

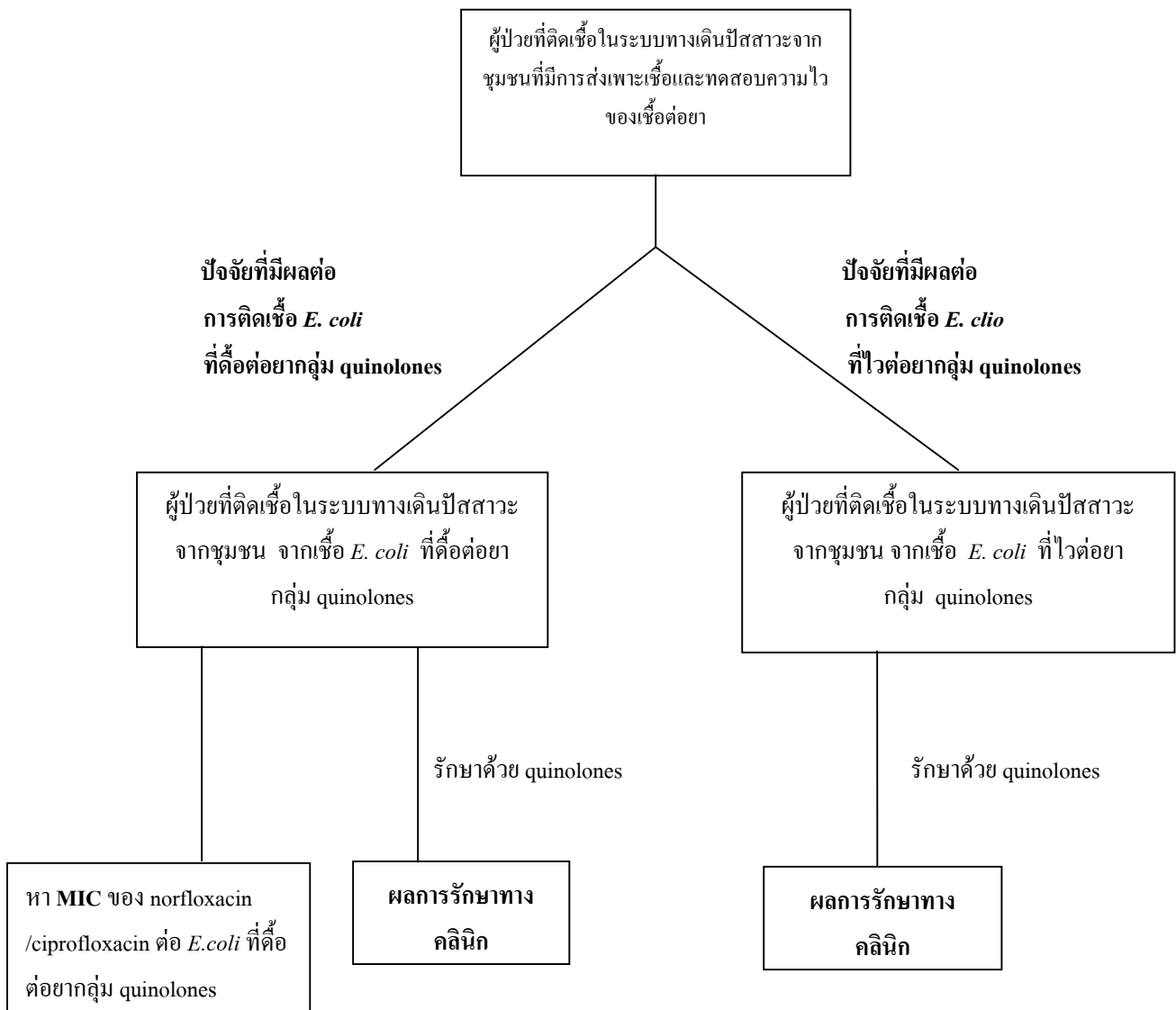
# บทที่ 3

## วิธีการวิจัย

### 3.1 รูปแบบการวิจัย

Prospective cohort study

### 3.2 กรอบแนวคิดการวิจัย



### 3.3 ประชากรที่จะศึกษา

3.3.1 ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากชุมชนที่มีการส่งเพาะเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยา และรับการตรวจรักษาที่คลินิกเวชปฏิบัติทั่วไป 1 และ 2 คลินิกอายุรกรรม คลินิกศัลยกรรม คลินิกนรีเวช ห้องฉุกเฉิน หอผู้ป่วยอายุรกรรมชายและหญิง หอผู้ป่วยนรีเวช และหอผู้ป่วยศัลยกรรมชายและหญิง ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เก็บข้อมูลเป็นระยะเวลา 8 เดือน ระหว่างวันที่ 1 พฤษภาคม 2546 ถึง 31 ธันวาคม 2546

3.3.2 เชื้อ quinolone resistant *E.coli* ที่เพาะได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากชุมชน ซึ่งมีการส่งเพาะเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยา จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และทำการเก็บตัวอย่างเชื้อเป็นระยะเวลา 8 เดือน ระหว่างวันที่ 1 พฤษภาคม 2546 ถึง 31 ธันวาคม 2546

### 3.4 ขนาดตัวอย่าง

$p_1$  = อัตราการหายที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในผู้ป่วย UTI ที่เกิดจากเชื้อ quinolone susceptible *E. coli* ให้เท่ากับ 0.9 (Ena, et al., 1995 ; Raz, et al., 2002)

$p_2$  = อัตราการหายที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในผู้ป่วย UTI ที่เกิดจากเชื้อ quinolone resistant *E. coli* ให้เท่ากับ 0.6 ( Ena, et al., 1995 ; Raz , et al., 2002)

$$p = (p_1 + p_2) / 2 = 0.75$$

$$\text{อำนาจการทดสอบ} = 80\%, \beta = 0.20 \quad Z_{1-\beta} = Z_{0.80} = 0.84$$

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

คำนวณขนาดตัวอย่างการทดลองสองกลุ่มที่ทราบค่าสัดส่วนของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นจากสูตร (ทัสสันี นุชประยูร และเดิมศรี ชำนิจารกิจ, 2541)

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

$$n/\text{กลุ่ม} = \frac{(1.64+0.84)^2 2(0.75)(0.25)}{(0.9-0.6)^2}$$

$$= 25.26$$

ดังนั้นใช้ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 30 คน โดยกำหนดให้มีการ drop out ได้ 5 ราย

ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ drop out =  $5(100)/30 =$  ร้อยละ 16.67

และจากการรวบรวมข้อมูลย้อนหลังของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่าง มกราคม 2545 ถึง พฤษภาคม 2545 พบปริมาณผู้ป่วย UTI ที่เกิดจาก quinolone resistant *E. coli* เป็นเชื้อสาเหตุเฉลี่ย 5 รายจากจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 30 ราย

นั่นคือ จำนวนผู้ป่วย UTI ที่เกิดจาก quinolone resistant *E. coli* ที่ต้องการใช้ในการศึกษา จำนวน 30 ราย ผู้วิจัยจะต้องทำการเก็บรวบรวมข้อมูลจากผู้ป่วย UTI ทั้งสิ้นเท่ากับ

$$30(30)/5 = 180 \text{ ราย}$$

และเมื่อคิดเปอร์เซ็นต์ drop out ร้อยละ 16.67

จะต้องเก็บข้อมูลผู้ป่วยทั้งหมดเมื่อเริ่มทำการศึกษา =  $100(180)/83.3 = 216$  ราย

เมื่อพิจารณาศักยภาพในการทำวิจัยให้สำเร็จ ซึ่งได้แก่ เงินทุนและระยะเวลาในการศึกษา จึงวางแผนในการเก็บตัวอย่างเชื้อ quinolone resistant *E. coli* รวมทั้งสิ้นอย่างน้อย 30 ตัวอย่าง วางแผนในการศึกษาปัจจัยเสี่ยงและผลการรักษาทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากชุมชนจากเชื้อ *E. coli* ที่ไวและคือต่อยา quinolones ในอัตราส่วน 1 : 3 รวมทั้งสิ้นอย่างน้อย 120 รายหรือ 30 : 90

### 3.5 วิธีการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากประชากรที่จะศึกษา

#### 3.5.1 เกณฑ์และวิธีการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าการศึกษา

3.5.1.1 ผู้ป่วยในกลุ่มศึกษา (case) หมายถึง ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบจากชุมชน ที่มี quinolone resistant *E. coli* เป็นเชื้อสาเหตุ

3.5.1.2 ผู้ป่วยในกลุ่มควบคุม (control) หมายถึง ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบจากชุมชน ที่มี quinolone susceptible *E. coli* เป็นเชื้อสาเหตุ

3.5.1.3 เชื้อ quinolone resistant *E. coli* ที่เพาะได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีภาวะของโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ (urinary tract infection, UTI) จากชุมชน ซึ่งมีการส่งเพาะเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยา โดยผู้ป่วย 1 คนต่อตัวอย่างเชื้อ 1 ตัวอย่าง

โดยผู้ป่วยในกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุมนั้น นำมาศึกษาในส่วนของปัจจัยเสี่ยงและผลการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่คือต่อยาในกลุ่ม

quinolones ที่มาจากชุมชน ซึ่งกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาผลการรักษา (ศึกษาโดยการจับคู่ตัวอย่างในการศึกษา) จะเป็นกลุ่มตัวอย่างย่อยในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยเสี่ยง (ไม่ได้ใช้วิธีจับคู่ตัวอย่างในการศึกษา)

### 3.5.2 เกณฑ์และวิธีการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างออกจากการศึกษา

แบ่งเป็น 3 กรณีคือ

3.5.2.1 การศึกษาปัจจัยเสี่ยงของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่คือต่อยาในกลุ่ม quinolones ที่มาจากชุมชน มีเกณฑ์ดังนี้

3.5.2.1.1 ผู้ป่วยที่มีประวัติเข้ารับการรักษาดัวในโรงพยาบาลภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนเข้าร่วมการศึกษา

3.5.2.1.2 ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ภายหลังจาก 48 ชั่วโมง หลังจากเข้ารับการรักษาดัวในโรงพยาบาล

3.5.2.1.3 ผู้ป่วยที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น

3.5.2.1.4 ผู้ป่วยที่มีเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ *E.coli* เป็นเชื้อสาเหตุ

3.5.2.1.5 ผู้ป่วยที่ปฏิเสธที่จะให้ข้อมูลที่ทำการศึกษา

3.5.2.2 การศึกษาผลการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่คือต่อยาในกลุ่ม quinolones ที่มาจากชุมชน มีเกณฑ์ดังนี้

3.5.2.2.1 ผู้ป่วยที่มีประวัติเข้ารับการรักษาดัวในโรงพยาบาลภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนเข้าร่วมการศึกษา

3.5.2.2.2 ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ภายหลังจาก 48 ชั่วโมง หลังจากเข้ารับการรักษาดัวในโรงพยาบาล

3.5.2.2.3 ผู้ป่วยที่ใช้ยาปฏิชีวนะภายในช่วง 24 ชั่วโมงก่อนเข้าร่วมการศึกษา

3.5.2.2.4 ผู้ป่วยที่มีภาวะ asymptomatic bacteriuria

3.5.2.2.5 เด็ก สตรีมีครรภ์

3.5.2.2.6 ผู้ป่วยที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น

3.5.2.2.7 ผู้ป่วยที่มีเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ *E.coli* เป็นเชื้อสาเหตุ

3.5.2.2.8 ผู้ป่วยที่ใช้ยาชนิดอื่นที่ไม่ใช่ quinolones ในการรักษา

### 3.5.2.2.9 ผู้ป่วยที่ปฏิเสธที่จะให้ข้อมูลที่ทำการศึกษา

3.5.2.3 การศึกษาทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความไวต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม quinolones ของเชื้อ quinolone resistant *E.coli* มีเกณฑ์ดังนี้

3.5.2.3.1 เชื้อ *E.coli* ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีประวัติเข้ารับการรักษาทัวในโรงพยาบาลภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนเข้าร่วมการศึกษา

3.5.2.3.2 เชื้อ *E.coli* ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะภายหลัง 48 ชั่วโมงหลังจากเข้ารับการรักษาทัวในโรงพยาบาล

## 3.6 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนคือ

- ส่วนที่ 1 : การศึกษาข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยถึงปัจจัยเสี่ยงและผลการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่คือต่อยาในกลุ่ม quinolones ที่มาจากชุมชน
- ส่วนที่ 2 : การศึกษาทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความไวต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม quinolones ของเชื้อ quinolone resistant *E.coli*

ส่วนที่ 1 : การศึกษาข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

### 3.6.1 การศึกษาปัจจัยเสี่ยงโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่คือต่อยาในกลุ่ม quinolones ที่มาจากชุมชน

#### 3.6.1.1 แบบบันทึกที่ใช้ในงานวิจัย

แบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย (ภาคผนวก ค)

ใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัยและใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ (ภาคผนวก ข)

### 3.6.1.2 วิธีดำเนินการ

(1) ติดต่อประสานงานล่วงหน้าไปยังผู้ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา คลินิก งานเวชระเบียนและสถิติ

(2) คัดเลือกผู้ป่วยทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยคัดเลือกจากผู้ป่วยที่มีผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะเป็น *E.coli*

(3) ผู้ป่วยที่เป็นผู้ป่วยนอก ที่มาทำการตรวจรักษายังคลินิกเวชปฏิบัติทั่วไป 1 และ 2 คลินิก อายุรกรรม คลินิกศัลยกรรม คลินิกนรีเวช และห้องฉุกเฉิน ผู้วิจัยจะชี้แจงทำความเข้าใจกับผู้ป่วย ถึงวิธีการศึกษาวิจัยดังรายละเอียดในใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัย และให้ผู้ป่วยตอบรับใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ภาคผนวก ข) บันทึกข้อมูลต่าง ๆ ของผู้ป่วย ลงในแบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย (ภาคผนวก ค)

(4) สำหรับผู้ป่วยใน ซึ่งจะทำการศึกษาในหอผู้ป่วยอายุรกรรมชายและหญิง หอผู้ป่วย นรีเวชและหอผู้ป่วยศัลยกรรมชายและหญิง ผู้วิจัยจะชี้แจงทำความเข้าใจกับผู้ป่วยถึงวิธีการศึกษาวิจัยดังรายละเอียดในใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัย และให้ผู้ป่วยตอบรับใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย บันทึกข้อมูลต่าง ๆ ของผู้ป่วยลงในแบบเก็บข้อมูลชนิดเดียวกันกับในข้อ (3) และทำการเก็บข้อมูลยังหอผู้ป่วยที่ผู้ป่วยอยู่เลย

(5) ข้อมูลปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด UTI ที่เกิดจากเชื้อ quinolone resistant *E.coli* เก็บข้อมูล โดยการใช้แบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย (ภาคผนวก ค) สอบถามผู้ป่วยโดยตรงในวันที่ผู้ป่วยมาตรวจติดตามผลการรักษาตามที่แพทย์นัดยังคลินิกต่าง ๆ ในกรณีที่เป็นผู้ป่วยนอก หรือบนหอผู้ป่วยสำหรับผู้ป่วยใน หรือโดยการโทรศัพท์ ใช้จดหมายติดต่อสอบถาม และทบทวนเวชระเบียนผู้ป่วย หลังจากผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ และกลับไปรับประทานยาต่อที่บ้านแล้ว โดยข้อมูลที่ ต้องการได้แก่ อายุ เพศ โรคประจำตัวที่ผู้ป่วยมี ประวัติการป่วยเป็นโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ ของผู้ป่วย (UTI type) ประวัติการใช้ยาในกลุ่ม quinolones ของผู้ป่วยก่อนหน้าที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น UTI 4 สัปดาห์ ประวัติการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ ก่อนหน้าที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น UTI 4 สัปดาห์ และข้อมูลอื่น ๆ

(6) ผู้วิจัยจะไม่ทราบผลว่าผู้เข้าร่วมการศึกษาป่วยเป็น UTI จาก quinolone resistant *E.coli* หรือ quinolone susceptible *E.coli* โดยห้องชันสูตรจะแจ้งผลเพาะเชื้อเฉพาะเชื้อสาเหตุเท่านั้น จะไม่แจ้งผลการทดสอบความไว จนกระทั่งเก็บข้อมูลของปัจจัยเสี่ยงและผลการรักษาเรียบร้อยแล้ว และหลังจากนั้นจึงแบ่งผู้เข้าร่วมการศึกษออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม ตามผลการเพาะเชื้อที่ทราบจากห้องชันสูตรโรค

(7) โดยในการศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการติดเชื้อ quinolone resistant *E.coli* ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะที่มาจากชุมชน ทำการศึกษาโดยไม่จับคู่ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

(8) รวบรวมข้อมูลของผู้ป่วย นำมาวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติต่อไป

### 3.6.2 การศึกษาผลการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม quinolones ที่มาจากชุมชน

#### 3.6.2.1 แบบบันทึกที่ใช้ในงานวิจัย

แบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย	(ภาคผนวก ค)
แบบประเมินผลการรักษาทางคลินิก	(ภาคผนวก ง)
แบบสอบถามสำหรับบันทึกอาการ และอาการแสดงของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะต่าง ๆ ที่ติดตามผลทางคลินิก	(ภาคผนวก จ)
ใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัยและใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ	(ภาคผนวก ซ)

#### 3.6.2.2 วิธีดำเนินการ

(1) ติดต่อประสานงานล่วงหน้าไปยังผู้ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา คลินิก งานเวชระเบียนและสถิติ

(2) คัดเลือกผู้ป่วยทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยคัดเลือกจากผู้ป่วยที่มีผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะเป็น *E.coli*

(3) ผู้ป่วยที่เป็นผู้ป่วยนอก ที่มาทำการตรวจรักษายังคลินิกเวชปฏิบัติทั่วไป 1 และ 2 คลินิก อายุรกรรม คลินิกศัลยกรรม คลินิกนรีเวช และห้องฉุกเฉิน ผู้วิจัยจะชี้แจงทำความเข้าใจกับผู้ป่วยถึงวิธีการศึกษาวิจัยดังรายละเอียดในใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัย และให้ผู้ป่วยตอบรับใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ภาคผนวก ซ) บันทึกข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับอาการของผู้ป่วย และติดตามผลการรักษาครั้งแรกในวันที่แพทย์นัดผู้ป่วยมาติดตามผลการรักษายังคลินิกต่าง ๆ ดังกล่าวลงในแบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย (ภาคผนวก ค)

(4) สำหรับผู้ป่วยใน ซึ่งจะทำการศึกษาในหอผู้ป่วยอายุรกรรมชายและหญิง หอผู้ป่วยนรีเวชและหอผู้ป่วยศัลยกรรมชายและหญิง ผู้วิจัยจะชี้แจงทำความเข้าใจกับผู้ป่วยถึงวิธีการศึกษาวิจัยดังรายละเอียดในใบเชิญชวนเข้าร่วมโครงการวิจัย และให้ผู้ป่วยตอบรับใบยินยอมเข้า

ร่วมโครงการวิจัย บันทึกข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับอาการของผู้ป่วย และติดตามผลการรักษาของผู้ป่วย ลงในแบบเก็บข้อมูลชนิดเดียวกันกับในข้อ (3) และทำการเก็บข้อมูลยังหอผู้ป่วยที่ผู้ป่วยอยู่เลย

(5) ผู้วิจัยจะไม่ทราบผลว่าผู้เข้าร่วมการศึกษาป่วยเป็น UTI จาก quinolone resistant *E.coli* หรือ quinolone susceptible *E.coli* โดยห้องชันสูตรจะแจ้งผลเฉพาะเชื้อเฉพาะเชื้อสาเหตุเท่านั้น จะไม่แจ้งผลการทดสอบความไว จนกระทั่งเก็บข้อมูลเรียบร้อยแล้ว และหลังจากนั้นจึงแบ่งผู้เข้าร่วม การศึกษาออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม ตามผลการเพาะเชื้อที่ทราบจากห้อง ชันสูตรโรค

(6) การศึกษาผลการรักษาของการติดเชื้อ quinolone resistant *E.coli* ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ ในระบบทางเดินปัสสาวะที่มาจากชุมชน จับคู่ระหว่างผู้ป่วยกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุมในอัตรา ส่วน 1: n โดยเป็นผู้ป่วยที่มีอายุแตกต่างกันไม่เกิน 5 ปี เป็นผู้ป่วยนอกหรือผู้ป่วยในเหมือนกัน เพศเดียวกัน และป่วยเป็นโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบในประเภทเดียวกันคือ เป็น complicated UTI เหมือนกัน หรือ uncomplicated UTI เหมือนกัน

(7) ข้อมูลเกี่ยวกับผลการรักษา เก็บข้อมูลโดยผู้วิจัย ด้วยวิธีเดียวกันกับการเก็บข้อมูลปัจจัย เสี่ยงโดยเก็บข้อมูลวันแรกที่ผู้ป่วยมารับการรักษา วันที่ 3 ของการรักษา เมื่อเสร็จสิ้นการรักษา เพื่อประเมินการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วย (เนื่องจากระยะเวลาของการรักษาที่ผู้ป่วยจะได้ รับจะอยู่ในช่วงประมาณ 3-14 วัน) 5-9 วันหลังการรักษาเสร็จสิ้น เพื่อติดตามผลการตอบสนองต่อ การรักษานั้น ซึ่งโดยธรรมชาติของโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบส่วนล่าง แบบไม่ซับซ้อนนั้น จะ สามารถหายได้เองภายในระยะเวลาประมาณ 5-9 วัน (Hooton, 2003) และ 28-42 วันหลังจากการ รักษาเสร็จสิ้น เป็นประเมินการกลับเป็นซ้ำ ซึ่งมักจะเกิดขึ้นภายใน 6 สัปดาห์หลังการรักษาเสร็จ สิ้น (Rubin, et al., 1992 ; Henry, et al., 1998 ; Warren, et al., 1999 ; Richard, et al., 2002) โดย ข้อมูลที่ศึกษาได้แก่ ชนิดและขนาดของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษา ผลการรักษาทางคลินิก ซึ่ง แบ่งเป็น 5 ระดับดังแสดงในนิยามศัพท์ และการเข้ารับการรักษาครั้งใหม่ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากผู้ป่วยเข้ารับการรักษา ครั้งแรกเนื่องจากผู้ป่วยยังคงมีอาการของทางเดิน ปัสสาวะอักเสบอยู่

(8) รวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย นำมาประเมินผลการรักษาทางคลินิกตามแบบ ประเมิน (ภาคผนวก ง) และนำมาวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติต่อไป



## ส่วนที่ 2 : การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

### 3.6.3 การศึกษาทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความไวต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม quinolones ของเชื้อ quinolone resistant *E.coli*

#### 3.6.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

Mueller-Hinton agar	Merck, Darmstadt, Germany
Nutrient agar	Merck, Darmstadt, Germany
EMB agar	Merck, Darmstadt, Germany
Tryptic Soy broth	Merck, Darmstadt, Germany
0.9% Sodium chloride	ไทยนครพัฒนา ประเทศไทย
McFarland 0.5 standard	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดสงขลา
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในงานวิจัยแสดงในภาคผนวก ก	

#### 3.6.3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

Microcentrifuge tube 1.5 ml	
Disposable petri dish ขนาด 90 mm	
ชุด E - test (norfloxacin, ciprofloxacin)	AB Biodisk, Solna, Sweden
Norfloxacin disk	Oxoid Limited, Hampshire, England
Refrigerator, incubator (35-37 °c), autoclave	
ไม้พันสำลี, ถังมือ, loop, forceps, swabs	

### 3.6.3.3 การเก็บตัวอย่างและการเพาะเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ quinolone resistant *E. coli* ที่เพาะได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะจากชุมชน ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2546 ถึง 31 ธันวาคม 2546 โดยผู้ป่วย 1 คนต่อตัวอย่างเชื้อ 1 ตัวอย่าง มีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและเพาะเชื้อดังต่อไปนี้

(1) นักเทคนิคการแพทย์ใช้วิธีตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการและวิธี disk diffusion test ของโรงพยาบาลในการรายงานผลการเพาะเชื้อ quinolone resistant *E. coli* ของผู้ป่วยที่มีภาวะ urinary tract infection (UTI)

(2) ป้ายเชื้อที่ได้ดังกล่าวลงใน nutrient agar ในหลอดทดลองสำหรับเก็บส่งตรวจที่ผู้วิจัยเตรียมไว้ให้ และเชื้อดังกล่าวจะถูกนำมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสตูล (สถานที่ที่ผู้วิจัยใช้ในศึกษาทางห้องปฏิบัติการหาความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ quinolone resistant *E. coli*) โดยผู้วิจัยไปรับด้วยตัวเอง

(3) นำเชื้อที่ได้มาเพาะเชื้อซ้ำเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อและแยกเชื้อ *E. coli* ออกจากเชื้ออื่นที่อาจปนเปื้อนได้ โดยนำมาเลี้ยงใน tryptic soy broth และ incubate ที่ 35 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่ได้จากใน tryptic soy broth ที่ขุ่นแล้วมา streak ลงบน EMB agar และนำไป incubate ที่ 35 °c ambient air เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเป็น *E. coli* โดยดูจากลักษณะ colony, pigment ซึ่งจะมีสีเป็นสี metallic sheen (สีสนิม)

(4) เชื้อเชื้อที่เพาะได้ลงใน nutrient agar หลังจากนั้นนำหลอดเก็บเชื้อดังกล่าวไปแช่เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °c โดยระบุหมายเลขส่งตรวจให้ชัดเจน

### 3.6.3.4 การตรวจสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion test ก่อนนำมาหา MIC ของเชื้อต่อยาต่าง ๆ

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างเชื้อได้อย่างน้อย 30 ตัวอย่างแล้ว ก่อนที่จะนำไปหาค่า MIC ของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ quinolone resistant *E. coli* จะทำการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวซ้ำอีกครั้งโดยวิธี disk diffusion test ว่าเป็นเชื้อ quinolone resistant *E. coli* หรือไม่ ซึ่งถ้าหากตรวจสอบแล้วพบว่า

เชื้อดังกล่าวไม่ใช่เชื้อ quinolone resistant *E. coli* ก็จะตัดตัวอย่างเชื่อนั้นออกจากการวิจัย โดยมีวิธีตรวจสอบดังนี้

- (1) นำเชื้อตัวอย่างที่แช่เก็บไว้แล้วมาทำการเพาะเชื้อซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้งใน EMB agar
- (2) นำเชื้อที่ isolate แล้วมาเลี้ยงใน tryptic soy broth และ incubate ที่ 35 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- (3) นำมาเทียบความขุ่นให้เท่ากับความขุ่น 0.5 McFarland standard โดยใช้

0.9% sodium chloride เจือจาง

(4) จุ่ม sterile swab ลงใน inoculum suspension ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ (3) หมุน swab กดกับด้านในของหลอดให้ swab พอหมด ๆ แล้วนำมาป้ายลงบน Mueller Hinton agar เป็น 3 ระบายถี่ ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที

(5) วางแผ่น disk ของยา norfloxacin ลงไป นำไป incubate ที่ 35°c ambient air เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

(6) อ่านขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส ถ้าขนาด  $\geq 17$  mm แปลผลว่าเชื้อไวต่อยาในกลุ่ม quinolones ซึ่งไม่ใช่เชื้อที่ต้องการ และคัดตัวอย่างเชื่อนั้นออกจากการวิจัย

(7) ใช้ *E. coli* ATCC 25922 เป็นสายพันธุ์ควบคุมคุณภาพ ซึ่ง quality control range ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของยา norfloxacin เท่ากับ 28-35 mm

### 3.6.3.5 การหา MIC ของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อ quinolone resistant *E. coli*

นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบโดยวิธี disk diffusion test แล้วว่าเป็น เชื้อ quinolone resistant *E. coli* มาหาค่า MIC ของยาด้านจุลชีพกลุ่ม quinolones ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้ยา norfloxacin และ ciprofloxacin เป็นตัวแทนของยาด้านจุลชีพในกลุ่มนี้ และทำการหาค่า MIC ด้วยวิธี E-test

E-test เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะที่นำหลักการของ dilution และ diffusion test มารวมกัน ซึ่งค่า MIC ที่ได้จากวิธี E-test เป็นค่าของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะแบบ continuous concentration gradient ที่มีความแม่นยำกว่าการหาค่า MIC ด้วยวิธี conventional ทัวไปที่ใช้หลักการของ continuous two-fold serial dilution method E-test strip มีลักษณะเป็นแผ่นพลาสติกบางขนาด 5 × 60 mm ที่มีคุณสมบัติไม่นำไฟฟ้า และไม่มีรูพรุน มีสเกลต่อเนื่องครอบคลุมความเข้มข้นกว้างถึง 15 ระดับ (15 two-fold dilution) ค่า MIC แสดงเป็นตัวเลขมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (mcg/ml) ซึ่งยาด้านจุลชีพที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่

Norfloxacin	มีช่วงสเกลแสดงค่าความเข้มข้นตั้งแต่ 0.016-256 mcg/ml
Ciprofloxacin	มีช่วงสเกลแสดงค่าความเข้มข้นตั้งแต่ 0.002-32 mcg/ml

วิธีการหาค่า MIC ของยาด้านจุลชีพต่อเชื้อ quinolone resistant *E. coli* มีขั้นตอนดังนี้

(1) นำเชื้อตัวอย่างที่แช่เก็บไว้และผ่านการตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี disk diffusion test แล้วว่าเป็นเชื้อ quinolone resistant *E. coli* มาทำการเพาะเชื้อซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้งใน EMB agar

(2) นำเชื้อที่ isolate แล้วมาเลี้ยงใน tryptic soy broth และ incubate ที่ 35 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

(3) นำมาเทียบความขุ่นให้เท่ากับความขุ่น 0.5 McFarland standard โดยใช้

0.9% sodium chloride เจือจาง

(4) จุ่ม sterile swab ลงใน inoculum suspension ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ (3) หมุน swab กดกับด้านในของหลอดให้ swab พอหมาด ๆ แล้วนำมาป้ายลงบน Mueller Hinton agar เป็น 3 ระบายถี่ ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาทีเพื่อให้ inoculum ซึมเข้าลงสู่ agar และไม่เปียกเกินไปที่จะวาง strip

(5) ใช้ forceps จับ E-test strip วางลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อให้แนบสนิท โดยหันด้านสเกลขึ้น และห้ามขยับหรือเคลื่อนย้าย strip บนอาหารเลี้ยงเชื้ออีก เนื่องจากความเข้มข้นของยาได้ซึมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว การทดสอบอาจผิดพลาดได้

(6) นำไป incubate ที่ 35°C ambient air เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

(7) อ่านค่า MIC ตรงจุดที่ inhibit zone มาบรรจบกัน (ภาคผนวก ข) และบันทึกค่าที่ได้ลงในแบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย (ภาคผนวก ค)

(8) การแปลผลอ้างอิงตามเกณฑ์มาตรฐานของ NCCLS 2001 criteria ดังตาราง 4

ตาราง 4 การแปลผลความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อยาด้านจุลชีพที่ใช้ในงานวิจัย

ยาด้านจุลชีพ	MICs (mcg/ml)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Norfloxacin	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4

(9) ใช้ *E. coli* ATCC 25922 เป็นสายพันธุ์ควบคุมคุณภาพ ซึ่ง quality control range ของ MICs ตามเกณฑ์มาตรฐานของ NCCLS guideline 2001 แสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 Quality control range ของ MICs สำหรับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922

ยาต้านจุลชีพ	MICs (mcg/ml)
Norfloxacin	0.03-0.12
Ciprofloxacin	0.004-0.015

### 3.7 นิยามศัพท์

- (1) ผลการรักษาทางคลินิก (Clinical outcome) (Henry, *et al.*, 1998) แบ่งผลรักษาเป็น
1. การรักษาหาย (Clinical cure) หมายถึง ผู้ป่วยไม่มีอาการและอาการแสดงของ UTI และไม่มีอาการหรือโรคแทรกซ้อนอื่นๆ หรือมีการเปลี่ยนแปลงการรักษาภายใน 7 วัน
  2. ผลการรักษาดีขึ้น (Improvement) หมายถึง ผู้ป่วยมีอาการหรืออาการแสดงของ UTI ลดลง โดยไม่มีอาการหรืออาการแสดงใหม่ของ UTI เกิดเพิ่มขึ้น
  3. การรักษาล้มเหลว (Clinical failure) หมายถึง ผู้ป่วยยังคงมีอาการและอาการแสดงออกคงเดิม หรือแย่ลง หรือเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่เดิมเป็นยาปฏิชีวนะตัวอื่น แต่ไม่รวมถึงการเปลี่ยนยาเนื่องจากการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา
  4. ไม่สามารถประเมินผลการรักษาได้ (Undetermined) หมายถึง การขาดข้อมูลที่จำเป็น ซึ่งทำให้ไม่สามารถประเมินผลการรักษาได้ อาจเกิดจากการขาดการติดตามผล
  5. การกลับเป็นซ้ำ (Recurrence) หมายถึง ผู้ป่วยมีอาการหรืออาการแสดงของ UTI ขึ้นมาใหม่ หลังจากที่หายหรือมีอาการดีขึ้นแล้ว ภายในเวลา 28-42 วันหลังจากการรักษาเสร็จสิ้น

โดยปรับผลการรักษาทางคลินิกเป็น 2 ระดับในการนำมาวิเคราะห์ข้อมูล คือ ประสิทธิภาพสำเร็จในการรักษา หมายถึง ผลการรักษาหายและดีขึ้น (cure and improvement) และผลการรักษาล้มเหลว หมายถึง ผลการรักษาล้มเหลวและกลับเป็นซ้ำ (failure and recurrence)

(2) urinary tract infection (UTI) หมายถึง ภาวะติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ซึ่งรวมไปถึงที่กระเพาะปัสสาวะ ท่อปัสสาวะ ต่อมลูกหมาก ไต และเนื้อเยื่อรอบ ๆ ไต เป็นภาวะติดเชื้อจาก microorganism ซึ่งพบแบคทีเรียในปัสสาวะจากการเพาะเชื้อขึ้นดังนี้

1.  $\geq 10^3$  cfu/ml ในผู้ที่มีอาการ UTI หรือในผู้ที่มี pyuria
2.  $\geq 10^5$  cfu/ml 1 ครั้งในผู้ที่มีอาการ UTI หรือ 2 ครั้ง (แบคทีเรียตัวเดิม) ในผู้ที่ไม่มีอาการ
3.  $\geq 10^2$  cfu/ml จากปัสสาวะสวน

(3) Acute uncomplicated UTI (Rubin, *et al.*, 1992) หมายถึง ภาวะติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โดยไม่มีความผิดปกติของท่อทางเดินปัสสาวะทั้งโครงสร้างและหน้าที่ (no structure or functional abnormality) โดยมีอาการแสดงออกหลาย ๆ อย่างร่วมกัน คือ dysuria, urgency, frequency, gross hematuria, lower-back และ/หรือ abdominal discomfort และ low-grade fever

(4) complicated UTI (Rubin, *et al.*, 1992) หมายถึง การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ ในผู้ป่วยต่อไปนี้

1. มีความผิดปกติของท่อทางเดินปัสสาวะทั้งโครงสร้างและหน้าที่ (structure or functional abnormality) เช่น obstruction, prostatic infection, calculi, infected cyst, external drainage
2. ผู้ป่วยชาย, เด็ก หรือสตรีมีครรภ์
3. metabolic/hormonal abnormalities เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน, ผู้ป่วยภาวะ renal impairment
4. impaired host response เช่น ผู้ป่วยที่มีภาวะ neutropenia, transplantation

(5) Asymptomatic bacteriuria (Rubin, *et al.*, 1992) หมายถึง การพบเชื้อแบคทีเรียในปัสสาวะจำนวนมากกว่า  $10^5$  cfu/ml 2 ครั้งติดต่อกันและเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน โดยไม่มีอาการผิดปกติอื่น ๆ ของระบบทางเดินปัสสาวะ

(6) Pyuria หมายถึง การพบมีเม็ดเลือดขาว (WBC) ในปัสสาวะ โดยพบ

1.  $\geq 10$  WBC/ml สำหรับปัสสาวะสดไม่ได้ปั่น
2. 2-5/HPF ในปัสสาวะที่ปั่นแล้ว

(7) Minimum Inhibitory Concentration (MIC) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง จนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

(8) UTI type หมายถึง ประวัติการเกิด UTI ของผู้ป่วยซึ่งแบ่งเป็นชนิดต่าง ๆ คือ

1. ชนิดที่ 1 คือ ผู้ป่วยที่ประวัติการเกิด UTI เป็นครั้งแรก
2. ชนิดที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ประวัติการเกิด UTI เป็นครั้งที่ 2
3. ชนิดที่ 3 คือ ผู้ป่วยที่ประวัติการเกิด UTI มากกว่า 3 ครั้ง ในรอบ 1 ปี ที่ผ่านมา

(9) การได้รับยาต้านจุลชีพก่อนหน้าที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น UTI 4 สัปดาห์ หมายถึง การได้รับยาต้านจุลชีพเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น UTI 4 สัปดาห์

### 3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้กำหนดค่าความเชื่อมั่นทางสถิติในระดับร้อยละ 95 ( $\alpha = 0.05$ ) และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ SPSS for Window version 10.0 โดย

(1) ใช้ Logistic regression analysis ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ กับการเกิดการติดเชื้อ quinolone resistant *E.coli* โดยมีตัวแปรอิสระ ได้แก่ อายุที่มากกว่าหรือเท่ากับ 65 ปี การมีภาวะโรคร่วม การมีประวัติได้รับยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ รวมถึง quinolones มาก่อน เพศ ระดับการศึกษา การมีประวัติป่วยเป็นโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบมาก่อน (UTI type) และประเภทของโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบที่เป็น (ซับซ้อนหรือไม่ซับซ้อน)

(2) ใช้ Fisher's Exact test ในการวิเคราะห์ผลการรักษาทางคลินิกของการติดเชื้อ quinolone resistant *E.coli*

(3) ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ quinolone resistant *E. coli* แสดงผลในลักษณะของความถี่และร้อยละ

(4) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (minimum inhibitory concentrations ; MICs) ใช้สถิติเชิงพรรณนา  $MIC_{50}$  และ  $MIC_{90}$

### 3.9 การพิจารณาทางด้านจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคน

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคนของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์