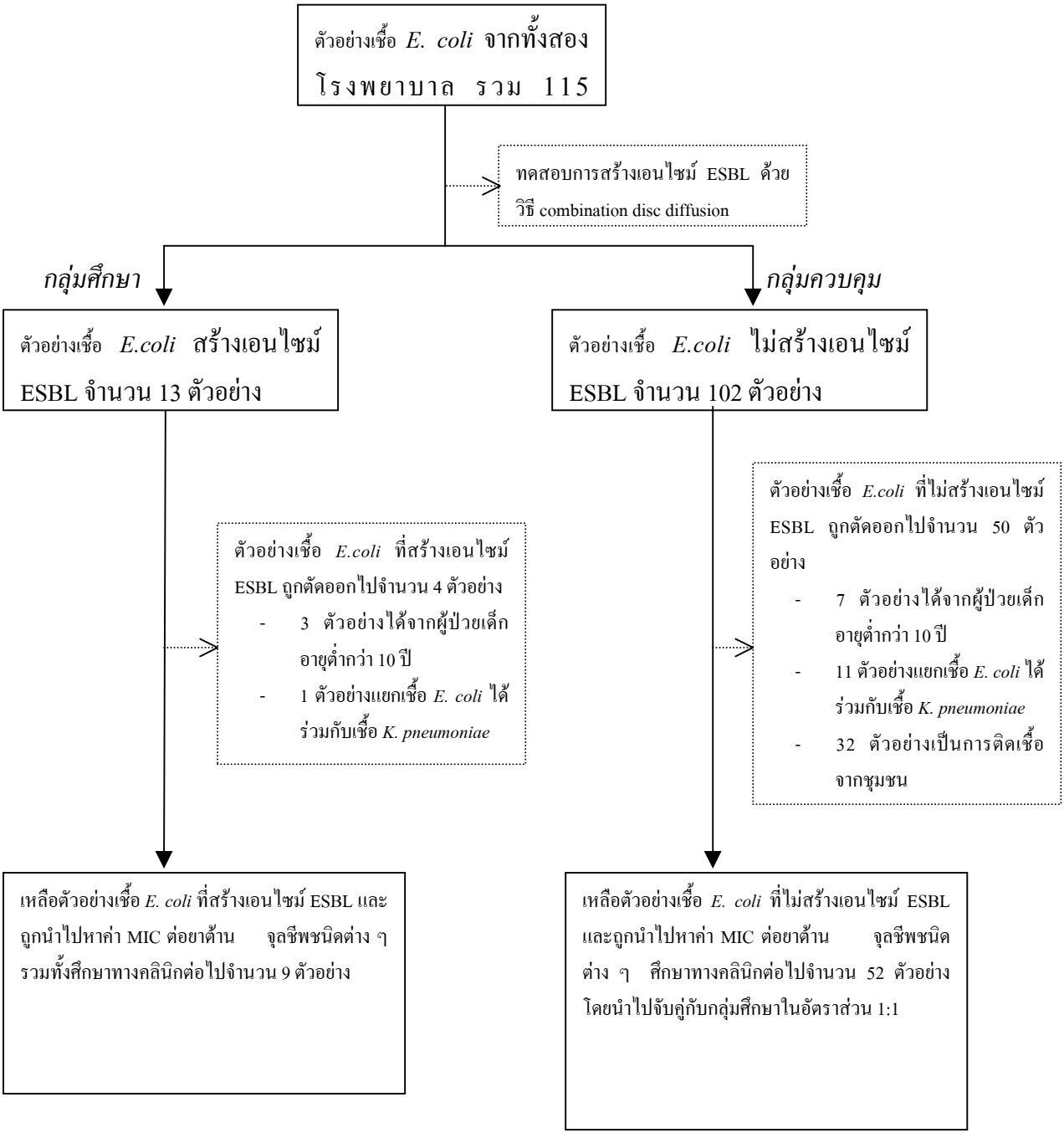
3.3.2.3 ผู้ป่วยในกลุ่มควบคุม (control group) หมายถึง ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ภายหลังเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง (nosocomial infection)

3.3.2.4 จับคู่ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษาในอัตราส่วน 1:1 โดยพิจารณาจากเกณฑ์ดังนี้ คือ โรงพยาบาลที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษา (เลือกที่เป็นโรงพยาบาลเดียวกัน) อายุ (แตกต่างกันไม่เกิน 20 ปี) ชนิดของเชื้อก่อโรคเป็นชนิดเดียวกัน (*E. coli* หรือ *K. pneumoniae*) ความรุนแรงของภาวะเจ็บป่วย ณ เวลาที่มีการติดเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด (SAP II score แตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 20)

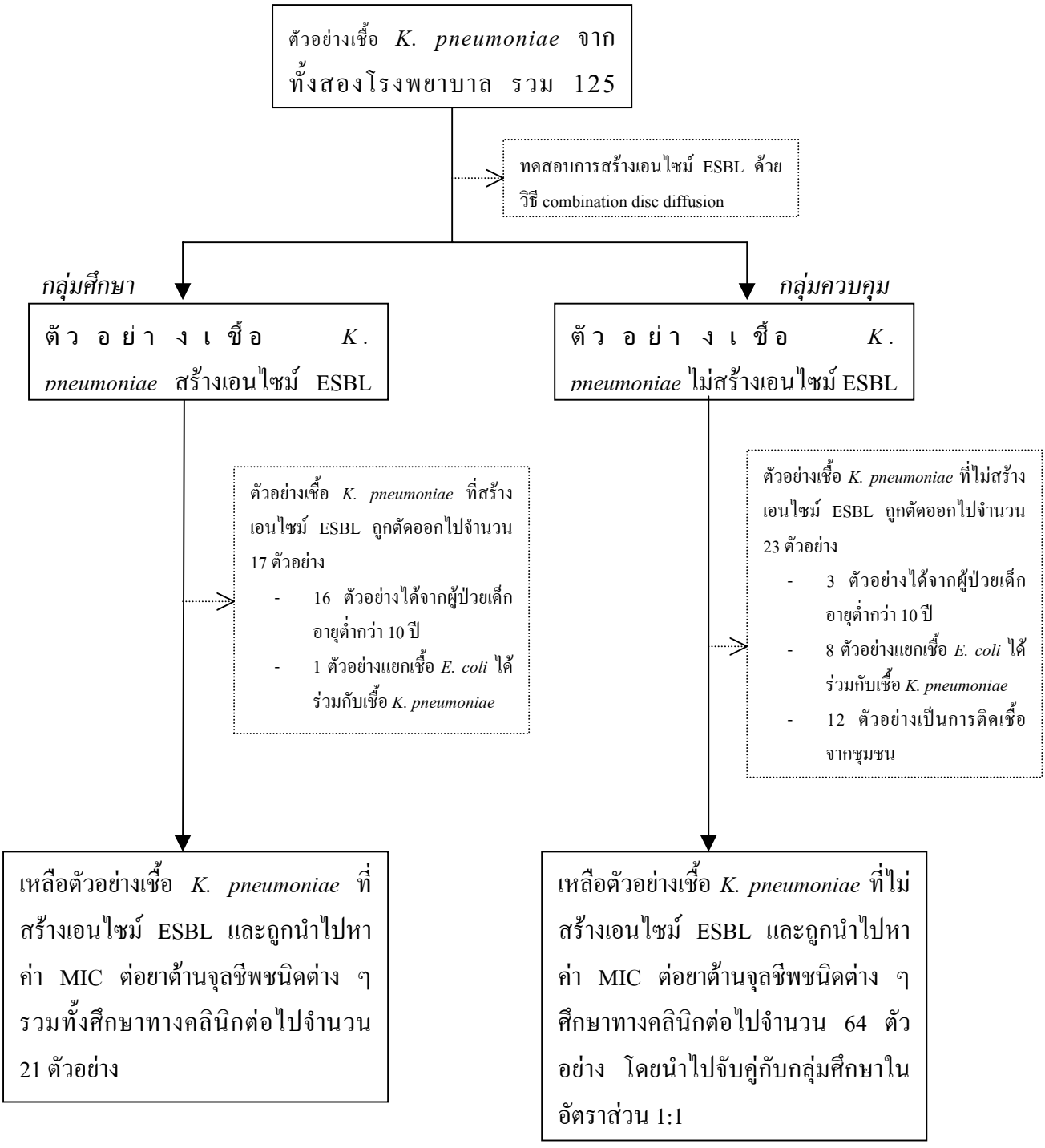
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 กรอบวิธีดำเนินการวิจัย





ภาพประกอบที่ 28 แสดงขั้นตอนการดำเนินการศึกษาทางห้องปฏิบัติการและทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม ที่แยกได้ตัวอย่าง เชื้อ *E. coli*



ภาพประกอบที่ 29 แสดงขั้นตอนการดำเนินการศึกษาทางห้องปฏิบัติการและทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม ที่แยกได้ตัวอย่าง เชื้อ *K. pneumoniae*

3.4.2 ขั้นตอนการเก็บข้อมูล

1. หน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกของโรงพยาบาลกลุ่มเป้าหมาย รายงานผลการเพาะเชื้อในกระแสเลือดว่าเกิดจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae*

2. ศึกษาเวชระเบียนของผู้ป่วย รวมทั้งการติดตามประเมินอาการทางคลินิกของผู้ป่วยแบบไปข้างหน้า โดยศึกษาเวชระเบียนของผู้ป่วยที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ดังนี้ คือ

กลุ่มศึกษา : ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลมากกว่าหรือเท่ากับ 48 ชั่วโมงแล้วเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยพิจารณาจากผลการเพาะเชื้อและการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL จากห้องปฏิบัติการโดยวิธี combination disc diffusion

กลุ่มควบคุม : ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลมากกว่าหรือเท่ากับ 48 ชั่วโมงแล้วเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ซึ่งไม่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยพิจารณาจากผลการเพาะเชื้อและการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL จากห้องปฏิบัติการโดยวิธี combination disc diffusion

3. จับคู่ระหว่างผู้ป่วยในกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุมในอัตราส่วน 1:1 โดยพิจารณาจากเกณฑ์ต่อไปนี้ คือ โรงพยาบาลที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษา (เลือกที่เป็นโรงพยาบาลเดียวกัน) อายุ (อายุแตกต่างกันไม่เกิน 20 ปี) ชนิดของเชื้อก่อโรคเป็นชนิดเดียวกัน (*E. coli* หรือ *K. pneumoniae*) และ ความรุนแรงของภาวะเจ็บป่วย ณ เวลาที่มีการติดเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด (SAP II score แตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 20)

4. บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ซึ่งสร้างเอนไซม์ ESBL ผลการรักษาทางคลินิก รายงานผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพและยาที่แพทย์เลือกใช้ในการรักษาลงในแบบบันทึกข้อมูลทางคลินิกที่สร้างขึ้น

3.4.3 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.4.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

Mueller-Hinton agar	(Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)
Mueller-Hinton broth	(Merck, KGaA, Germany)
Mackocy agar	(Merck, KGaA, Germany)
Tryptic soy broth	(Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)
Glycerol	(Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia)
McFarland 0.5 standard	(กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดสงขลา)
Nutrient agar	(Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)
0.9% Sodium chloride	(งานเภสัชกรรมการผลิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์)

ซึ่งวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยมีข้อมูลดังแสดงในภาคผนวก ก

3.4.3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

combination disc ของบริษัท Oxiod, Basingstoke, Hampshire, England

CD01 (cefpodoxime 10 mcg/clavulanic acid 1 mcg)

CD02 (ceftazidime 30 mcg/clavulanic acid 10 mcg)

CD03 (cefotaxime 30 mcg/clavulanic acid 10 mcg)

single cephalosporins disc ของบริษัท Oxiod, Basingstoke, Hampshire, England

Cefpodoxime disc (cefpodoxime 10 mcg)

Ceftazidime disc (ceftazidime 30 mcg)

Cefotaxime disc (cefotaxime 30 mcg)

E-test ของยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด คือ ยาimipenem, meropenem, amikacin, netilmicin, gentamicin, ciprofloxacin, cefoperazone/salbactam และ colistin ของบริษัท AB Biodisk, Solna, Sweden

Disposable Petri Dish ขนาด 94 × 16 mm

Test tube ขนาด 130 × 100 mm

Micro tube ฝาจุก sterile สำหรับปิด test tube Sterile rack with tube yellow ไม้พันสำลี และถุงมือเบอร์ M

3.4.3.3 การเก็บตัวอย่างและการเพาะเชื้อ

เก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์และโรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม ปี ค.ศ.2003 ถึง 31 กรกฎาคม ปี ค.ศ.2004 และมีขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างและการเพาะเชื้อดังต่อไปนี้

1. นักจุลชีววิทยาประจำหน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกของโรงพยาบาลที่เข้าร่วมโครงการใช้วิธีตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการและวิธี disc diffusion test ของโรงพยาบาลในการรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย ลงในแบบรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย (ภาคผนวก ข) ซึ่งมีรายละเอียดเกี่ยวกับ ชื่อโรงพยาบาล ชื่อ-สกุล เลขประจำตัวโรงพยาบาล อายุและเพศของผู้ป่วย หอผู้ป่วย วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่างเลือดและเลขที่สิ่งส่งตรวจ

2. ป้ายเชื้อดังกล่าวลงบน nutrient agar ในหลอดสำหรับเก็บตัวอย่างเชื้อที่ผู้วิจัยเตรียมไว้ให้

3. นำเชื้อที่ได้มาเพาะเชื้อซ้ำเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อและแยกเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ออกจากเชื้ออื่นที่อาจปนเปื้อนได้ โดยการ steak เชื้อลงบน nutrient agar แล้วนำไป incubate ที่ 35 °C เป็นเวลาข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) แล้วตรวจสอบว่าเป็นเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* โดยพิจารณาจากลักษณะของโคโลนี

4. เขี่ยเชื้อที่เพาะได้ลงใน 15 % glycerol และ tryptic soy broth ภายใน micro tube (nunc tube) เก็บเชื้อแช่แข็งไว้ (อุณหภูมิ –70 °C) โดยระบุชนิดและแหล่งที่มาของเชื้อ (ชื่อโรงพยาบาลและหมายเลขสิ่งส่งตรวจ) เพื่อนำมาตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ต่อไปด้วยวิธี combination disc diffusion ต่อไป

3.4.3.4 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี combination disc diffusion

combination disc หมายถึง disc ยาที่ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง disc ยาดังกล่าวนี้ประกอบด้วยยา 2 ชนิดใน disc เดียวคือ cephalosporins และ β–lactamase inhibitor ใน ปี ค.ศ.2000 NCCLS รับรองวิธีการ combination disc diffusion ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ Oxiod® combination disc เป็น combination disc ที่ใช้สำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ซึ่งในปัจจุบันมีให้เลือกใช้ 3 ชนิด คือ

ตารางที่ 35 แสดงชนิดของ combination disc และร้อยละความไวของ disc แต่ละชนิด

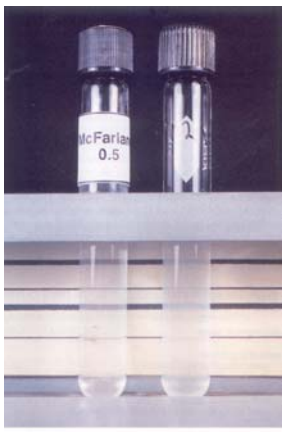
Oxiod® combination disc	**ส่วนประกอบ**	**ความเข้มข้น**	**ร้อยละความไว**
CD01	cefpodoxime/clavulanic acid	10/1 mcg	100
CD02*	ceftazidime/clavulanic acid	30/10 mcg	92
CD03*	cefotaxime/clavulanic acid	30/10 mcg	82

* เฉพาะ CD02 และ CD03 เท่านั้นที่ได้รับการรับรองจาก NCCLS ส่วน CD01 เป็นนวัตกรรมใหม่ที่พัฒนาขึ้นของบริษัทผู้ผลิต combination disc

เมื่อเก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ดื้อและไวต่อยา ceftazidime ได้อย่างละอย่างน้อย 40 ตัวอย่างตามที่ต้องการแล้ว จึงนำตัวอย่างเชื้อดังกล่าวมาตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี combination disc diffusion ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้คือ

1. นำเชื้อที่แช่แข็งเก็บไว้มาทำการเพาะเชื้อซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้งบน mackocy agar เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

2. เขี่ยเชื้อ 2-3 โคโลนีใส่ใน mueller hinton broth เขย่าให้เข้ากันดี แล้วปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarlandStandard การปรับความขุ่นโดยการเปรียบเทียบความขุ่นกับของ inoculum กับสารละลาย 0.5 McFarlandStandard ดังแสดงในภาพประกอบที่ 30



ภาพประกอบที่ 30 การปรับความขุ่นของสารละลาย inoculum ให้เท่ากับ 0.5 McFarlandStandard

3. ใช้ไม้พันสำลีป้ายเชื้อลงบน mueller hinton agar ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที ดังแสดงในภาพประกอบที่ 31

ภาพประกอบที่ 31 การป้ายเชื้อลงบน mueller hinton agar

4. วาง combination disc (CD01,CD02 หรือ CD03) ควบคู่กับ single cephalosporins disc ของ combination disc แต่ละชนิด (cefodoxime 10 mcg, ceftazidime 30 mcg หรือ cefotaxime 30 mcg) โดยวางห่างกันพอสมควร (ไม่น้อยกว่า 5 cm)

5. นำไป incubate ที่ 35-37 °C; ambient air เป็นเวลาข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) (overnight) อ่านเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของ combination disc และ single

cephalosporin disc บันทึกค่าที่อ่านได้ลงในแบบบันทึกผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ ESBL (ภาคผนวก ข)

6. นำเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ไปหาค่า MIC ต่อไป (วิธีการหาค่า MIC ของเชื้อดังกล่าวจะกล่าวถึงในหัวข้อ 3.4.3.5)

7. ใช้ *E. coli* ATCC® 25922 และ *K. pneumoniae* ATCC® 700603 เป็นสายพันธุ์ควบคุมคุณภาพ โดยอ้างอิงจาก NCCLS guideline 2001

8. แปลผลโดยเปรียบเทียบ inhibition zone ของ combination disc และ single cephalosporins disc ถ้า inhibition zone ของ combination disc มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ inhibition zone ของ single cephalosporins disc ถือว่าเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่นำมาตรวจสอบสร้างเอนไซม์ ESBL แต่สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL เมื่อใช้ combination disc ชนิด CD03 ในการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ถ้า inhibition zone ของ CD03 มากกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ inhibition zone ของ cefotaxime ถือว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ดังกล่าวสร้างเอนไซม์ ESBL

ตารางที่ 36 การแปลผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ของ *E. coli* และ *K. pneumoniae* จากการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disc diffusion

Combination disc	**Inhibition zone difference (mm)** (combination disc zone – single cephalosporin disc zone)	
	E. coli	***K. pneumoniae***
CD01	$\geq$ 5 mm	$\geq$ 5 mm
CD02	$\geq$ 5 mm	$\geq$ 5 mm
CD03	$\geq$ 5 mm	$\geq$ 3 mm

เนื่องจากการวิจัยนี้ใช้ combination disc 3 ชนิดในการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ การสรุปว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ สร้างเอนไซม์ ESBL หรือไม่ พิจารณาจากการแปลผลของ combination disc ทั้ง 3 ชนิด ถ้าพบว่าแปลผลเป็น ESBL positive อย่างน้อยจาก 1 combination disc สรุปว่าเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ดังกล่าวสร้างเอนไซม์ ESBL

3.4.3.5 การหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL

นำเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ตรวจยืนยันแล้วพบว่า สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี combination disc diffusion (ดังรายละเอียดขั้นตอนในข้อ 3.4.3.4) มาหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อดังกล่าว โดยในงานวิจัยนี้ศึกษาค่า MIC ของ ยา imipenem, meropenem, amikacin, netilmicin, gentamicin, ciprofloxacin, cefoperazone/sulbactam และ colistin ด้วยวิธี E-test

E-test (Epsilometric test) strip (Murray, *et al.*, 1995) หมายถึง แถบพลาสติกบาง ขนาด 5 × 60 มิลลิเมตร เคลือบสารต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพในระดับต่าง ๆ จากมากไปน้อย ซึ่งมีสเกลต่อเนื่องครอบคลุมความเข้มข้นกว้างถึง 15 ระดับ ของการเจือจางครั้งละเท่าตัว (15 two-fold dilution) ใช้สำหรับหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ค่า MIC แสดงเป็นตัวเลขมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (mcg/ml) ซึ่ง E-test strip ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ดังต่อไปนี้

Cefoperazone/sulbactam	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.016-256	mcg/ml
Ciprofloxacin	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.002-32	mcg/ml
Colistin	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.064-1024	mcg/ml
Imipenem	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.002-32	mcg/ml
Meropenem	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.002-32	mcg/ml
Amikacin	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.016-256	mcg/ml
Netilmicin	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.016-256	mcg/ml
Gentamicin	มีช่วงสเกลแสดงระดับ MIC ตั้งแต่	0.016-256	mcg/ml

วิธีหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ประกอบไปด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

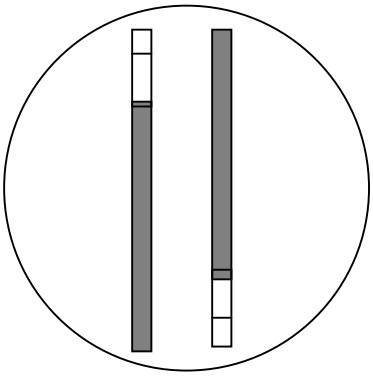
1. นำเชื้อที่แช่แข็งเก็บไว้มาทำการเพาะเชื้อซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้งบน mackocy agar เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

2. เขี่ยเชื้อ 2-3 โคโลนีใส่ใน mueller hinton broth เขย่าให้เข้ากันดีแล้วปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarlandStandard

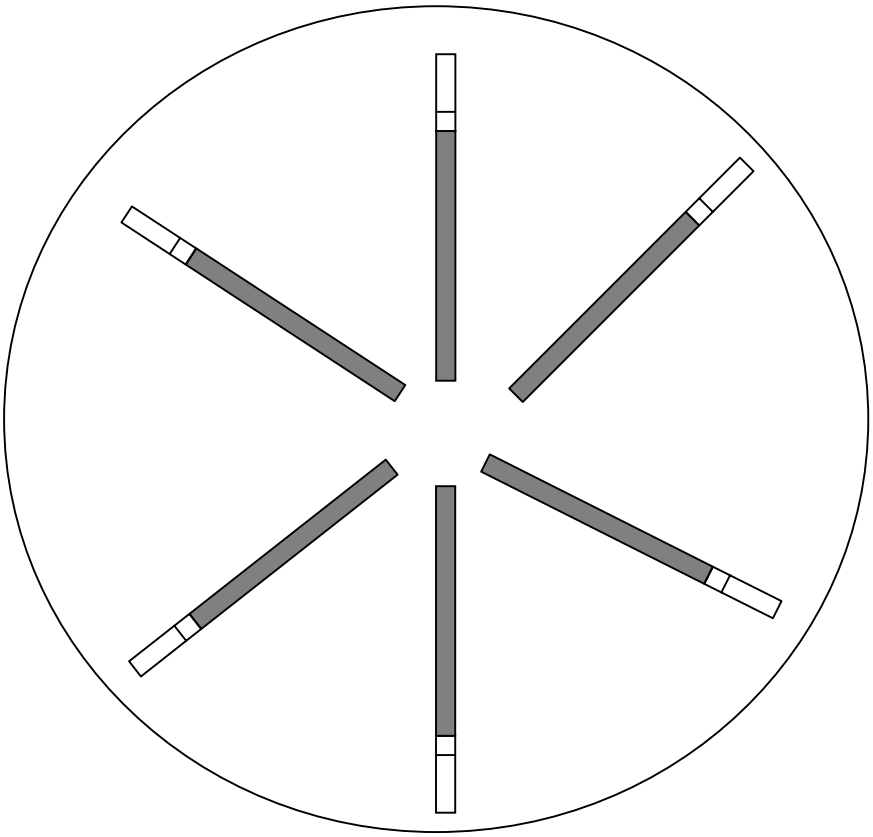
3. ใช้ไม้พันสำลีจุ่มใน inoculum แล้วทำการป้ายเชื้อลงบน mueller hinton agar ในสาม ทิศทางแล้ววางทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาทีเพื่อให้ inoculum ซึมลงสู่ agar และไม่เปียกเกินไปที่จะวาง strip

4. นำ E-test strip ออกจากตู้เย็นมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

5. ใช้ forceps จับแผ่น E-test วางลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อให้แนบสนิทให้สเกลของ MIC อยู่ด้านบน หลังจากนี้ห้ามขยับหรือเคลื่อนย้ายแผ่น E-test บนอาหารเลี้ยงเชื้ออีก ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้วางแผ่นทดสอบ E test ของยาต้านจุลชีพ 2 ชนิด (2 แถบ) ลงบน plateขนาด 90 มิลลิเมตร และวางแผ่นทดสอบ E test ของยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด (ยาต้านจุลชีพ 1 ชนิดต่อแผ่นทดสอบ E test 1 แถบ) ลงบน plate ขนาด 150 มิลลิเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 30 และ 31 ตามลำดับ



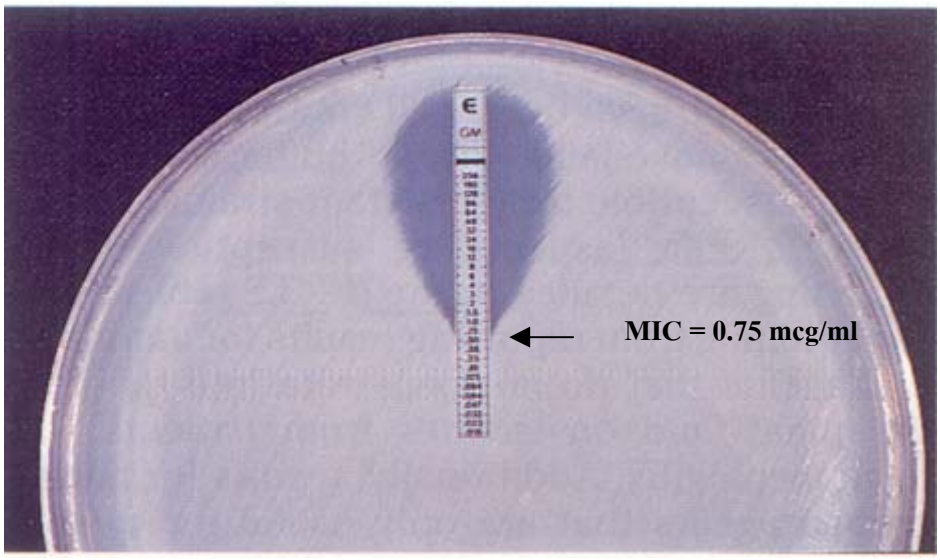
ภาพประกอบที่ 32 การวางแผ่นทดสอบ E test ลงบน plate ขนาด 90 มิลลิเมตร



ภาพประกอบที่ 33 การวางแผ่นทดสอบ E test ลงบน plate ขนาด 150 มิลลิเมตร

6. นำไป incubate ที่ 35-37 °C; ambient air เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (overnight)

7. อ่านค่า MIC โดยดูจาก intersection ของ elliptical inhibition zone ที่ตัดกับ scale บน E-test strip และบันทึกค่าที่ได้ลงในแบบบันทึกผลการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความไวต่อยาต้านจุลชีพ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 32



ภาพประกอบที่ 34 ตัวอย่างค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* ต่อยา gentamicin ที่ทดสอบโดยการใช้ E-test ซึ่ง ค่า MIC = 0.75 mcg/ml

8. การแปลผลอ้างอิงตามเกณฑ์ของ NCCLS 2001 criteria ดังแสดงในตารางที่ 38

9. ใช้ *E. coli* ATCC® 25922 และ *E. coli* ATCC® 35218 เป็นสายพันธุ์ควบคุมคุณภาพ โดยอ้างอิงจาก NCCLS guideline 2001

ตารางที่ 37 การแปลผลความไวของเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ จากค่า MIC

ยาต้านจุลชีพ	MIC (mcg/ml) Interpretive standard		
	Susceptible	**Intermediated**	**Resistance**
Amikacin	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16
Netilmicin	≤ 8	16	≥ 32
Cefotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64
Cefoxitin	≤ 8	16	≥ 32
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Ceftriaxone	≤ 8	16-32	≥ 64
Cefuroxime	≤ 8	16	≥ 32
Cephalaxin	≤ 8	16	≥ 32
Cefipime	≤ 8	16	≥ 32
Cefoperazone/sulbactam	≤ 16	17-63	≥ 64
Piperacillin/Tazobactam	≤ 16/4	32/2-64/4	≥ 128/2
Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Colistin	-	-	-
Co-trimoxazole	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16

ที่มา : NCCLS, 2001

ตารางที่ 38 Quality control range ของ MICs สำหรับเชื้อ ***E. coli*** ATCC 35218

ยาต้านจุลชีพ	MICs (mcg/ml)
Cefoperazone/sulbactam	0.25-1

ที่มา : NCCLS, 2001

ตารางที่ 39 Quality control range ของ MICs สำหรับเชื้อ ***E. coli*** ATCC 25922

ยาต้านจุลชีพ	MICs (mcg/ml)
Ciprofloxacin	0.004-0.016
Colistin	0.125-0.5
Imipenem	0.06-0.25
Meropenem	0.008-0.06
Amikacin	0.5-4
Netilmicin	$\leq$ 0.5-1
Gentamicin	0.25-1

ที่มา : NCCLS, 2001

3.4.3.6 ตัวแปร แผนวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้ สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ

ใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 10.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดย

ก. ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL แสดงผลในรูปของความถี่และร้อยละ

ข. ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum inhibitory concentrations; MIC) ใช้สถิติเชิงพรรณนา

ค. MIC_{50} และ MIC_{90} เป็นสถิติเชิงพรรณนา ที่ได้จากการวัดตำแหน่งของข้อมูลโดยตรงในรูปของเปอร์เซนไทล์ (percentile) ซึ่งจะมีการแบ่งข้อมูลเรียงลำดับจากค่าที่ต่ำสุดไปหาค่าที่สูงสุดเป็น 100 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีจำนวนข้อมูลเท่า ๆ กัน แล้วจึงหาตำแหน่งของข้อมูล MIC ลำดับที่ 50 และ 90 ได้เป็น MIC_{50} และ MIC_{90} ตามลำดับ

3.4.4 การศึกษาและบันทึกข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLโดยเป็นไปตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ในการคัดเลือกประชากรที่จะศึกษา

3.4.4.1 แบบบันทึกที่ใช้ในงานวิจัย

แบบรายงานผลการเพาะเชื้อและตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด (ภาคผนวก ข)

แบบเก็บข้อมูลค่า MIC ของยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL (ภาคผนวก ง)

แบบประเมิน SAP II score (ภาคผนวก จ)

ใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัยและใบสมัครใจเข้าร่วมโครงการ (ภาคผนวก ฉ)

แบบเก็บข้อมูลทางคลินิก (ภาคผนวก ช)

3.4.4.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

ก. การเก็บข้อมูลผู้ป่วย มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) ติดต่อประสานงานล่วงหน้าไปยังผู้ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก งานเวชระเบียนและสถิติ งานบริการผู้ป่วยในของโรงพยาบาลกลุ่มเป้าหมายที่ให้ความร่วมมือเข้าร่วมการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

(2) เตรียมความพร้อมของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องดังกล่าวข้างต้น โดยชี้แจงเกี่ยวกับวัตถุประสงค์ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและกรอบวิธีดำเนินการวิจัยแก่ทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง

(3) ภายหลังได้รับรายงานผลการเพาะเชื้อ (ภาคผนวก ข) จากงานจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกของโรงพยาบาลที่ดำเนินการศึกษาวิจัยและเก็บข้อมูล ผู้วิจัยคัดเลือกผู้ป่วยตามเกณฑ์ที่กำหนด

(4) ผู้วิจัยเก็บข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย โดยเก็บข้อมูลที่ประกอบด้วย

- ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย เช่น เพศ อายุ โรคประจำตัว และภาวะโรคร่วม เป็นต้น (ภาคผนวก ช)

- ข้อมูลที่จำเป็นในการประเมิน SAP II score ที่ baseline เนื่องจากการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* เพื่อทำให้ทราบถึงความรุนแรงของภาวะเจ็บป่วย ณ เวลาที่มีการติดเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือดของผู้ป่วย (ภาคผนวก จ) ได้แก่ อัตราการเต้นของหัวใจ ความดันโลหิต systolic (systolic BP) อุณหภูมิร่างกาย ค่า PaO_2 ในเลือด ปริมาณปัสสาวะ (urine output) ระดับยูเรียในเลือด (blood urea level) หรือระดับยูเรียไนโตรเจนในเลือด (blood urea nitrogen level) ปริมาณเม็ดเลือดขาวในเลือด (WBC count) ระดับโพแทสเซียมในเลือด (blood potassium) ระดับโซเดียมในเลือด (blood sodium) ระดับไบคาร์บอเนตในเลือด (blood bicarbonate) ระดับบินริรูบินในเลือด (bilirubin level) ระดับการรู้สึกตัวของผู้ป่วย (Glasgow coma score) ซึ่งหากในวันที่มีการส่งเพาะเชื้อตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย ($\pm$ 24 ชั่วโมง) ข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้มีไม่ครบถ้วนผู้วิจัยจะเสนอให้แพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยสั่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเอง

- ข้อมูลเกี่ยวกับยาและขนาดยารวมถึงระยะเวลาที่ได้รับยาในขณะรับการรักษาในโรงพยาบาล (ภาคผนวก ช)

- ผลการรักษาทางคลินิก (clinical outcome) ทำการประเมินตามแบบบันทึกข้อมูลทางคลินิก (ภาคผนวก ช) ซึ่งทำการประเมิน 2 ครั้งคือวันที่ 3 ของการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพและวันสิ้นสุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ โดยมีผู้ประเมิน 2 ท่านทำการประเมินแยกกัน คือ ผู้วิจัยและแพทย์ผู้ทำการรักษา 1 ท่าน ซึ่งเป็นแพทย์ที่มีคุณวุฒิตั้งแต่แพทย์ประจำบ้านชั้นปีที่ 2 ขึ้นไป ในกรณีที่ผลการประเมินไม่ตรงกันจะมีการอภิปรายร่วมกันระหว่างแพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยและผู้วิจัย หรือระหว่างผู้วิจัยกับอาจารย์แพทย์ผู้ร่วมวิจัยเพื่อหาข้อสรุป

- ผลการรักษาทางห้องปฏิบัติการ (microbiological outcome) ทำการประเมินในวันสิ้นสุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ซึ่งหากในวันดังกล่าวแพทย์ไม่มีคำสั่งส่งตรวจเพาะเชื้อในเลือดของผู้ป่วย (hemoculture) ซ้ำอีกครั้ง ผู้วิจัยจะเสนอให้แพทย์สั่งตรวจเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลดังกล่าว และเพื่อให้สามารถแน่ใจได้ว่าสามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายผู้ป่วยได้หมดหรือไม่ โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในส่วนนี้เอง การประเมินผลการรักษาทางห้องปฏิบัติการประเมินตามแบบบันทึกข้อมูลทางคลินิก (ภาคผนวก ช)

การเก็บข้อมูลทางคลินิกทำการเก็บข้อมูลตั้งแต่มีรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและติดตามผู้ป่วยกระทั่งผู้ป่วยถูกจำหน่ายออกจากโรงพยาบาลและในกรณีที่มีรายงานการดื้อหรือไวต่อยาชนิดต่าง ๆ ของเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่พบในตัวอย่างเลือดมากกว่า 1 ครั้งในผู้ป่วยแต่ละราย จะบันทึกข้อมูลเฉพาะครั้งแรกของรายงานการติดเชื้อดังกล่าว

(5) ผู้วิจัยรวบรวมข้อมูลทางคลินิกที่ได้จากเวชระเบียน และนำมาวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติต่อไป

3.4.4.3 นิยามศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

ก. การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) หมายถึง การมีผลการเพาะเชื้อพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ขวดร่วมกับการมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกของการติดเชื้อดังกล่าว เช่น มีไข้, chills, hypotension, hypothermia (สำหรับผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12 เดือนที่มีอุณหภูมิร่างกายต่ำกว่า 37 °C), apnea หรือ bradycardia เป็นต้น (Lautenbach, *et al.*, 2001; Beringer-Wong, *et al.*, 2002)

ข. การติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) หมายถึง การที่ผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อเกิดขึ้นหลังจากเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง (Lautenbach, *et al.*, 2001)

ค. การกลับเป็นซ้ำ (relapse) หมายถึง การมีการติดเชื้อเกิดขึ้นที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายด้วยเชื้อก่อโรคชนิดเดิมภายในระยะเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 วัน หลังจากหยุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาการติดเชื้อในช่วงแรก (Lautenbach, *et al*., 2001)

ง. ระยะเวลาการรักษาตัวในโรงพยาบาลก่อนเกิดการติดเชื้อ หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่แรกรับผู้ป่วยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล กระทั่งถึงวันที่ส่งตรวจตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยแล้วมีรายงานผลการเพาะเชื้อพบ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือดและแพทย์วินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อจากเชื้อก่อโรคดังกล่าว

จ. ระยะเวลาการรักษาตัวในโรงพยาบาลภายหลังการติดเชื้อ หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่วันที่เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยแล้วมีรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* และแพทย์วินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อก่อโรคดังกล่าวกระทั่งถึงวันที่จำหน่ายผู้ป่วย

ฉ. ยาต้านจุลชีพที่ได้รับมาก่อน หมายถึง ยาต้านจุลชีพทั้งชนิดฉีดหรือชนิดรับประทานที่ผู้ป่วยได้รับมาภายใน 30 วัน ก่อนที่จะมีการส่งตรวจตัวอย่างเลือดและมีรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด โดยที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพชนิดนั้น ๆ เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

ช. ยากลุ่ม third generation cephalosporins ที่ได้รับมาก่อน หมายถึง ยา ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone และยากลุ่ม third generation cephalosporins ชนิดอื่น ๆ ทั้งชนิดฉีดและชนิดรับประทานที่ผู้ป่วยได้รับมาภายใน 30 วัน ก่อนที่จะส่งตรวจตัวอย่างเลือดและมี

รายงานผลการเพาะเชื้อ *E.coli* หรือ *K.pneumoniae* ในกระแสเลือด โดยที่ผู้ป่วยต้องได้รับยาต้านจุลชีพชนิดดังกล่าวเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

ซ. ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised host) หมายถึง ผู้ป่วยโรค AIDS และผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือได้รับยากลุ่ม corticosteroids มาก่อนอย่างน้อย 14 วัน ก่อนที่จะส่งตรวจตัวอย่างเลือดและมีรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด (Lautenbach, *et al.*, 2001)

ฌ. การได้รับยากดภูมิคุ้มกันมาก่อน หมายถึง การได้รับยากลุ่มเคมีบำบัดมาก่อนเป็นเวลาอย่างน้อย 14 วันก่อนที่จะส่งตรวจตัวอย่างเลือดและมีรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด

ญ. การได้รับยากลุ่ม corticosteroids มาก่อน หมายถึง การได้รับ prednisolone ขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 20 mg/day (หรือเทียบเท่า) มาก่อนเป็นอย่างน้อย 14 วัน ก่อนที่จะส่งตรวจตัวอย่างเลือดและมีรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด (Lautenbach, *et al.*, 2001)

ฎ. การได้รับการคาสายสวนหลอดเลือด (intravascular catheter) มาก่อน หมายถึง การที่ผู้ป่วยได้รับการคาสาย intravascular catheter ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นทางเส้นเลือดแดงหรือเส้นเลือดดำภายใน 30 วัน ก่อนที่จะมีการส่งตรวจตัวอย่างเลือดและรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด โดยผู้ป่วยได้รับการคาสาย catheter เหล่านั้นไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ฏ. การได้รับการคาสายสวนปัสสาวะ (foley catheter) มาก่อน หมายถึง การที่ผู้ป่วยได้รับการคาสายสวนปัสสาวะภายใน 30 วัน ก่อนที่จะมีการส่งตรวจตัวอย่างเลือดและรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือดโดยผู้ป่วยได้รับการคาสายสวนปัสสาวะนั้นเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ฐ. การได้รับเครื่องช่วยหายใจ (ventilator) มาก่อน หมายถึง การที่ผู้ป่วยมีการใช้เครื่องช่วยหายใจภายใน 30 วัน ก่อนที่จะมีการส่งตรวจตัวอย่างเลือดและรายงานผลการเพาะเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ในกระแสเลือด โดยผู้ป่วยได้รับการใช้เครื่องช่วยหายใจดังกล่าวเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ฑ. ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) หมายถึง การมีค่า absolute neutrophil count น้อยกว่า 500 cells/mm^3

ฒ. ผู้ป่วยที่มีการทำงานของตับบกพร่อง (hepatic dysfunction) หมายถึง การที่ผู้ป่วยมีสิ่งต่อไปนี้ไม่น้อยกว่า 2 อย่าง คือ ค่า bilirubin concentration $>$ 2.5 mg/dL ค่า aspartate

amino-transferase (AST) หรือ alanine aminotransferase (ALT) > 2 เท่าของค่าปกติ หรือมีประวัติว่าเป็นโรคตับ (known liver disease) (Lautenbach, *et al*., 2001)

ฌ. ผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่อง (renal insufficiency) หมายถึง ผู้ป่วยที่มีค่า serum creatinine มากกว่า 2.0 mg/dL (Lautenbach, *et al*., 2001)

ด. SAP II score (Simplified Acute Physiology Score II) เป็นแบบประเมินความรุนแรงของโรคจากข้อมูลของผู้ป่วย แบบประเมินนี้สร้างจากผู้เชี่ยวชาญโดยใช้สถิติเป็นเครื่องมือในการเลือกและกำหนดตัวแปรจากข้อมูลของผู้ป่วย (Le Gall, *et al*., 1993) ดังรายละเอียดในภาคผนวก จ

ต. การไม่มีไข้ หมายถึง การมีอุณหภูมิร่างกายที่วัดทางปากน้อยกว่า 38.5°C หรือวัดทางรักแร้น้อยกว่า 38°C เป็นเวลาติดต่อกันอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ถ. clinical outcomes พิจารณาเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะในการรักษาเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมงและประเมินหลังจากได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเป็นเวลา 3 วันและเมื่อสิ้นสุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพชนิดนั้น ๆ โดยแบ่งผลการรักษาเป็น

(1) การรักษาหาย (clinical cure) หมายถึง ผู้ป่วยไม่มีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อเช่น หายจากอาการไข้หรือหายจากการมี leukocytosis เป็นต้น

(2) การรักษาดีขึ้น (clinical improvement) หมายถึง ผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อบางอย่างดีขึ้นแต่ยังไม่หมดไปเช่น หายจากอาการไข้แต่ยังคงมี leukocytosis หรือ ยังคงมีไข้อยู่แต่ไข้มีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ เป็นต้น

(3) การรักษาล้มเหลว (clinical failure) หมายถึง ผู้ป่วยยังมีอาการและอาการแสดงคงเดิมหรือแย่ลงอันเนื่องมาจากภาวะติดเชื้อดังกล่าวหรือเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงยาต้านจุลชีพที่ให้อยู่เดิมเป็นยาต้านจุลชีพตัวอื่นหรือจำเป็นต้องผ่าตัดเพื่อรักษาภาวะติดเชื้อแต่ไม่รวมถึงการเปลี่ยนยาเนื่องจากอาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาหรือการเปลี่ยนยาที่ให้ทางหลอดเลือดดำเป็นรูปแบบรับประทาน

(4) การเสียชีวิตของผู้ป่วยที่เกี่ยวเนื่องกับการติดเชื้อ หมายถึง การที่ผู้ป่วยเสียชีวิตโดยมีอาการหรืออาการแสดงทางคลินิกที่แสดงถึงภาวะติดเชื้อหรือการเสียชีวิตที่มีสาเหตุจาก organ failure เนื่องจากภาวะติดเชื้อ เช่น ผู้ป่วยยังคงมีอาการหรืออาการแสดงของการติดเชื้ออยู่ในขณะที่เสียชีวิตและ/หรือเสียชีวิตภายใน 7 วัน หลังจากเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยไม่สามารถหาสาเหตุการเสียชีวิตจากอย่างอื่นมาอธิบายได้อย่างชัดเจน (Le Gall, *et al*., 1993)

(5) ไม่สามารถประเมินผลการรักษาได้ (undetermined) หมายถึง การขาดการติดตามผลหรือเหตุผลใดก็ตามที่ทำให้ไม่สามารถประเมินผลการรักษาได้

ผู้ป่วยที่ได้รับการประเมินผลการรักษาทางคลินิก (clinical outcome) ว่ามีการรักษาหาย (clinical cure) หรือมีการรักษาดีขึ้น(clinical improvement) จะถูกเรียกว่าผู้ป่วยตอบสนองต่อการรักษา (responder) (Beringer-Wong A, *et al*., 2002) ส่วนผู้ป่วยที่มีการรักษาล้มเหลว (clinical failure) หรือเสียชีวิตจากการติดเชื้อ (dead) หรือมีการกลับเป็นซ้ำ (relapse) จะถูกเรียกว่าผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษา (non-responder) หรือเรียกรวมว่าล้มเหลวต่อการรักษา

ท. microbiological outcomes พิจารณาเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะในการรักษาเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง โดยแบ่งผลการรักษาเป็น

(1) eradicated หมายถึง ไม่พบเชื้อก่อโรคจากที่ตรวจพบครั้งแรกก่อนการรักษาจาก เมื่อทำการเพาะเชื้อซ้ำอีกครั้งในระหว่างให้การรักษาหรือภายหลังสิ้นสุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ

(2) persist หมายถึง ยังคงพบเชื้อก่อโรคจากที่ตรวจพบครั้งแรกก่อนการรักษา เมื่อทำการเพาะเชื้อซ้ำอีกครั้งในระหว่างให้การรักษาหรือภายหลังสิ้นสุดการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ

(3) undetermined หมายถึง การขาดการติดตามผลหรือเหตุผลใดก็ตามที่ทำให้ไม่สามารถประเมินผลการรักษาได้

ธ. การประเมินบทบาทของยาต้านจุลชีพที่ผู้ป่วยได้รับ โดยยังไม่ทราบผลการเพาะเชื้อและรายงานความไวต่อยาต้านจุลชีพ (empiric therapy) แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้ คือ

(1) กลุ่ม 1 : ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมหรือมีแนวโน้มให้ผลการรักษาที่ดีทางคลินิก หมายถึง ยาต้านจุลชีพที่ที่เชื้อก่อโรคไวต่อยาและได้รับยาภายในเวลา 48 ชั่วโมงตั้งแต่มีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อในกระแสเลือด

(2) กลุ่ม 2 : ยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสมหรือมีแนวโน้มให้ผลการรักษาที่ไม่ดีทางคลินิก หมายถึง ยาต้านจุลชีพที่เชื้อก่อโรคดื้อต่อยาหรือไม่ได้ยาต้านจุลชีพที่เชื้อก่อโรคไวต่อยาภายในเวลา 48 ชั่วโมงตั้งแต่มีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อในกระแสเลือด

น. combination disc หมายถึง disc ยาที่ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง disc ยาดังกล่าวนี้จะประกอบด้วยยาต้านจุลชีพ 2 ชนิดใน disc เดียวคือ cephalosporins และ β–lactamase inhibitor ซึ่งใน ปี ค.ศ. 2000 NCCLS รับรองวิธีการ combination disc diffusion ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อแบคทีเรียได้

บ. E-test strip (Murray, *et al*., 1995) หมายถึง แถบพลาสติกที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในระดับต่าง ๆ จากมากไปน้อย ใช้สำหรับหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

3.4.4.4 ตัวแปร แผนวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติ สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิก

ใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูลและกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ โดย

ก. เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย (demographic data) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ใช้ χ^2 test ในการวิเคราะห์

ข. ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ กับการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ใช้ logistic regression model for multivariate analysis ในการวิเคราะห์

ค. การเปรียบเทียบอัตราตาย อัตราการรักษาล้มเหลว อัตราการพบเชื้อในกระแสเลือดภายหลังสิ้นสุดการรักษา ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ใช้ χ^2 test หรือ Fisher's Exact test ในการวิเคราะห์

ง. การเปรียบเทียบระยะเวลารักษาตัวโรงพยาบาลภายหลังเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อซึ่งสร้างเอนไซม์ ESBL กับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อซึ่งไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ใช้ Student's *t* test หรือ McNemar หรือ Wilcoxon sign rank test ในการวิเคราะห์

จ. การเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายจากการใช้ยาต้านจุลชีพของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL กับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสที่มีสาเหตุจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ใช้ Student's *t* test หรือ McNemar หรือ Wilcoxon sign rank test ในการวิเคราะห์

ฉ. รูปแบบการสั่งใช้ยาในการรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* หรือ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL และความสัมพันธ์ระหว่างยาที่ผู้ป่วยได้รับในการรักษากับความไวของเชื้อต่อยา นั้น ๆ แสดงผลในรูปของความถี่และร้อยละ