บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. ประชากร

ทำการศึกษาในผู้ป่วยอายุรกรรมทั่วไป 26 ราย และในผู้ป่วยหนักทางอายุรกรรม 18 ราย ที่ได้รับยา gentamicin แบบวันละครั้ง ในช่วงเวลา 8.00 - 14.00 น. ในระหว่างเดือน เมษายน - กันยายน พ.ศ.2542 ณ โรงพยาบาลน่าน

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วย

1.) ผู้ป่วยมีอายุมากกว่า 18 ปี และได้รับยา gentamicin ที่บริหารแบบวันละครั้งอย่างน้อยเป็นเวลา 3 วัน เพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยอายุรกรรมทั่วไป และหออภิบาลผู้ป่วยหนัก
2.) ผู้ป่วยหนักทุกรายต้องได้รับออกซิเจน [ซึ่งอาจได้รับเครื่องช่วยหายใจ (mechanical ventilation) และได้รับการใส่ท่อ endotracheal tube หรือ tracheostomy tube หรืออาจได้รับ PEEP เพื่อแก้ไขภาวะพร่องออกซิเจน]
3.) ผู้ป่วยหนักอาจได้รับยากลุ่ม cathecolamine คือ adrenaline noreadrenaline หรือ dopamine

เกณฑ์ในการคัดออก

1.) ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะไตวายจนต้องทำ hemodialysis, hemofiltration หรือ peritoneal dialysis
2.) ตั้งครรภ์
3.) มีภาวะตับแข็ง (hepatic cirrhosis) หรือมีน้ำในช่องท้องที่รุนแรง
4.) มีบาดแผลฉกรรจ์ หรือแผลจากไฟไหม้น้ำร้อนลวก

3.2. วัสดุและอุปกรณ์การทำวิจัย

3.2.1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1.1. TDx ®Gentamicin, Abbott laboratories, Abbott Park, IL 60064 ประกอบด้วย

1.) Gentamicin calibrator, list No. 9512-01 ประกอบด้วย

calibrators (2.5 มล.)ในซีรั่มคน	ความเข้มข้นของ gentamicin (มก./ลิตร)
A	0.0
B	0.5
C	1.5
D	3.0
E	6.0
F	10.0

วัตถุกันเสียคือ sodium azide

2.) Gentamicin control, List No. 9512 – 10 ประกอบด้วย

Controls (2.5 มล.) ในซีรั่มคน	ระดับยาเป้าหมาย (มก./ลิตร)	ช่วงของระดับยาที่วัดได้ (มก./ลิตร)
L	1.0	0.85 – 1.15
M	4.0	3.60 – 4.40
H	8.0	7.20 – 8.80

วัตถุกันเสียคือ sodium azide

3.) Gentamicin reagent pack , List No. 9512 – 60 ประกอบด้วย

รายการ	ส่วนประกอบ
S	< 1 % gentamicin antiserum (sheep) ใน buffer ที่มี protein stabilizer (4.0 มล.). วัตถุกันเสียคือ aodium azide
T	< 0.01% gentamicin fluorescence tracer ใน buffer ที่มี surfactant และ protein stabilizer (3.5 มล.) .วัตถุกันเสียคือ sodium azide
P	pretreatment solution เป็น surfactant ใน buffer ที่มี protein stabilizer (2.5 มล.) วัตถุกันเสียคือ sodium azide

3.2.1.2. X SYSTEM Dilution buffer , List No.9519 ประกอบด้วย phosphate buffer 0.1 โมลาร์ และ protein stabilizer มี 0.1 % sodium azide เป็นวัตถุกันเสีย

3.2.2. เอกสารและวัสดุที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วย

3.2.2.1. sample cartridges

3.2.2.2. sample cuvettes

3.2.2.3. ถุงมือ

3.2.2.4. microtube พลาสติกสำหรับใส่ซีรั่ม

3.2.2.5. เข็มและหลอดฉีดยาสำหรับเจาะเลือด

3.2.2.6. แบบเก็บข้อมูลของผู้ป่วย (ภาคผนวก ง)

3.2.3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.3.1. Automated fluorescence polarization immunoassay analyser (TDx®, Abbott Labboratories, Abbott Park, IL 60064, สหรัฐอเมริกา)

3.2.3.2. Centrifuge

3.2.3.3. Freezer อุณหภูมิประมาณ – 20 °C

3.3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1. การเก็บตัวอย่างเลือด

3.3.1.1. เก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยในวันที่สามของการให้ยา gentamicin โดยเจาะจากเส้นดำเลือดที่แขนของผู้ป่วย (เป็นคนละข้างกับที่ให้ยาหรือสารน้ำ; intraveneous fluid) จำนวน 3 – 5 ซีซี บันทึกเวลาตั้งแต่เริ่มหยดยา gentamicn เข้าทางหลอดเลือดดำ โดยขนาดยาที่ใช้เป็นไปตามที่แพทย์สั่ง ผสมยาใน 5% dextrose in water 100 มล. และใช้เวลาหยดเข้าทางหลอดเลือดประมาณ 30-60 นาที บันทึกเวลาที่เสร็จสิ้นการหยดยา และเวลาที่เจาะเลือดหลังให้ยา โดยบันทึกเวลาให้ถูกต้องทุกครั้ง ทำการเจาะเลือดทั้งหมด 4 ครั้ง ดังนี้คือ

1.) ภายใน 30 นาทีก่อนให้ยา

2.) หลังให้ยาครั้งที่ 1 โดยห่างจากเวลาเริ่มให้ยาอย่างน้อย 3 ชั่วโมงเพื่อป้องกันการเจาะเลือดที่อยู่ในช่วงของการกระจายตัว ซึ่งพิจารณาจากผู้ป่วย ถ้าเป็นผู้ป่วยที่น้ำหนักตัวน้อยและได้รับขนาดยาสูง หรือในผู้ป่วยสูงอายุ หรือในผู้ป่วยที่มีระดับ creatinine ในซีรั่มสูงอาจต้องเจาะที่เวลาห่างมากกว่านี้ เนื่องจากจะได้ลดความเสี่ยงที่จะได้ระดับยาครั้งแรกอยู่ในช่วงของการกระจายตัว

3.) หลังให้ยาครั้งที่ 2 โดยห่างจากการเจาะหลังให้ยาครั้งที่ 1 ประมาณหนึ่งช่วงของค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยา

ประมาณค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยาโดยการแทนค่าในสูตรที่ 4 ในภาคผนวก ข ซึ่งปริมาตรการกระจายยาประมาณจากค่าเฉลี่ยของประชากรทั่วไปคือ 0.25 ลิตร/กก. gentamicin clearance ประมาณจากค่า creatinine clearance จากสูตรของ Cockcroft และ Gault (53) ดังแสดงในสูตรที่ 10 ในภาคผนวก ข

4.) หลังให้ยาครั้งที่ 3 โดยห่างจากการเจาะหลังให้ยาครั้งที่ 1 ประมาณสองช่วงของค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยา

หมายเหตุ : ถ้าผู้ป่วยได้รับยาในขนาดที่ต่ำ มีน้ำหนักตัวมาก และมีไตปกติ อาจต้องเจาะเร็วกว่าค่าครึ่งชีวิตที่คำนวณได้ เพราะถ้าเจาะตามเวลาคำนวณได้ จะทำให้ได้ระดับยาที่ต่ำมากจนเครื่องไม่สามารถวัดค่าได้

3.3.1.2. นำตัวอย่างเลือดมาปั่นแยกซีรั่มทันทีโดยใช้แรงเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 – 15 นาที หรือแช่น้ำแข็งไว้และนำมาปั่นแยกซีรั่มภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด

3.3.1.3. นำซีรั่มที่ปั่นได้มาแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ – 20 °C และทำการตรวจวิเคราะห์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด (67, 72, 85)

3.3.2. เก็บรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

เก็บข้อมูลปัจจัยในตัวผู้ป่วยคือ serum creatinine ,creatinine clearance (คำนวณจากสูตรของ Cockcroft และ Gault), albumin, อายุ, เพศ, hematocrit, ส่วนกลับของ hematocrit, น้ำหนัก, ส่วนสูง, body mass index, ideal body weigh สำหรับผู้ป่วยหนักทุกรายจะได้รับการประเมินว่ามีภาวะ sepsis หรือ septic shock หรือไม่ตามเกณฑ์ของ Bone และคณะ (83) และได้รับการประเมิน APACHE II score (84) โดยจะทำการประเมินในวันที่ทำการเจาะเลือด เพื่อจะได้สัมพันธ์กับค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของผู้ป่วยในวันนั้น และเก็บข้อมูลการใช้ยากลุ่ม cathecolamine การใช้เครื่องช่วยหายใจ และการใช้ PEEP เพิ่มเติมในกลุ่มผู้ป่วยหนัก รายละเอียดต่างๆแสดงในภาคผนวก ง

3.3.3. การตรวจวิเคราะห์หาระดับยาในเลือด

นำซีรั่มที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) โดยใช้เครื่อง TDx ® analyser ซึ่งมีระดับต่ำสุดที่วัดได้ (sensitivity) เท่ากับ 0.27 มก./ลิตร มี coefficient of variation ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และในการวิเคราะห์ทำครั้งเดียวกันน้อยกว่าร้อยละ 6 และสามารถอ่านค่าได้ในช่วง 0.27 – 10.0 มก./ลิตร ถ้ามีค่าสูงกว่านี้ต้องเจือจางด้วย X SYSTEM Dilution buffer, List No. 9519 เพื่อให้เครื่องสามารถอ่านได้ในช่วงที่กำหนดโดยคำนวณความเข้มข้นจริงได้จากสูตร

ความเข้มข้นของยาในเลือดจริง = ค่าที่เครื่องอ่านได้ × Manual dilution factor

$$\text{Manual dilution factor} = \frac{\text{ปริมาตรซีรั่มของผู้ป่วย + ปริมาตรของ buffer}}{\text{ปริมาตรซีรั่มของผู้ป่วย}}$$

ถ้าระดับยาต่ำกว่า 0.27 มก./ลิตร เครื่องจะไม่สามารถอ่านค่าได้ ให้ถือว่าระดับยามีค่าเท่ากับ 0 มก./ลิตร

สาเหตุที่เลือกเครื่อง TDx® เพราะเป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ในการติดตามวัดระดับยาในเลือดในการวิเคราะห์หาระดับยา gentamicin เนื่องจากสะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องใช้ความชำนาญมากเหมือนกับการตรวจวัดด้วยวิธีอื่นๆ ถึงแม้ความจำเพาะจะต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ gas liquid chromatography (GLC) (29) แต่ในทางปฏิบัติแล้วมีความเป็นไปได้ยากที่จะมีการให้ยากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ร่วมกันหลายตัว จึงทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างน่าเชื่อถือ

3.3.4. การคำนวณค่าทางเภสัชจลนศาสตร์

คำนวณ โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.4.1. นำระดับยาในเลือดหลังจากให้ยาทั้ง 3 ค่าและเวลาที่ได้มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของระดับยาและเวลาหลังจากสิ้นสุดการหยดเข้าทางหลอดเลือดดำ โดยการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression analysis) ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows โดยสันนิษฐานว่าเป็นแบบ one compartment model เพื่อหาจุดตัดบนแกน Y ซึ่งค่า antilog ของค่าที่ตัดกับแกน Y จะเป็นค่าระดับยาสูงสุดหลังจากให้ยา และนำค่าความชันของกราฟมาคำนวณหาค่าคงที่ของการขจัดยา จากสูตร ที่ 1 ในภาคผนวก ข

จากการวิเคราะห์ถ้าได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ถือว่าได้เจาะเลือดหลังจากที่ยาได้กระจายยาตัวจนสมดุลย์แล้ว และให้ใช้ค่าความชันที่ได้จากทั้ง 3 ค่า แต่ถ้าผลการวิเคราะห์ได้ระดับนัยสำคัญที่ $p > 0.05$ แสดงว่าค่า log ของระดับยาทั้ง 3 ค่าไม่ได้มีความสัมพันธ์กันแบบเชิงเส้น โดยความชันระหว่างระดับยาครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2 จะมีความชันมากกว่าระหว่างระดับยาครั้งที่ 2 กับครั้งที่ 3 แสดงว่าได้เจาะเลือดครั้งแรกในขณะที่ยาอยู่ในช่วงของการกระจายตัว ให้ใช้ความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาครั้งที่ 2 กับครั้งที่ 3 แทน

3.3.4.2. นำค่าระดับยาสูงสุดที่ได้จาก 3.3.4.1. และค่าของระดับยาในเลือดก่อนให้ยาจากที่วัดได้จริงมาคำนวณหาค่าปริมาตรการกระจายยา โดยใช้สูตรของ Sawchuke และ Zaske (27-28) ดังแสดงในสูตรที่ 2 ในภาคผนวก ข

3.3.4.3. คำนวณหาค่า gentamicin clearance และค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยาจากสูตร ที่ 3 และ 4 ในภาคผนวก ข

3.3.4.4. คำนวณขนาดและช่วงเวลาการให้ยาจากสูตรของ Sawchuk และZaske (27-28) โดยกำหนดให้ระดับยาสูงสุดที่ต้องการเท่ากับ 20 มก./ลิตร เพื่อให้ได้อัตราส่วนระหว่างระดับยาสูงสุดและค่า MIC เท่ากับ 10 และระดับยาก่อนให้ยาครั้งต่อไปเท่ากับ 0.5 มก./ลิตร (5, 15, 17, 20, 56) โดยคำนวณหาช่วงเวลาที่เหมาะสมก่อน และปรับระยะห่างของการให้ยาเป็น 24 ,36, 48, 60 หรือ 72 ชั่วโมง และนำช่วงเวลาที่ปรับแล้วมาคำนวณหาขนาดยาที่เหมาะสมต่อไปตามสูตรที่ 6 และ 7 ในภาคผนวก ข

3.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows

3.4.1. ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยแสดงด้วย descriptive statistic

3.4.2. ใช้ unpaired Student 's t test (หรือ Mann-Whitney ถ้าข้อมูลไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ) เพื่อเปรียบเทียบค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของผู้ป่วย ระหว่างผู้ป่วยหนักกับผู้ป่วยทั่วไป โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ถ้าข้อมูลไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ และมีค่า extreme value หรือ outlier ให้ตัดค่าดังกล่าวออก และทำการเปรียบเทียบกันอีกครั้ง

3.4.3. ใช้การวิเคราะห์ความถดถอยเชิงซ้อน (multiple linear regression analysis) โดยวิธี stepwise เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยในตัวผู้ป่วยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์และการคำนวณขนาดการใช้ยา โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยในตัวผู้ป่วยกับค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ดูได้จากค่าสัมประสิทธิ์ของการตัด

สินใจ (coefficient of determination; R^2) ถ้า R^2 มีค่ามากแสดงว่าปัจจัยในตัวผู้ป่วยนั้นสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ได้มาก

การวิเคราะห์ความถดถอย ต้องสันนิษฐานว่าตัวแปรนำ (ปัจจัยในตัวผู้ป่วย) จะต้องคงที่ และมีการวัดโดยปราศจากความคลาดเคลื่อน (error) ส่วนตัวแปรตาม (ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์) จะต้องมีการแจกแจงแบบปกติ (74) ถ้าไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ สามารถทำให้มีการแจกแจงแบบปกติ โดยตัดค่าที่เป็น outlier หรือ extreme value ออกจนสามารถทำให้ตัวแปรตามมีการแจกแจงแบบปกติได้

สำหรับกลุ่มผู้ป่วยหนักได้มีการแยกวิเคราะห์ดังนี้คือ

- กลุ่มผู้ป่วยหนักทุกรายยกเว้นรายที่เป็น outlier หรือ extreme value ที่ทำให้ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ
- กลุ่มผู้ป่วยหนักมากที่มีค่า APACHE II score ที่เปอร์เซ็นต์ไทล์ (percentile) มากกว่าหรือเท่ากับ 75
- กลุ่มผู้ป่วยหนักปานกลางถึงหนักมากที่มีค่า APACHE II score ที่เปอร์เซนต์ไทล์มากกว่าหรือเท่ากับ 50
- กลุ่มผู้ป่วยไม่หนักมากที่มีค่า APACHE II score ที่เปอร์เซนต์ไทล์น้อยกว่า 50

3.4.4. ใช้ one sample Student ' s t test วิเคราะห์สมการที่ได้จากข้อ 3.4.3 ว่าสามารถพยากรณ์ได้แม่นยำหรือไม่ ตามหลักของ Sheiner และ Beal (73) ที่ดูจากค่า bias และ precision โดย

3.4.4.1. bias คือค่า mean error (ME) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทำนาย (predicted values) เมื่อแทนค่าในสมการ กับค่าที่คำนวณได้จริงจากการเจาะวัดระดับยาในเลือด (measured values) ตามสูตรที่ 11 ในภาคผนวก ข ซึ่งจะเป็นค่าบวกหรือลบก็ได้ ถ้าเป็นบวกแสดงว่าค่าที่ทำนายได้โดยเฉลี่ยเป็นค่าที่สูงกว่าค่าที่วัดได้จริง (over prediction) แต่ถ้าเป็นลบแสดงว่าค่าที่ทำนายได้โดยเฉลี่ยเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าที่วัดได้จริง (underprediction)

3.4.4.2.precision ดูได้จากค่า mean absolute error (MAE) หรือ root mean square error (RMSE) โดยค่า MAE คือค่าเฉลี่ยของค่าที่เป็น absolute ของความแตกต่าง

ระหว่างค่าที่ทำนายได้เมื่อแทนค่าในสมการ กับค่าที่คำนวณได้จริงจากการเจาะวัดระดับยาในเลือดตามสูตรที่ 12 ในภาคผนวก ข ส่วน root meas square error (RMSE) คำนวณได้จากรากที่สอง (square root) ของ mean square error (MSE) ซึ่ง MSE คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของความแตกระหว่างค่าที่ทำนายได้เมื่อแทนค่าในสมการ กับค่าที่คำนวณได้จริงจากการเจาะวัดระดับยาในเลือดยกกำลังสอง ตามสูตรที่ 13 และ 14 ในภาคผนวก ข

ค่า ME MAE หรือ RMSE ถ้าเป็นค่าที่ใกล้ศูนย์มาก แสดงว่าสมการที่สร้างขึ้นเป็นสมการที่สามารถทำนายได้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยการวัดระดับยาในเลือด และ MEจะต้องมีค่า 95 % confidence interval ที่ผ่านศูนย์เสมอ