บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อที่ใช้ในการทดลองหาระดับยา คือ spore suspension ของ Bacillus subtilis (1904E และ ATCC 6633) เตรียมโดยให้เชื้อเจริญในอาหารที่เหมาะสม ทิ้งช่วงเวลาให้เชื้อสร้างสปอร์ เก็บสปอร์ลงใน physiological saline นำ suspension นี้มาทำให้ร้อนที่ 65°ซ 30 นาที เพื่อทำลาย vegetative form เก็บ dense suspension ไว้ที่ 4°ซ เมื่อจะใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ ปรับให้ขุ่นเท่ากับ Brown tube no 2 หรือประมาณ 10^7 CFU/ml

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Antibiotic medium เตรียมโดยใช้ Oxoid antibiotic agar no 2 ของบริษัท Merck 25.5 ก. และ Sodium citrate 3.0 ก. ในน้ำกลั่น 1000 มล. ต้ม ให้ละลายและคนให้เข้ากันด้วย magnetic stirror นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที ปรับ pH สุดท้ายให้ได้ 7.0 ที่ 25°ซ

2.2 Mueller Hinton Agar (MHA) ของบริษัท Difco Laboratories เตรียมโดยใช้ media 38 ก. ในน้ำกลั่น 1000 มล. นำไปต้มให้ละลายและคนให้เข้ากัน ด้วย magnetic stirror นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ เช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.3 Mueller Hinton Broth (MHB) ของบริษัท Difco Laboratories เตรียมโดยใช้ media 21 ก. ในน้ำกลั่น 1000 มล นำไปต้มให้ละลายและคนให้เข้ากัน ด้วย magnetic stirror นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ เช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.4 Nutrient Agar (NA) ของบริษัท Difco Laboratories เตรียมโดย ใช้ media 23 ก. ในน้ำกลั่น 1000 มล. นำไปต้มให้ละลาย และคนให้เข้ากันด้วย magnetic stirror แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.5 Phosphate Buffer XI โดยใช้ K_2HPO_4 3.75 ก. และ KH_2PO_4 2.0 ก. ในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH สุดท้ายให้ได้ 7.0 ± 1 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.1

3. Sensitivity dise : cefotaxime (30 µg), cefuroxime (30 µg) cefoperazone (75 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), tobramycin (10 µg), BIM 25 (trimetroprim 1.25 µg + sulfamethoxazole 23.75 µg) chloramphenicol (30 µg) และ dicloxacillin (5 µg)

4. ยา

4.1 ยาที่ใช้เป็น standard powder: cefotaxime, cefoxitin, cefuroxime, cefoperazone, cefazolin, cefamandole, amikacin, tobramycin และ gentamicin

4.2 ยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อในคนไข้เพื่อทำการประเมินผล: cefotaxime (claforan®) Batch no H095 ขนาด 0.5 ก. และ 1 ก.

5. อุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ มีดังนี้

5.1 petri-dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.

5.2 test tube

5.3 finn pipette ขนาด 0-50 µl 0-250 µl และ finn tip

5.4 pipette ขนาด 1 มล., 5 มล., 10 มล. และ pasteur pipette

5.5 loop และ needle

5.6 flask ขนาด 250 มล., 500 มล., 1000 มล.

5.7 beaker ขนาด 125 มล., 250 มล., 500 มล.

5.8 shaking machine

5.9 กระดาษปรับระดับ

5.10 เครื่องปั่น (centrifuge)

5.11 incubator

5.12 zone reader

6. แบบฟอร์มที่ใช้ในการเก็บข้อมูล

6.1 แบบฟอร์มในการเก็บข้อมูลสำหรับการศึกษาในคนไข้แต่ละคน

6.2 แบบฟอร์มข้อมูลทั่วไปของคนไข้ (เวชระเบียนของโรงพยาบาล)

6.3 แบบฟอร์มผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. การศึกษาในหลอดทดลองเพื่อตรวจดูความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทำการศึกษา เป็นเชื้อที่เพาะได้จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้ ซึ่งเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อ หรือ เป็นเชื้อที่เกิดขึ้นใหม่ในระหว่างให้การรักษาด้วยยาเซฟโพแทคซิม

1.1 การทดสอบความไวของเชื้อโดย Agar diffusion method (Kirby-Bauer method)

อาหารเลี้ยงเชื้อใช้ Mueller Hinton agar (MHA) ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 (ถ้าผิดไปจากนี้ต้องปรับด้วย 1N. NaOH หรือ 1N.HCl) และเทลงในจานเพาะเชื้อให้มีความหนา 4 มม. โดยเทบนกระดานซึ่งปรับระดับให้สม่ำเสมอ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้จานเพาะเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ต้องใช้ MHA 25 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้ว เก็บที่ 4°ซ ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้ควรตั้งให้ผิวหน้าแห้งเสียก่อน

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกัน 2-3 โคโลนีจากวุ้นใส่ลงใน test tube ซึ่งมีอาหารเหลวคือ Mueller Hinton Broth ในปริมาณหลอดละ 2 มล. นำไปเพาะที่ 35°ซ - 37°ซ เป็นเวลา 3-5 ชม. แล้วนำมาปรับให้ได้แบคทีเรีย 10^5 - 10^7 ตัว/มล. โดยเทียบกับ Mcfarland's standard ซึ่งเทียบเท่าหลอดของ $BaSO_4$ ก่อนยกหลอดที่บรรจุแบคทีเรียและหลอด $BaSO_4$ ขึ้นดูความขุ่นโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นดำหนาประมาณ 1 ซม. อยู่ด้านหลังเพื่อให้อ่านง่ายขึ้น ปรับความขุ่นด้วย broth ชนิดเดียวกับที่ใช้ในตอนแรก โดยใช้ capillary pipette ดูดจากเชื้อ หยดทีละหยด เขย่าเข้ากัน

จนได้ความขุ่นที่ต้องการ

.Mcfarland' s standard เตรียมโดยใช้ 0.5 มล. ของ 0.048M. Barium chloride (1.75 % W/V $BaCl_2 . 2H_2O$) + 99.5 มล. ของ 0.18 M. sulphuric acid (1% V/V) ความขุ่นมาตรฐานนี้ นำมาใส่หลอดจุกเกลียวปิดให้แน่น เก็บไว้ได้นาน 6 เดือน

วิธีเพาะแบคทีเรียบนวุ้น ใช้สำลีสะอาดป้ายไม้ที่ปราศจากเชื้อ ชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้แล้ว บิดให้แห้งพอหมาดๆ กับข้างหลอด นำมาป้ายบน MHA โดยลากเส้นผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ แล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ก่อนๆ ให้ทั่วผิวหน้า แล้วหมุนจานเลี้ยงเชื้อไปประมาณ 60° แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวางแผ่นสารต้านจุลชีพ (Antibiotic disc) ต่อไปจะเรียกสั้นๆว่า disc ปกติให้เก็บไว้ที่ 4° ซ ในภาชนะที่มีสารดูดความชื้น ก่อนจะใช้ต้องนำออกมาวางในอุณหภูมิห้องให้หายเย็นก่อน ใช้ปากคีบ (forceps) จับ disc วางบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วกดเบาๆ เพื่อให้แนบสนิทกับผิววุ้น ไม่ควรวาง disc เกิน 6 ชนิดในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. และในกรณีที่ใช้จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 ซม. ควรวาง disc ไม่เกิน 12 ชนิด ควรวางห่างกันให้สม่ำเสมอเสร็จแล้วนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ไปเลี้ยงที่ 35°-37° ซ เป็นเวลา 16-18 ชม. แล้วนำมาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (inhibition zone) โดยวัดเป็น มม. แล้วนำไปเปรียบเทียบกับตารางการแปลผลในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ตารางการแปลผลการทดสอบความไวของแบคทีเรีย โดย Kirby-Bauer method

Antimicrobial Agent	Disc Content	Zone Diameter nearst whole mm Resistant	Intermediate	Susceptible	Approximate MIC Correlates Resistant	Susceptible
Amikacin	30 µg	≤ 14	15–16	17	32µg/ml	≤16µg/ml
Ampicillin when testing gram-negative enteric or ganisms and enterococci	10 µg	≤11	12–13	≥14	≥ 32µg/ml	≤ 8µg/ml
Ampicillin when testing staphylococci and pencillin G-susceptible microorganisms	10 µg	≤ 20	21–28	≥ 29	B-lactamase	≤ 0.2ug/ml
Ampicillin when testing Haemophilus species	10 µg	19	-	≥ 20	≥ 2.0ug/ml	≤ 2.0ug/ml
Bacitracin	10 units	8	9–12	≥ 13	-	-
Carbenicillin when testing Proteus species and Escherichia coli	100 µg	≤ 17	18–22	≥ 23	≥ 32ug/ml	≤ 16ug/ml
Carbenicillin when testing Pseudomonas aeruginosa	100 µg	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 250ug/ml	≤125ug/ml
Cefamandole	30 µg	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32ug/ml	≤ 10ug/ml
Cefoxitin	30 µg	≤14	15–17	≥ 18	≥ 32ug/ml	≤ 10ug/ml
Cephalothin	30 µg	≤14	15–17	≥18	≥ 32ug/ml	≤ 10ug/ml
Chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13–17	≥ 18	≥ 25ug/ml	≤12.5ug/ml
Clindamycin	2 µg	≤14	15–16	≥ 17	≥ 2ug/ml	≤ 1ug/ml
Colistin	10 µg	≤ 8	9–10	≥11	≥ 4ug/ml	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Antimicrobial Agent	Disc Content	Zone Diameter nearst whole mm			Approximate MIC Correlates	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Erythromycin	15 µg	≤13	14-17	≥ 18	≥ 8µg/ml	≤ 2µg/ml
Gentamicin	10 µg	≤12	13-14	≥ 15	≥ 8µg/ml	≤ 4µg/ml
Kanamycin	30 µg	≤13	14-17	≥ 18	≥25µg/ml	≤ 6µg/ml
Methicillin when testing staphycococci	5 µg	≤ 9	10-13	≥ 14	-	≤ 3µg/ml
Nalidixic Acid	30 µg	≤13	14-18	≥ 19	≥32µg/ml	≤12µg/ml
Neomycin	30 µg	≤12	13-16	≥ 17	-	-
Nitrofurantoin	300 µg	≤14	15-16	≥ 17	≥100µg/ml	≤25µg/ml
Penicillin G when testing staphylococci	10 units	≤20	21-28	≥ 29	B-lactamase	≤ 0.1µg/ml
Penicillin G when testing other microorganisms	10 units	≤11	12-21	≥ 22	≥ 32µg/ml	≤1.5µg/ml
Polymyxin B	300 units	≤ 8	9-11	≥ 12	≥50units/ml	-
Streptomycin	10 µg	≤11	12-14	≥ 5	-	-
Sulfonamides	250 or 300 µg	≤12	13-16	≥ 17	≥350µg/ml	≤100µg/ml
tetracycline	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥12µg/ml	≤ 4µg/ml
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25 µg 23.75 µg	≤10	11-15	≥ 16	≥8/152µg/ml	≤ 2/38µg/ml
Tobramycin	10 µg	≤12	13-14	≥ 15	≥ 8µg/ml	≤ 4µg/ml
Vancomycin	30 µg	≤ 9	10-11	≥ 12	-	≤ 5µg/ml
Cefotaxime	30 µg	≤14	15-22	≥ 23	≥ 16µg/ml	≤ 4µg/ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal inhibitory concentration หรือ MIC)

1.2.1 การเตรียมจานเพาะเชื้อที่ ใช้ในการทดลอง (Test plates)

อาหารเลี้ยงเชื้อคือ MHA

เลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมดังต่อไปนี้ : Amikacin, Tobramycin, gentamicin, Netilmicin, Sisomicin, Cefamandole, Cefoxitin, Cefazolin และ Cefotaxime

เตรียมสารละลาย cefotaxime(ref. std. ความแรง 1000 ก./ 1.048 ก. ของ Standard) ดังต่อไปนี้

a	Stock solution	2000	µg/ml	
	0.02096 ก + 10	มล.น้ำกลั่น	2000	µg/ml
b	9.6 มล.(a) + 5.4	"	1280	"
c	2 " (b) + 2	"	640	"
d	1 " (b) + 3	"	320	"
e	1 " (b) + 7	"	160	"
f	2 " (e) + 2	"	80	"
g	1 " (e) + 3	"	40	"
h	1 " (e) + 7	"	20	"
i	2 " (h) + 2	"	10	"
j	1 " (h) + 3	"	5	"
k	1 " (h) + 7	"	2.5	"
l	2 " (k) + 2	"	1.25	"
m	1 " (k) + 3	"	0.625	"
n	1 " (k) + 7	"	0.313	"
o	2 " (n) + 2	"	0.157	"
p	1 " (n) + 3	"	0.079	"

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตรียม Mueller-Hinton Cefotaxime medium โดยเตรียม MHA ใน flask ให้มีอุณหภูมิ 45-50°ซ ใน water-bath และเตรียม cefotaxime solutions ที่อุณหภูมิห้อง ผสม cefotaxime solution ลงใน MHA ในอัตราส่วน 1:9 (ยา 2 มล. ในอาหาร 18 มล. ในแต่ละ plate อุณหภูมิ 45-50°ซ) เขย่าให้เข้ากันเบาๆ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อซึ่ง label ถึงความเข้มข้นสุดท้ายของยาไว้แล้วโดยเทบนกระดานซึ่งปรับระดับให้สม่ำเสมอ สำหรับ control plate ใช้ MHA ที่ปราศจากยา

การเตรียมยาอื่นๆ dilution ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้โดยวิธีเดียวกัน

1.2.2 วิธีการทดลอง

1.2.2.1 การปรับมาตรฐานของจำนวนเชื้อ (Standardization of Inoculum)

โดย incubate เชื้อ 4-5 โคโลนี (ที่ได้จากการเพาะขึ้นใหม่ๆ) ลงใน 0.5 มล. Mueller Hinton Broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 4-6 ชม. จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^9 CFU/ml

นำ bacterial suspension นี้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ ด้วยอัตราส่วน 1:200 จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 5×10^6 CFU/ml (ใช้ 0.01 มล. calibrated loop จุ่มลงใน suspension แล้วใส่ลงในน้ำเกลือ 2 มล.)

1.2.2.2 การ inoculate เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ inoculum-replication apparatus

ใช้ pasteur pipett ดูด cell suspension จำนวนพอสมควรใส่ลงในหลุมบน seed plate เมื่อจุ่ม inoculating prong ลงใน seed plate แล้วกดลงบน plate ซึ่งวางรองรับอยู่ใต้ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมียาผสมอยู่ด้วย ทำ control ด้วย โดยใช้ plate ที่มีอาหาร แต่ไม่มียา การ inoculate นี้ควรจะทำให้สิ้นสุดภายใน 30 นาที หลังจากการเตรียมเชื้อ

incubate plate ทั้งหมดในลักษณะกลับ plate ที่อุณหภูมิ 35°ซ. 16-20 ชม.

1.2.2.3 การอ่านผล

Control plate จะทำให้แน่ใจได้ว่าเชื้อแต่ละพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

หาค่า MIC โดยดูจากความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ถ้ามีเชื้อขึ้นมากกว่า 1 โคโลนี จึงจะถือว่ายาไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้

เมื่อเสร็จสิ้นการใช้ inoculum replication apparatus แล้ว ให้แช่ seed plate และ inoculating prong ค้างคืนไว้ใน 70 % ethyl alcohol ขัดด้วยแปรงให้สะอาดแล้วห่อด้วยผ้านำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี Autoclaving

2. การทดลองหาระดับความเข้มข้นของยาในเลือด,น้ำไขสันหลัง และปัสสาวะ

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เมื่อให้ยา cefotaxime ในคนไข้ที่เลือกมาทำการศึกษาจะทำการเจาะเลือดในวันแรกที่เริ่มให้ยาโดยเจาะก่อนให้ยาทันที และหลังให้ยา 1 ชม. ครั้งละประมาณ 3 microtube หลังจากที่เลือดแข็งตัวแล้ว นำไปปั่น แยกเฉพาะส่วนที่เป็นซีรั่ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ เมื่อให้ยา dose สุดท้าย จะทำการวิเคราะห์อีกครั้งโดยเก็บตัวอย่างโดยวิธีการเดียวกัน

ถ้าคนไข้มีการติดเชื้อของระบบประสาทส่วนกลาง หลังให้ยาไปแล้ว 2 ชม. จะเจาะหลังนำเอาน้ำไขสันหลังประมาณ 2-3 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

ในกรณีที่คนไข้มีการติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ จะเก็บปัสสาวะทุกๆ ชม. หลังให้ยาในปริมาณครั้งละ 3 มล. นำมาผ่านกระดาษกรองแบคทีเรีย (millipore filter) เพื่อกรองแบคทีเรียออก แล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

2.2 หลักการ

ระดับยาใน specimen หาได้โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone แล้วเปรียบเทียบกับ standard curve ของ สารละลายมาตรฐาน (standard solutions) ในความเข้มข้นต่างๆ ซึ่ง plot ในกระดาษกราฟ semi-log การทดลองใช้วิธีการจุลชีววิทยา(Microbiological assay) คือ plate method

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้ Oxoid antibiotic medium no2 + 3 ก/ลิตร Sodium citrate กรณีที่ให้ Aminoglycosides ร่วมกับ cefotaxime ในการรักษาโรคติดเชื้อ จะเปลี่ยนอาหารเป็น MHA + 4% NaCl

2.4 เชื้อ

ใช้ Bacillus subtilis 1904E spore suspension 1% สำหรับกรณีที่ใช้อาหารเป็น MHA + 4 % NaCl จะเปลี่ยนเป็น Bacillus subtilis ATCC 6633 spore suspension 1 %

2.5 สารละลายมาตรฐาน

ใช้ยา cefotaxime (claforan®) ของบริษัท Hoechst(Reference standard ความแรง 1.000 ก./1.048 ของ standard)

วิธีเตรียม

ก. เตรียม Stock solution

	0.01048 ก.	10 มล.น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ			1000 µg/ml
ข.	0.1 มล. (ก)	9.9 มล	Buffer XI		10 "
ค.	0.6 " (ข)	0.6 "	"		5 "
ง.	0.3 " (ข)	0.9 "	"		25 "
จ.	0.5 " (ข)	3.5 "	"		1.25 "
ฉ.	0.6 " (จ)	0.6 "	"		0.62 "
ช.	0.3 " (จ)	0.9 "	"		0.31 "

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 Specimen

นำ specimen มาทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิห้อง เตรียมเป็น dilution ต่างๆ ด้วยสารละลาย Buffer XI ดังนี้

2.6.1 ซีรั่มก่อนฉีด : undiluted , 1:2 , 1:4

ซีรั่ม 1 ชม.หลังฉีด : 1:4 , 1:8 , 1:16

2.6.2 น้ำไขสันหลัง : undiluted, 1:2 , 1:4

2.6.3 น้ำปัสสาวะ : 1:100 , 1:500 , 1:1000

2.7 วิธีทำและการอ่านผล

หลอม Antibiotic medium ทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิ 50°ซ inoculate ด้วย Bacillus subtilis spore suspension 1% ผสมให้เข้ากัน เท media 12 มล. ลงใน petri-dish บนกระจกที่ปรับระดับให้สม่ำเสมอ

เจาะหลุมด้วย cork borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม.) จำนวน 6 หลุมห่างเท่าๆ กัน ดูด agar ในหลุมออกด้วยเครื่อง suction

หยอดสารละลายมาตรฐานหรือ specimen ลงในหลุมโดยใช้ Finn pipette ทิ้งไว้ที่ 25 ไมโครลิตร โดยหยอดสลับกับสารละลายมาตรฐานที่ใช้เป็น Reference (ในการทดลองนี้ใช้ 1.25 ไมโครกรัม/มล.) นำไป incubate ไว้ที่ 37°ซ 16-18 ชม.

ใช้ zone reader วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone นำค่าที่ได้ plot ในกระดาษ semi-log ทำ standard curve ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone และหาความเข้มข้นของยาใน specimen โดยเปรียบเทียบจาก standard curve

3. การศึกษาประสิทธิภาพและขอบข่ายในการฆ่าเชื้อของยาในคนไข้

3.1 วิธีการเลือกตัวอย่างเพื่อการศึกษา

3.1.1 คนไข้เด็กไม่จำกัดเพศ อายุไม่เกิน 12 ปี จำนวน 20 ราย

3.1.2 มีการติดเชื้อจากแบคทีเรียอย่างรุนแรงที่ระบบใดระบบหนึ่งหรือทั่วไป

(bacterial infection of specific organ systems or generalized)

หรือมีการคิดเชื้อที่มีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอื่นๆ แล้วไม่ได้ผล

3.1.3 คนไข้ที่มีลักษณะต่อไปนี้ไม่นำมาทำการศึกษา คือคนไข้แพ้หรืออาจจะแพ้ penicillin หรือ cephalosporin

3.2 วิธีการให้ยา

3.2.1 ขนาดยา

ทารกแรกเกิด 50 มก/กก/วัน แบ่งให้ทุก 6 หรือ 8 ชม.

เด็กอายุต่ำกว่า 12 ปี 100 มก/กก/วัน แบ่งให้ทุก 6 หรือ 8 ชม.

กรณีเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ 200 มก/กก/วัน แบ่งให้ทุก 6 หรือ 8 ชม.

3.2.2 วิธีให้ ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (IV) หรือฉีดเข้ากล้าม (IM) อย่างช้าๆ

3.2.3 ระยะเวลา 14-21 วัน แล้วแต่อาการคนไข้ และความรุนแรงของโรค อยู่ในดุลยพินิจของแพทย์

3.3 วิธีการเก็บข้อมูล ทำการบันทึกประวัติคนไข้ที่เลือกมาทำการศึกษาดังต่อไปนี้

3.3.1 ก่อนให้ยา

- ประวัติและอาการทั่วไปของคนไข้
- การวินิจฉัยของแพทย์ และ underlying disease
- ยาปฏิชีวนะอื่นๆ ที่คนไข้ได้รับก่อนให้ยา cefotaxime
- เชื้อที่เป็นสาเหตุและลักษณะความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Sensitivity pattern)

3.3.2 ขณะให้ยา

- ยาปฏิชีวนะอื่นๆ ที่ให้ร่วมกับ cefotaxime
- การเปลี่ยนแปลงอาการทั่วไปที่สำคัญ เช่นไข้ consciousness เป็นต้น

- การพยากรณ์โรค
- ผลการส่งตรวจเพาะเชื้อทุกครั้ง

3.3.3 หลังให้ยา

- ผลการส่งตรวจเพาะเชื้อ อาจมีการแทรกซ้อนของเชื้ออื่นๆได้
- สรุปการดำเนินของโรค
- ผลการรักษาด้วย cefotaxime โดยสรุปถึง Bacteriological และ Clinical cure

2.4 การสรุปผล

3.4.1 การประเมินผลทางจุลชีววิทยา (Bacteriologic evaluation) ทำการสรุปผลในหัวข้อต่อไปนี้คือ

ก. Elimination เมื่อเชื้อที่เป็นสาเหตุถูกกำจัดจนหมดสิ้น และไม่มีเชื้ออื่นๆ แทรกซ้อน

ข. Marked reduction เชื้อที่เป็นสาเหตุที่มีจำนวนลดลง

ค. Elimination with recurrence เชื้อที่เป็นสาเหตุถูกกำจัดจนหมดสิ้น แต่เมื่อหยุดยา เชื้อเดิมนั้นกลับมาเจริญได้อีก

ง. Elimination with reinfection เชื้อที่เป็นสาเหตุถูกกำจัดจนหมดสิ้น แต่มีการติดเชื้อ ซ้ำอีกหลังจากหยุดยา

จ. Persistence เชื้อที่เป็นสาเหตุยังคงอยู่

ฉ. Indeterminate ไม่สามารถประเมินผลได้

ช. Suprainfection มีการติดเชื้ออื่นแทรกซ้อนขณะที่กำลังให้ยาปฏิชีวนะอยู่

ซ. Colonization ตรวจพบเชื้ออื่นที่อาจทำให้เกิดโรคได้ แต่มีจำนวนเพียงเล็กน้อยไม่ทำให้เกิดอาการทางคลินิค

ฌ. Multiple response มีการตอบสนองหลายอย่างร่วมกัน เชื้อบางตัวอาจหายไป บางตัวอาจคงอยู่

3.4.2 การประเมินผลทั้งหมดทางคลินิคเมื่อสิ้นสุดการให้การรักษา (Overall clinical evaluation at the end of Therapy) ทำการสรุปผลในหัวข้อดังต่อไปนี้

ก. Complete resolution of signs and symptoms of infection เมื่อคนไข้ไม่มีอาการของโรคติดเชื้ออย่างสิ้นเชิง

ข. Improvement คนไข้มีอาการดีขึ้นมาก

ค. Failure คนไข้มีอาการเลวลง หรือไม่ดีขึ้น

ง. Indeterminate ไม่สามารถประเมินผลได้

4. การศึกษาเกี่ยวกับพิษและปฏิกิริยาข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ของยา

4.1 วิธีการเก็บข้อมูล

4.1.1 ตรวจหน้าที่ของระบบโลหิตวิทยา (Hematopoietic function) โดยศึกษาจากผลการตรวจเลือดก่อนให้ยาครั้งแรกและหลังให้ยา dose สุดท้าย ผลข้างเคียงที่อาจพบได้มีเม็ดเลือดขาวต่ำ(leukopenia) เกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia) granulocytopenia และ eosinophilia เป็นต้น

4.1.2 ตรวจหน้าที่ของตับและไต (Hepatic and renal function) ส่งเลือดตรวจการเปลี่ยนแปลงของระดับของ SGOT , SGPT , BUN , alkaline phosphatase creatinine และส่งปัสสาวะตรวจวิเคราะห์ (urinalysis) โดยส่งเลือดและปัสสาวะตรวจก่อนให้ยา dose แรก และหลังให้ยา dose สุดท้าย

4.1.3 อาการที่อาจพบได้ คือ ปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (hypersensitivity) ไข้จากยา (drug fever) และผื่นที่ผิวหนัง (skin rash)

4.1.4 อาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้ (nausea) อาเจียน (vomiting), เบื่ออาหาร (anorexia) ท้องเดิน (diarrhoea) มีเชื้อราแคนดิดาขึ้นในปาก (oral candidiasis) เป็นต้น

4.2 การประเมินผล ทำการสรุปอาการที่เกิดขึ้นว่ามีความสัมพันธ์กับยาที่ให้อย่างไร ตามหัวข้อต่อไปนี้

ก. **Definite** อาการที่เกิดขึ้นเป็นผลโดยตรงเนื่องจากยา

ข. **Possible** อาการที่เกิดขึ้น อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากยาก็ได้ ผู้ป่วยได้ยาอย่างอื่นหรือเป็นโรคอย่างอื่นที่ทำให้เกิดอาการคล้ายกัน

ค. **Unlikely** อาการที่เกิดขึ้นไม่น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย