Chulalongkorn University
Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2019

การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซน ในหลอดทดลอง จากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาทางหลอดเลือด

ปัทมา ต.วรพานิช
คณะแพทยศาสตร์

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd

Part of the Medical Sciences Commons

Recommended Citation

ต.วรพานิช, ปัทมา, "การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลอง จากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาทางหลอดเลือด" (2019). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 9863.
https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/9863

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลองจากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาทางหลอดเลือด

น.ส.ปัทมา ต.วรพานิช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE IN-VITRO EFFICACY OF ACTIVATED CHARCOAL IN FECAL CEFTRIAXONE ADSORPTION AMONG PATIENTS RECEIVED INTRAVENOUS CEFTRIAXONE

Miss Pattama Torvorapanit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลอง จากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาทางหลอดเลือด
โดย	น.ส.ปัทมา ต.วรพานิช
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. นายแพทย์วรพจน์ นิลรัตนกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ขจร ตีรณธนากุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร. นายแพทย์วรพจน์ นิลรัตนกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศริญญา ภูวนันท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ แพทย์หญิงนิรดา ศิริยากร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปัทมา ต.วรพานิช : การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลอง จากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาทางหลอดเลือด. (THE IN-VITRO EFFICACY OF ACTIVATED CHARCOAL IN FECAL CEFTRIAXONE ADSORPTION AMONG PATIENTS RECEIVED INTRAVENOUS CEFTRIAXONE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ดร. นพ.วรพจน์ นิลรัตนกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

ที่มา: ยาปฏิชีวนะซึ่งออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียในร่างกาย ไม่จำเพาะแต่แบคทีเรียก่อโรค แต่รวมถึงแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ด้วย การดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้จึงเป็นแนวคิดหนึ่งในการปกป้องสมดุลของจุลชีพประจำถิ่น

วัตถุประสงค์: ศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ที่มีขายทั่วไปในท้องตลาดเพื่อรักษาภาวะอาหารเป็นพิษ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลอง จากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาทางหลอดเลือด

วิธีการศึกษา: เปรียบเทียบสัดส่วนค่าเฉลี่ยของระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระระหว่างผสมและไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ ในหลอดทดลอง โดยวิธีการวัดระดับยา indirect competitive enzyme-linked immunoassay และมีการเปรียบเทียบผลลัพธ์ระหว่างยาถ่านกัมมันต์ 3 ยี่ห้อ และความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่ขนาดแตกต่างกันอีกด้วย

ผลการศึกษา: ทำการศึกษาในรพ.จุฬาลงกรณ์ (ม.ค. - มี.ค. 2563) ได้ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วย 8 ราย เบื้องต้นพบว่ายี่ห้อ C มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสัดส่วน geometric mean reduction ของความเข้มข้นยาในอุจจาระเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C 30 มิลลิกรัม/กรัมอุจจาระ คือ 0.53 (95% CI 0.33 – 0.85, *p*-value < 0.001) กล่าวคือดูดซับยาได้ร้อยละ 47 และดูดซับเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 71 และ 87 ด้วยความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่สูงขึ้น 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัมอุจจาระตามลำดับ

สรุปผล: ยาถ่านกัมมันต์มีประสิทธิผลในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นหนึ่งยุทธวิธีในการปกป้องสมดุลของจุลชีพประจำถิ่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

6174058430 : MAJOR MEDICINE
KEYWORD: ACTIVATED-CHARCOAL, CEFTRIAXONE, GUT MICROFLORA

Pattama Torvorapanit : THE IN-VITRO EFFICACY OF ACTIVATED CHARCOAL IN FECAL CEFTRIAXONE ADSORPTION AMONG PATIENTS RECEIVED INTRAVENOUS CEFTRIAXONE. Advisor: VORAPHOJ NILARATANAKUL Co-advisor: TANITTHA CHATSUWAN

Background: Broad-spectrum antibiotics kill not only pathogenic bacteria, but also gut flora. Adsorption of intestinal excessive excreted antibiotics might help protect microflora homeostasis.

Objective: To evaluate efficacy of conventional activated charcoal (AC) in adsorption of fecal ceftriaxone from patients who received intravenous ceftriaxone.

Materials and Method: We measured fecal ceftriaxone concentrations by indirect competitive enzyme-linked immunoassay method, comparing between with and without AC mixing. We also compared the adsorption efficacy among different brands and different doses of AC in Thailand.

Results: We collected fecal samples from 8 patients (X1-X8), aged 18 years or older, who were admitted in King Chulalongkorn Memorial Hospital, during January-March 2020. Brand C of AC showed the highest efficacy. The geometric mean reduction ratio of fecal ceftriaxone concentration when mixing with AC 30 mg/g(feces) was 0.53 (95% CI 0.33 – 0.85, *p*-value < 0.001), so adsorption efficacy was 47%. More significant efficacy demonstrated in higher dose, 71% and 87% for AC 150 mg/g(feces) and 500 mg/g(feces), respectively.

Conclusion: Conventional AC could demonstrate significant efficacy in fecal ceftriaxone adsorption, even using usual dose for food poisoning treatment. Combination them with IV ceftriaxone, might be the pragmatic and inexpensive option to protect gut microflora in

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Medicine	Student's Signature .....
Academic Year:	2019	Advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก อ.ดร.นพ.วรพจน์ นิลรัตนกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักของงานวิจัย ที่ได้ให้คำเสนอแนะ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆมาโดยตลอด และผู้ทำวิจัยยังได้รับความอนุเคราะห์จากผู้เกี่ยวข้อง ดังรายนามต่อไปนี้

1. อ.ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมผู้ให้คำแนะนำด้านการจัดหาวัสดุอุปกรณ์และชี้แนะแหล่งข้อมูลความรู้เพิ่มเติมตลอดมา

2. น.ส.วรรณา กะหวัง เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ผู้คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือการจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ และเป็นพี่เลี้ยงทางห้องปฏิบัติการ คอยทบทวนหลักการและขั้นตอนในการปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ อย่างถูกต้องรัดกุม นำมาซึ่งผลลัพธ์ทางห้องปฏิบัติการที่เป็นไปตามแผนงาน และน่าเชื่อถือ

3. Mr. Stephen J Kerr ผู้เชี่ยวชาญทางสถิติศาสตร์ ผู้คอยให้คำปรึกษาในการคำนวณขนาดตัวอย่าง และการวิเคราะห์ผลลัพธ์การศึกษาได้อย่างถูกต้องเหมาะสม และแสดงในรูปแบบที่สื่อสารได้ชัดเจน

4. บิดา มารดา และครอบครัว ผู้ให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยนี้ตลอดมา

5. คณาจารย์ ประจำสาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ชี้แนะและให้โอกาส ในการเริ่มต้นการทำงานวิจัยที่ดี และจุดประกายแนวคิดในการต่อยอดทำงานวิจัยในอนาคตการทำงานทางคลินิกในภายหน้า

6. ทุนวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รหัสทุน RA 63/006), ทุนสนับสนุนกลุ่มการวิจัย (STAR) การติดเชื้อในสถานพยาบาล กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และ ทุนสนับสนุนงานวิจัยประจำปี 2562 จากราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย (สัญญาทุนเลขที่ 6/2562) ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง และอาจเป็นส่วนหนึ่งในการรังสรรค์ประโยชน์ต่อสังคมไทยในอนาคต

ปัทมา ต.วรพานิช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย 1

คำถามของการวิจัย 4

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

สมมติฐาน 5

กรอบแนวคิดในการวิจัย 5

ข้อตกลงเบื้องต้น 6

คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย 7

รูปแบบการวิจัย 7

ข้อพิจารณาทางจริยธรรม 8

ข้อจำกัดในการวิจัย 8

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 9

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข 9

บทที่ 2 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 10
คุณสมบัติของยาถ่านกัมมันต์ และการนำมาใช้ประโยชน์ในอดีต 10
เภสัชจลนศาสตร์ของยาเซฟไตรแอกโซนและการศึกษาผลกระทบต่อจุลชีพประจำถิ่น 13
บทที่ 3 15
วิธีดำเนินการวิจัย 15
3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย 15
3.1.1 ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample) 15
3.1.2 ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination) 16
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย 17
3.2.1 ขั้นตอนก่อนเริ่มงานวิจัย 17
3.2.2 การขอความยินยอมในการเก็บตัวอย่างอุจจาระ 18
3.2.3 ขั้นตอนการเก็บ เตรียมผสม และรักษาคงสภาพ ของตัวอย่างอุจจาระให้พร้อมใช้ทดสอบ 18
3.2.4 วิธีการตรวจวัดระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ และการแปลผล 22
3.2.5 การทดสอบความแตกต่างความสามารถในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของยาถ่านกัมมันต์ 3 ยี่ห้อ และการผสมกับสารละลายอุจจาระ 25
3.2.6 การเจือจางตัวอย่างอุจจาระ 27
3.2.7 การกำหนดและชั่งตวงวัด ขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่แตกต่างกันในการทดสอบ และการผสมกับสารละลายอุจจาระ 28
3.3 การรวบรวมข้อมูล 31
3.3.1 สถานที่เก็บข้อมูล 31
3.3.2 ผู้เก็บข้อมูล 31
3.3.3 การบันทึกข้อมูล 32
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล 34
บทที่ 4 35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการวิจัย 35
4.1 คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา 35
4.2 ผลการทดสอบสภาวะจำลองลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ 37
4.3 ผลการทดสอบหาค่าการเจือจางตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่เหมาะสมกับการทดสอบ 38
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ 3 ยี่ห้อ ในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ 41
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ที่ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือด 43
4.6 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของประสิทธิผลการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระกับขนาดของยาถ่านกัมมันต์ที่แตกต่างกัน 51
บทที่ 5 52
อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 52
อภิปรายผล 52
จุดแข็งของการวิจัย 54
ข้อจำกัดในการวิจัย 55
สรุปผล 57
ข้อเสนอแนะ 57
ภาคผนวก 58
ภาคผนวก ก 59
ภาคผนวก ข 63
ภาคผนวก ค 69
ภาคผนวก ง 72
บรรณานุกรม 75
ประวัติผู้เขียน 78

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดคุณลักษณะของประชากรผู้ป่วย การวินิจฉัยหลัก/ข้อบ่งชี้ของการได้รับยาเซฟไตรแอกโซนและช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยแต่ละราย 36

ตารางที่ 2 แสดงค่า OD (optical density) และ ร้อยละการดูดซับแสง (% Adsorbance) ที่ใช้ในการหาระดับยาเซฟไตรแอกโซนด้วยการทดสอบ ELISA ที่สภาวะต่าง ๆ 37

ตารางที่ 3 แสดงค่าร้อยละการดูดซับแสง (%) ของการทดสอบ ELISA และค่าระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ceftriaxone) ที่ทดสอบได้ (นาโนกรัม/มล.; ng/ml) จากความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8) ในตัวอย่างอุจจาระ Null, X1 – X5 และตัวอย่างควบคุม 39

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดการทดสอบหาระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ng/ml) ในสารละลายตัวอย่างอุจจาระ X3 และ Null ในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบระหว่างไม่ผสม และผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) 3 ยี่ห้อ ที่ความเข้มข้นของถ่านกัมมันต์ต่าง ๆ (mg/g) โดยมีสารละลายควบคุมลบและควบคุมบวก 42

ตารางที่ 5 แสดงระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ng/ml) ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ของสารละลายตัวอย่าง X1 – X8 และ Null ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวอย่าง เปรียบเทียบระหว่างหลอดที่ไม่ผสม กับ หลอดที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) ยี่ห้อ C ด้วยขนาดความเข้มข้น 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) (mg/g) 45

ตารางที่ 6 แสดงการวิเคราะห์หาสัดส่วน (ratio) ของระดับยาเฉลี่ยที่ลดลง (geometric mean reduction; GMR) เมื่อเทียบระหว่างไม่ผสมกับผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พร้อมการคำนวณร้อยละประสิทธิผลการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ (%) 49

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงแนวคิดพื้นฐานเกี่ยวกับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้ใหญ่มนุษย์ ที่ส่งผลกระทบต่อสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้และการใช้ยาถ่านกัมมันต์ดูดซับยาส่วนเกิน 5

รูปที่ 2 แสดงรายละเอียดปัจจัยกวน ที่อาจส่งผลกระทบต่อการตรวจระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ เพื่อนำไปสู่การคัดเลือกผู้ป่วยและการวางแผนการดำเนินงานวิจัยในหลอดทดลอง..... 6

รูปที่ 3 แสดงข้อมูลผลลัพธ์จากการใช้โปรแกรม STATA v.6 ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง 17

รูปที่ 4 แสดงการชั่งตัวอย่างอุจจาระแบ่งบรรจุในหลอดทดลองพลาสติกโดยผู้วิจัยหลัก..... 19

รูปที่ 5 แสดงการเจือจางตัวอย่างอุจจาระเพื่อให้ได้สารละลายอุจจาระความเข้มข้น 1:10..... 20

รูปที่ 6 แสดงเครื่องปั่นตกตะกอนที่ใช้ในการศึกษา..... 21

รูปที่ 7 แสดงฉลากกำกับรุ่นชุดทดสอบ และน้ำยาต่าง ๆในกล่องผลิตภัณฑ์..... 22

รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ กลุ่มเซฟาโลสปอริน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) กับร้อยละการดูดซับแสงของการทดสอบตัวอย่างนั้น ๆ..... 23

รูปที่ 9 แสดงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ยี่ห้อระบุ A, B และ C ตามลำดับ..... 26

รูปที่ 10 แสดงการชั่งน้ำหนักเม็ดยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C เพื่อคำนวณหาปริมาตรสุทธิของส่วนประกอบยาถ่านกัมมันต์ที่ต้องการใช้จริง (รูปบน : รูปยา 1 เม็ด ระบุว่า มีส่วนประกอบยาถ่านกัมมันต์ 250 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักยารวม 545.1 มิลลิกรัม และ รูปล่าง : รูปยาที่จำเป็นต้องผ่านการบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดเพื่อสะดวกต่อการชั่งและการนำไปใช้) 29

รูปที่ 11 รูปบน ; แสดงตัวอย่างหลอดบรรจุสารตัวอย่าง สารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์, สารละลายอุจจาระ 1:10, สารละลายอุจจาระ 1:10 ที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ A และ สารละลายอุจจาระ 1:10 ที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา), รูปล่าง ; หลอดพลาสติกบรรจุสารตัวอย่างที่อยู่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีเครื่องสั่นเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อจำลองปฏิกิริยาที่สภาวะใกล้เคียงกับลำไส้ใหญ่ของมนุษย์มากที่สุด..... 30

รูปที่ 12 แสดงการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการในขั้นตอนการทดสอบELISA โดยผู้วิจัยหลัก..... 32

รูปที่ 13 แสดงการนำถาด (plate) ELISA ชนิด 96 หลุมเข้าเครื่องอ่านผล(ELISA reader) Thermo Fisher Scientific ® รุ่น MULTISKAN พร้อมการเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อบันทึกข้อมูลผลการทดสอบ 33

รูปที่ 14 รูปบน ; แสดงถาดหลุมที่ใช้ทดสอบ ELISA ขั้นตอนสุดท้ายก่อนนำไปอ่านผล, รูปล่าง ; กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ แกนตั้ง : ระดับยาเซฟไตรแอกโซน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ที่วัดได้ของสารละลายตัวอย่างอุจจาระ X1 – X5 ณ การเจือจางเป็นความเข้มข้น 1:3,000 กับ แกนนอน : ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างอุจจาระนับจากที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนครั้งแรก (ชั่วโมง) 40

รูปที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้หาความสัมพันธ์ของระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระในหลอดทดลอง (แกนนอน) ด้วยการทดสอบวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งรายงานผลเป็นร้อยละการดูดซับแสง (แกนตั้ง) โดยมีข้อจำกัดของเครื่องมืออยู่ในช่วง 0.5 – 40.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 44

รูปที่ 16 แผนภูมิแท่งแสดงระดับยาเซฟไตรแอกโซนสัมฤทธิ์ในตัวอย่างอุจจาระ (แกนตั้ง) เมื่อไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ เปรียบเทียบกับการผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) ที่ขนาดยา 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) จำแนกตามผู้ป่วยแต่ละราย (X1 – X8) (แกนนอน) 46

รูปที่ 17 แผนภูมิแสดงสัดส่วนระดับยาเซฟไตรแอกโซนเฉลี่ยที่ลดลง (geometric mean reduction ratio (95% CI)) จำแนกตามขนาดความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่ผสมในหลอดตัวอย่างอุจจาระ และแจกแจงตามการวิเคราะห์ 3 รูปแบบ : X1-X8 (all X1-X8) (N = 8), ตัด X2 ออก (excluded X2) (N = 7) และ ตัด X2, X8 ออก (excluded X2&X8) (N = 6) 50

รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระที่ลดลง (แกนตั้ง; $\log_e$ scale) กับขนาดของยาถ่านกัมมันต์ที่ใช้ผสมในหลอดทดลอง (แกนนอน) ที่เพิ่มขึ้น 51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาสำคัญที่นำไปสู่อัตราตายเป็นลำดับต้นๆของโลก จึงเป็นที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ยาปฏิชีวนะมีบทบาทในการใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย และนำไปสู่ปัญหาสืบเนื่องตามมากล่าวคือการตั้งถิ่นฐาน (colonization) และการติดเชื้อ (infection) ของแบคทีเรียดื้อยา รวมไปถึงผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ

การศึกษาทางระบาดวิทยา พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae (CRE) มากขึ้นเรื่อย ๆ ทั่วโลกรวมทั้งประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับในประเทศไทยเปรียบเทียบปี 2553 กับ 2558 พบว่า *K. pneumoniae* (KP) ดื้อยา carbapenem เพิ่มจาก 0.3% เป็น 4.9% [1] และแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นรวดเร็วอย่างยิ่ง นำไปสู่การใช้ยาปฏิชีวนะที่ยาวนานและมากขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน

การศึกษาในอดีตพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะการใช้ยาที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อกว้างเป็นระยะเวลานาน ทั้งที่สมเหตุสมผลหรือไม่ก็ตาม ย่อมทำให้แบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ได้รับอิทธิพลจากยาปฏิชีวนะดังกล่าว จนเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เสียสมดุลและก่อให้เกิดพยาธิสภาพ [2] การตรวจพบการตั้งถิ่นฐานของเชื้อดื้อยามักอาศัยการตรวจจากอุจจาระโดยการทำ rectal swab และพบว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการตั้งถิ่นฐาน (colonization) ของแบคทีเรียดื้อยาชนิด CRE แล้วนั้นนำไปสู่การติดเชื้อตามมาภายหลังถึง 16.5% โดยพบการติดเชื้อที่ปอดมากที่สุด ตามมาด้วยการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งอัตราตายเฉลี่ยในผู้ป่วยกลุ่มนี้คือ 10% และสำหรับอัตราตายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ CRE ทั้งหมดรวมทั้งผู้ป่วยที่ไม่ได้ตรวจพบ CRE colonization มาก่อนสูงถึง 30-75% นอกจากนี้การพบ CRE colonization ยังสัมพันธ์กับระยะเวลาการนอนโรงพยาบาลที่เพิ่มเป็น 2 เท่าอีกด้วย [3]

การใช้ยาปฏิชีวนะยังมีอีกผลข้างเคียงหนึ่งที่สำคัญ ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเสียสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ กล่าวคือก่อให้เกิดอาการเกิดท้องเสีย และ/หรือ ลำไส้อักเสบ ซึ่งอาจเป็นเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Clostridioides difficile* ที่เพิ่มจำนวนมากจนผิดสมดุลหรือไม่ก็ได้ [4] และการรักษาภาวะนี้ในปัจจุบันมีการศึกษารองรับในต่างประเทศแล้วว่า การรักษาด้วยการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ประจำถิ่นกลับเข้าไปในร่างกายเพื่อจุดประสงค์ให้มีการคืนสภาพสมดุลลำไส้นั้น ได้ผลการรักษาที่ดีทั้งการป้องกันการเกิด *Clostridioides difficile* diarrhea [5] และการป้องกันการตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรียดื้อยาอื่น อันเป็นตัวการของการเกิดโรคติดเชื้อดื้อยาที่รุนแรงดังกล่าวแล้วข้างต้นตามมา [6] นับว่าเป็นการทำให้นักวิทยาศาสตร์และแพทย์ตระหนักได้ว่าสมดุลที่ดีของแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์มีความสำคัญมากเพียงใด

อย่างไรก็ตามการรักษาผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะดังที่กล่าวมา คงไม่ใช่คำตอบของการแก้ปัญหาที่ยั่งยืน การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุสมผลยังคงเป็นหลักสำคัญของการรักษาโรคติดเชื้อ แต่บางกรณีก็หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน อาทิ การติดเชื้อฝีหนองอวัยวะในช่องท้องหรือสมอง การติดเชื้อของกระดูกและกล้ามเนื้อ เป็นต้น หากมีมาตรการที่สามารถลดโอกาสการเกิดการเปลี่ยนแปลงเสียสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์ได้คงจะเป็นการดีไม่น้อย ที่จะนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนลำไส้อักเสบจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต่าง ๆ แม้การรักษาฟื้นฟูด้วยการปลูกถ่ายจุลินทรีย์จะมีประโยชน์ ดังกล่าวมาแล้วก่อนหน้า แต่ยังคงเป็นมาตรการเชิงตั้งรับกล่าวคือ ต้องรอให้เกิดการเสียสมดุล หรือมีเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในลำไส้ตั้งถิ่นฐานเสียก่อน จึงให้การรักษาด้วยการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ ด้วยข้อจำกัดที่ไม่สามารถทำการปลูกถ่ายในขณะที่ผู้ป่วยยังได้รับยาปฏิชีวนะอยู่ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปลูกถ่ายก็จะถูกทำลายเช่นเดียวกันจึงไม่เกิดผลการรักษาที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องรอให้ยาปฏิชีวนะครบก่อน ซึ่งก็มักจะเกิดการเสียสมดุลอย่างรุนแรงหรือมีเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเข้ามาตั้งถิ่นฐานในลำไส้เสียแล้ว ทีมผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหา จึงได้พยายามมองหามาตรการเชิงป้องกันที่จะปกป้องสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นจากการได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งแบคทีเรียประจำถิ่นเหล่านี้จะป้องกันไม่ให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยาทั้งจากภายในร่างกายและจากภายนอกเพิ่มจำนวนหรือตั้งถิ่นฐานในลำไส้ได้

เนื่องจากการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่ตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใดของร่างกายนั้นไม่ได้ต้องการให้มีระดับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้ใหญ่ กล่าวอีกนัยหนึ่งว่าหากเราไม่ได้ต้องการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รักษาโรคติดเชื้อที่ลำไส้ใหญ่ (infectious colitis) ยาปฏิชีวนะส่วนเกินที่อยู่ในลำไส้จากการบริหารยาทั้งการรับประทานและการฉีดทางหลอดเลือดดำจึงไม่มีประโยชน์ และนับเป็นปัจจัยเอื้อสำคัญในการทำลายแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์อีกด้วย หากเราสามารถขจัดยาส่วนเกินในลำไส้ได้อย่างทันท่วงที ก็มีโอกาสที่จะปกป้องสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันร่างกายมนุษย์จากภาวะหรือโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต่อไป

ในอดีตมีความพยายามปกป้องแบคทีเรียประจำถิ่นโดยการใช้ beta-lactamase ชื่อ ribaxamase ไปทำลายยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam ส่วนเกินที่ตกค้างในลำไส้ ซึ่งผ่าน clinical trial phase 2a [7] แล้ว อย่างไรก็ตามการพัฒนายาดังกล่าวเป็นเรื่องที่ยาก ใช้เวลานาน และไม่สามารถใช้ได้กับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ได้ วิธีการที่ง่ายและใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางกว่าการหาเอนไซม์มาทำลายยา คือการดูดซับยาส่วนเกิน ซึ่งมีตัวอย่างที่บุคลากรทางการแพทย์คุ้นเคยและเห็นเป็นประจำ คือการเพาะเชื้อในเลือด (hemoculture) ในขวดเพาะเชื้อ หากสังเกตจะพบว่าในขวดนอกจากน้ำยาเลี้ยงเชื้อแล้วยังมีเม็ดดูดซับ (adsorbent bead) สำหรับดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินเพื่อเพิ่มโอกาสให้แบคทีเรียเจริญเติบโต ซึ่งในอดีตก่อนที่จะมีเม็ดดูดซับ สิ่งที่ใช้ดูดซับยาปฏิชีวนะหลากหลายชนิดในขวด hemoculture คือ ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) หรือ Fuller’s earth (bentonite) [8] แต่สำหรับการใช้ในมนุษย์ Fuller’s earth มีรายงานถึงผลข้างเคียงมากกว่าและไม่เป็นที่นิยมใช้ [9, 10]

ถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal) นับเป็นสารที่รู้จักกันดีในวิชาพิษวิทยา ด้วยการใช้เป็นสารดูดซับสารพิษหรือยาใด ๆที่ได้รับเกินขนาดอย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานาน จึงน่าสนใจว่ามีบทบาทในการดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้ด้วยหรือไม่ แต่ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศยังมีข้อมูลที่จำกัด เป็นเหตุให้ทีมผู้วิจัยทำการศึกษานี้เพื่อสร้างองค์ความรู้และศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซน และศึกษาความสัมพันธ์ต่อการป้องกันการเสียสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นในอุจจาระของมนุษย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก (Primary Question)

ยาถ่านกัมมันต์ทั่วไปสามารถดูดซับยาปฏิชีวนะคงเหลือในหลอดทดลอง จากอุจจาระของผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำมาก่อน ได้หรือไม่ และมีประสิทธิผลมากน้อยเพียงใด

คำถามรอง (Secondary research question)

1. ประสิทธิผลของการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนคงในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ มีความแตกต่างกันในแต่ละยี่ห้อของยาถ่านกัมมันต์ที่ขายทั่วไปตามท้องตลาด ในประเทศไทยหรือไม่ อย่างไร
2. ประสิทธิผลของการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนคงในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ มีความสัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นของถ่านกัมมันต์ที่ใช้ต่อปริมาณอุจจาระที่เท่ากัน หรือไม่ อย่างไร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

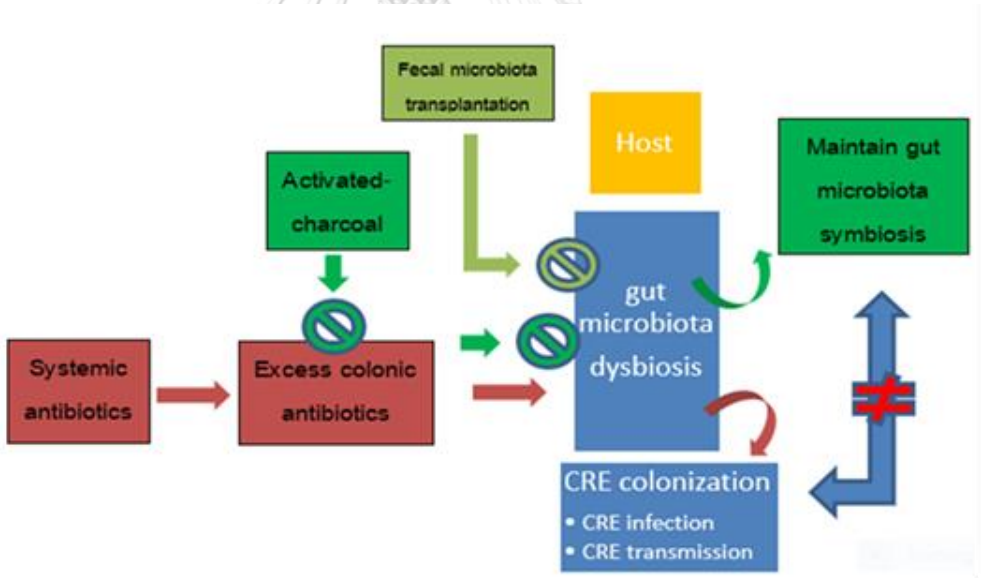
- เพื่อศึกษาระดับยาเซฟไตรแอกโซนส่วนเกินในอุจจาระ ของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ เพื่อรักษาการติดเชื้อที่ตำแหน่งอื่นในร่างกาย
- เพื่อเปรียบเทียบระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระที่ตรวจวัดได้ในหลอดทดลอง เมื่อไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ และเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ที่แตกต่างกัน 3 ยี่ห้อ ได้แก่ A, B และ C (ชื่อการค้าสมมติในการศึกษานี้)
- เพื่อเปรียบเทียบระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระที่ตรวจวัดได้ในหลอดทดลอง เมื่อไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ และเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อที่ได้ประสิทธิผลสูงสุดจากข้อ 2

โดยหาความสัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่ต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่ 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม ต่อปริมาณอุจจาระ 1 กรัม

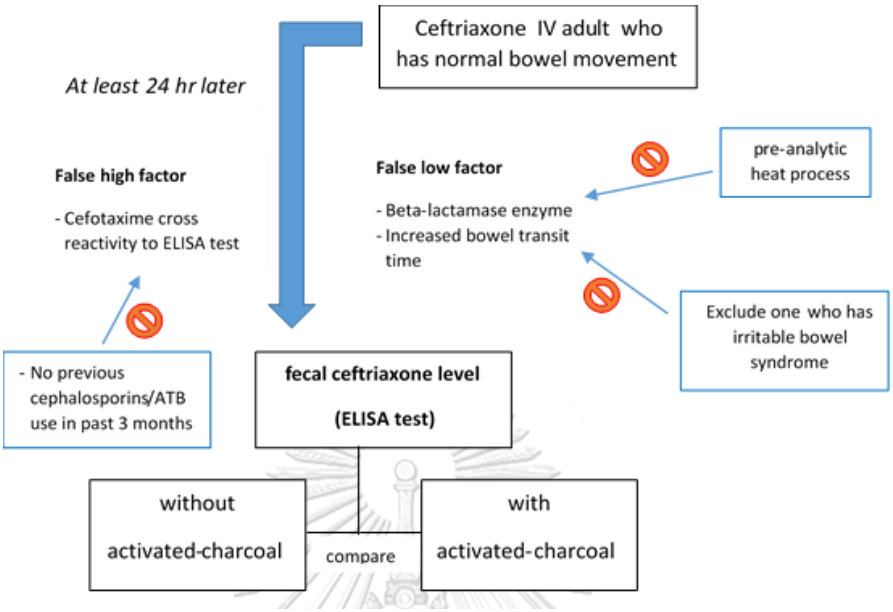
สมมติฐาน

ยาถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วย ที่ได้รับยาทางหลอดเลือดได้ หมายความว่า ระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระในหลอดทดลองเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์มีความเข้มข้นต่ำกว่า หลอดทดลองที่ไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์

กรอบแนวคิดในการวิจัย



รูปที่ 1 แสดงแนวคิดพื้นฐานเกี่ยวกับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้ใหญ่มนุษย์ ที่ส่งผลกระทบต่อสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้และการใช้ยาถ่านกัมมันต์ดูดซับยาส่วนเกิน



รูปที่ 2 แสดงรายละเอียดปัจจัยกวน ที่อาจส่งผลกระทบต่อการตรวจระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ เพื่อนำไปสู่การคัดเลือกผู้ป่วยและการวางแผนการดำเนินงานวิจัยในหลอดทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข้อตกลงเบื้องต้น

เนื่องจากการวัดระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ ยังไม่มีห้องปฏิบัติการใดในประเทศไทยออกแบบเครื่องมือที่ใช้ศึกษาเป็นมาตรฐาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่นิยมใช้ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์มักอาศัยการตรวจด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจำเป็นต้องสร้างเครื่องมือ และแนวทางทางห้องปฏิบัติการใหม่ จึงนับว่าเป็นการเสียเวลาและงบประมาณที่สูงมาก ทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เครื่องมือทดสอบระดับยาเซฟไตรแอกโซนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) ซึ่งมีจำหน่ายอยู่แล้ว และสามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้ทันที โดยเล็งเห็นแล้วว่า สามารถตอบคำถามงานวิจัยและเพียงพอในการพิสูจน์สมมติฐานการทดสอบได้ เนื่องจากเป็นการเปรียบเทียบสัดส่วนของระดับความเข้มข้นของยาที่ต่างกัน ระหว่างการผสมและไม่ผสมยาถ่านกัมมันต์ เพื่อหาร้อยละของการดูดซับยาด้วยถ่านกัมมันต์

จึงไม่จำเป็นต้องใช้การทดสอบระดับยาที่มีความละเอียดสูงและค่าใช้จ่ายสูงมากในการสร้างเครื่องมือตรวจด้วย HPLC ขึ้นมาใหม่

ทั้งนี้ หากควบคุมปัจจัยกวนในแง่ cross-reaction กับการทดสอบด้วย ELISA ของการได้รับยาในกลุ่ม beta-lactams อื่น โดยเกณฑ์คัดเข้าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มาก่อนในช่วงเวลา 3 เดือนก่อนร่วมการวิจัย ผลลัพธ์ที่ได้ย่อมสามารถแปลผลได้และน่าเชื่อถือเพียงพอ อีกทั้งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการศึกษาทางคลินิกต่อไปในอนาคต

คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

- ตัวอย่าง X (X sample) หมายถึง ตัวอย่างอุจจาระขั้นตอนสุดท้ายของผู้ป่วยแต่ละราย หลังผ่านขบวนการเตรียมอุจจาระที่เหมาะสม และพร้อมนำไปใช้ทดสอบหาระดับยาเซฟไตรแอกโซน โดยจะระบุหมายเลขตัวอย่างของผู้ป่วยแต่ละรายด้วยการกำหนดเป็นหมายเลข X1, X2, X3, ... เป็นต้น
- ตัวอย่าง Null (Null sample) หมายถึง ตัวอย่างอุจจาระขั้นตอนสุดท้ายของอาสาสมัครสุขภาพดี ผู้ให้ความยินยอมบริจาคอุจจาระเป็นอุจจาระควบคุม (ไม่มียาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซน) และผ่านขบวนการเตรียมอุจจาระเช่นเดียวกับ ตัวอย่าง X ทุกประการ และถูกนำไปทดสอบหาระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ระดับยาเป็นศูนย์ในทางทฤษฎี) พร้อมกับตัวอย่าง X เพื่อเป็นตัวควบคุมการทดสอบ

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยในหลอดทดลอง (*in-vitro* study) เพื่อพิสูจน์ประสิทธิผลของยา ก่อนเริ่มการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์

ข้อพิจารณาทางจริยธรรม

1. มีการขอความยินยอมทั้งจากผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดและจากอาสาสมัครสุขภาพดี เพื่ออนุญาตให้เก็บตัวอย่างอุจจาระ (X sample และ Null sample) มาใช้ในงานวิจัย ทั้งนี้ ทางทีมผู้วิจัยจะมีการให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนจนผู้ป่วยและอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดี สามารถตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย (respect for person) มีเอกสารชี้แจงผู้ป่วยและอาสาสมัคร ว่าจะไม่ได้รับประโยชน์ใดจากการเข้าร่วมการศึกษานี้ (beneficence/non-maleficence)

2. ระหว่างการดำเนินงานวิจัย ผู้ป่วยมีสิทธิที่จะเพิกถอน หรือ ขอออกจากงานวิจัยเมื่อใดก็ได้ตามความสมัครใจ (patient autonomy) หากไม่สามารถเก็บตัวอย่างอุจจาระได้ภายหลังให้ความยินยอมไปแล้ว

3. มีเอกสารยืนยันว่าจะไม่นำข้อมูลผู้ป่วยไปเปิดเผยจนสามารถระบุตัวได้ หากมิได้รับความยินยอม (confidentiality) รวมถึงมีการแจ้งผู้ป่วยและอาสาสมัครว่า ตัวอย่างอุจจาระซึ่งเป็นตัวอย่างชีวภาพ อาจถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลานานด้วยขบวนการที่ได้มาตรฐานทางห้องปฏิบัติการชีวภาพ แต่หากมีการนำไปใช้ในงานวิจัยอื่นในอนาคต จำเป็นต้องแจ้งให้ผู้ป่วยรับทราบและยินยอมก่อนอีกครั้ง (fidelity)

4. มีเกณฑ์การคัดเข้าและคัดออกชัดเจน (justice)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อจำกัดในการวิจัย

ไม่สามารถควบคุมให้ผู้ป่วยถ่ายอุจจาระในช่วงเวลาเดียวกัน หลังได้รับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนได้ ทำให้ระดับยาในอุจจาระอาจมีค่าแตกต่างกันเป็นช่วงกว้าง เนื่องจากระดับยาสะสมเมื่อได้รับยาหลายครั้งย่อมมีระดับยาส่วนเกินในอุจจาระสูงกว่า ทำให้จำเป็นต้องมีการวางแผนเจือจางตัวอย่าง X ของผู้ป่วยแต่ละราย ด้วยจำนวนเท่าของการเจือจางที่แตกต่างกัน เพื่อให้การทดสอบขั้นสุดท้ายเหลือระดับยาเซฟไตรแอกโซนในสารละลายตัวอย่าง X ที่เหมาะสมต่อขีดจำกัดที่เครื่องมือ ELISA ทดสอบได้ อย่างไรก็ตามหากเราศึกษาผลลัพธ์เป็นสัดส่วนของ $\log_e$ ของความ

เข้มข้นที่เปรียบเทียบระหว่างผสมและไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ในผู้ป่วยคนเดียวกัน ย่อมไม่ได้รับผลกระทบจากปัจจัยแง่จำนวนเท่าการเจือจางที่ต่างกันของผู้ป่วยแต่ละรายออกไปได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. องค์ความรู้ใหม่
   - แนวโน้มระดับยาส่วนเกินในลำไส้อันเป็นผลจากการได้รับยาปฏิชีวนะทางหลอดเลือดดำ
   - ประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ในการดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้
   - แนวทางนำไปศึกษาต่อยอดในการศึกษาทางคลินิก ในการป้องกันการเสียสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้
2. คาดว่าจะได้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศ 1 ชิ้น
3. เนื่องจากยาถ่านกัมมันต์มีราคาถูก และมีใช้แพร่หลายทั่วไป ดังนั้นหากการศึกษานี้ได้ผลดี จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในวงกว้างได้เกือบทันที จัดว่าเป็นแนวคิดใหม่ทางการรักษาผู้ป่วย ในกาป้องกันการตั้งถิ่นฐานของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในลำไส้

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เป็นการศึกษาในหลอดทดลองซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในประเทศไทย รวมถึงระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยแต่ละรายมีโอกาสกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-parametric distribution) ทำให้การคำนวณขนาดตัวอย่างทำได้ยาก

มาตรการแก้ไข : ปรึกษานักชีวะสถิติผู้เชี่ยวชาญการทำวิจัยเชิงเภสัชจลนศาสตร์ และแนะนำให้วางแผนการทดสอบทางสถิติของผลลัพธ์หลักการศึกษาด้วยวิธีที่เหมาะสม และคำนวณขนาดตัวอย่างประชากร โดยอาศัยข้อมูลเบื้องต้นที่เก็บโดยคณะผู้วิจัยเองมาเป็นแนวทาง และใช้สถิติชั้นสูงในการคำนวณขนาดตัวอย่าง ดังจะได้กล่าวรายละเอียดต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

คุณสมบัติของยาถ่านกัมมันต์ และการนำมาใช้ประโยชน์ในอดีต

ทีมผู้วิจัยได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับการศึกษาประสิทธิภาพของยาถ่านกัมมันต์ ในการช่วยดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินที่ดูดซึมผ่านกระแสเลือดมายังลำไส้ใหญ่ (ในกรณีที่ให้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาการติดเชื้อบริเวณอื่น และ/หรือในกระแสเลือด) และขับยาเหล่านี้ออกจากร่างกายทางอุจจาระ ทั้งนี้มีการศึกษาก่อนหน้าในต่างประเทศพบว่าถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) มีลักษณะอณูพื้นผิวที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (micropore) ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับสารต่าง ๆได้รวมไปถึงยาปฏิชีวนะอาทิ เททราไซคลิน (tetracycline), กลุ่มยาควิโนโลน (quinolone groups) และ เพนนิซิลิน (penicillin) ทั้งนี้ความสามารถในการดูดซับยาดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยเรื่องอุณหภูมิและความเป็นกรด – ด่างในสภาวะต่างกันไปด้วย [11] ทั้งนี้หลายการศึกษาในอดีตพบว่า ความสามารถในการดูดซับยาปฏิชีวนะและสารเคมีของยาถ่านกัมมันต์มีประสิทธิภาพสูงเป็นไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือ แนวโน้มตรวจพบสารเคมีหลงเหลืออยู่น้อยมาก และอย่างน้อยดูดซับได้มากกว่าร้อยละ 50 ทั้งสิ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สำหรับการทดลองเกี่ยวกับประสิทธิผลของการดูดซับยาปฏิชีวนะในสิ่งมีชีวิต มีการศึกษาเพียง 2 การศึกษาที่ได้รับการกล่าวถึงทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์อาสาสมัคร กล่าวคือ ในปี ค.ศ. 2012 มีการศึกษาในหนูทดลองที่ประเทศฝรั่งเศส โดยใช้ DAV 131 ซึ่งเป็นสารดูดซับพิเศษที่มีส่วนประกอบของถ่านกัมมันต์ร่วมกับแร่ธาตุจากพืช โดยแบ่งการศึกษาเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้รับยาปฏิชีวนะเซโฟแท็กซิม (cefotaxime) เพียงอย่างเดียว (N = 8) , กลุ่มที่ 2 ได้รับยา cefotaxime ร่วมกับ DAV 131 (N = 8), กลุ่มที่ 3 ได้รับยาหลอก (placebo) ซึ่งในที่นี้คือสารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว (N = 6) และ กลุ่มที่ 4 ได้รับยาหลอก ร่วมกับ DAV 131 (N =

8) สารโดยหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่มจะได้รับยาปฏิชีวนะ cefotaxime หรือ ยาหลอกฉีดเข้าทางชั้นใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงให้หนูทดลองรับประทานสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Klebseilla pneumoniae* สายพันธุ์ดื้อยา (PUG-2) (bacterial challenge) ขนาด 10^6 CFU (colony forming unit) ที่ได้มาจากการแยกเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤติซึ่งนอนโรงพยาบาลนาน และได้รับยาปฏิชีวนะหลายขนาน จากนั้นมีการเก็บข้อมูลเปรียบเทียบระดับยา cefotaxime ในอุจจาระ พร้อมกับตรวจหาปริมาณ *Klebseilla pneumoniae* PUG-2 ในอุจจาระของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ผลการศึกษาพบว่า ระดับยา cefotaxime ในอุจจาระของหนูทดลองกลุ่มที่ 2 ซึ่งได้ควบคู่ไปกับ DAV 131 นั้นตรวจไม่พบเลยตลอดการทดลอง ในขณะที่กลุ่มที่ 1 ตรวจพบระดับยาในอุจจาระเฉลี่ย 3 ไมโครกรัม/อุจจาระ100 มิลลิกรัม ภายหลังได้รับยาวันแรก และ 5.8 ไมโครกรัม/อุจจาระ100 มิลลิกรัม ภายหลังได้รับยาต่อเนื่องเป็นเวลาสองวัน แสดงให้เห็นว่า DAV131 มีประสิทธิภาพสูงมากในการดูดซับยา cefotaxime ในอุจจาระอย่างเห็นได้ชัด และยังพบว่าช่วยป้องกันการเกิด beta-lactam-resistant *Klebseilla pneumoniae* ตั้งถิ่นฐานในลำไส้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ตรวจพบปริมาณ *Klebseilla pneumoniae* PUG-2 สูงสุด ในอุจจาระของหนูทดลองกลุ่มที่ 2 (6.23 log CFU/อุจจาระ 1 กรัม, 95% CI 4.12 - 8.35) ต่ำกว่ากลุ่มที่ 1 (9.12 log CFU/อุจจาระ 1 กรัม, 95% CI 8.24 – 10.01) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อติดตามต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 9 ภายหลังการให้ bacterial challenge พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ 2 ก็มีการฟื้นฟูสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้และตรวจไม่พบแบคทีเรียดื้อยา PUG-2 จนใกล้เคียงกับหนูทดลองกลุ่มที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก และยืนยันได้ว่า DAV131 เองไม่มีผลกระทบต่อการเสียสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ หรือ การตั้งถิ่นฐานของเชื้อดื้อยาหากไม่ได้รับยาปฏิชีวนะใดมาก่อน [12]

สำหรับการศึกษาในมนุษย์ในปี ค.ศ. 2014 โดยทีมผู้วิจัยเดียวกันกับ DAV 131 จากประเทศฝรั่งเศส ได้มีการพัฒนารูปแบบใหม่ทางเภสัชจลศาสตร์ของสารดูดซับพิเศษนี้จนได้รับต้นแบบของยาถ่านกัมมันต์ใหม่ ที่เพิ่มคุณสมบัติในการดูดซึมยาและออกฤทธิ์ที่ลำไส้ใหญ่เท่านั้น ซึ่งทำให้ไม่มีผลกระทบกับการดูดซึมยาและสารอาหารต่าง ๆในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กในชื่อยาว่า “DAV 132” ภายใต้บริษัทผู้ผลิตชื่อ “ Da Volteraa” ใช้การบริหารยาด้วยการรับประทานขนาด 7.5 กรัมต่อเม็ด ซึ่งประกอบด้วยผงถ่านกัมมันต์อยู่ในขนาด 5.11 กรัมต่อเม็ด และสามารถใช้ดูดซับยา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปฏิชีวนะส่วนเกินที่ไม่ต้องการในลำไส้ใหญ่ แม้ว่าจะได้รับควบคู่ไปกับยาปฏิชีวนะที่ได้รับในรูปแบบยารับประทานได้ด้วย

การศึกษานี้ทำการวิจัยในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้รับยาปฏิชีวนะม็อกซิฟล็อกซาซิน (moxifloxacin) ชนิดรับประทาน (400 มิลลิกรัม/เม็ด) เพียงอย่างเดียว (N = 14), กลุ่มที่ 2 ได้รับยา moxifloxacin ร่วมกับ DAV 132 (N = 14), กลุ่มที่ 3 ได้รับ DAV 132 เพียงอย่างเดียว (N = 8) และกลุ่มที่ 4 ได้รับยาหลอก (placebo) ที่มีลักษณะเหมือนกับ moxifloxacin ชนิดรับประทานเพียงอย่างเดียว (N = 8) โดยอาสาสมัครกลุ่มที่ 1, 2 และ 4 จะได้รับประทาน moxifloxacin หรือยาหลอก ครั้งละ 1 เม็ด วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 วันต่อเนื่องกัน และในกลุ่มที่ 2 และ 3 จะได้รับประทาน DAV 132 ครั้งละ 1 เม็ดวันละ 3 เวลาก่อนมื้ออาหาร เป็นระยะเวลา 7 วันต่อเนื่อง โดยครั้งแรกที่รับประทานให้เริ่มก่อนอาหารเช้าและ สำหรับกลุ่มที่ 2 ต้องเริ่มครั้งแรกก่อนได้รับ moxifloxacin เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าผลการตรวจวัดระดับยา moxifloxacin ในอุจจาระของอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 มีระดับยาสูงสุดเฉลี่ย 136.2 ไมโครกรัม/1 กรัมของอุจจาระ ในขณะที่ตรวจได้ระดับยาน้อยมากเพียง 14 ไมโครกรัม/1 กรัมของอุจจาระ สำหรับอาสาสมัครกลุ่มที่ 2 ที่ได้รับยา moxifloxacin ควบคู่ไปกับ DAV 132 และนอกจากนี้ยังมีการตรวจวัดระดับยา moxifloxacin ในเลือดก็พบว่ามีระดับยา ณ วันต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ตลอดทั้งช่วงการศึกษา เป็นการยืนยันว่า DAV 132 มีคุณสมบัติที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่ลำไส้ใหญ่เท่านั้น และเมื่อศึกษาปริมาณ (richness) และความหลากหลายของสายพันธุ์ (diversity) ของแบคทีเรียจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ พบว่า กลุ่มที่ 2 มีความใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 4 รวมถึง กลุ่มที่ 3 ที่ได้รับ DAV 132 เพียงอย่างเดียวก็ไม่มีความแตกต่างในแง่ของสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 4 เช่นเดียวกัน ในทางตรงข้าม กลุ่มที่ 1 พบว่ามีปริมาณและความหลากหลายของสายพันธุ์ของจุลชีพในลำไส้ใหญ่ที่ลดลงและเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญทางสถิติ [13] เป็นการสนับสนุนว่าหากเราดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินในลำไส้ใหญ่ได้มากเพียงใด ย่อมมีโอกาสในการปกป้องสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นไว้ได้มากขึ้นเช่นกัน

ประเทศไทยยังไม่มียาต้นแบบของถ่านกัมมันต์ DAV 131 และ DAV 132 ดังกล่าว แต่มียาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไป ซึ่งมีราคาถูกและสามารถใช้รับประทานกันอย่างแพร่หลาย โดยมากมักใช้ยาถ่านกัมมันต์เป็นการรักษาหลักอย่างหนึ่งในการดูดซับสารพิษหลายขนานในกระเพาะอาหาร ที่เกิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากการรับประทานมาภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง [14] ดังนั้นหากต้องการทำการศึกษาการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนส่วนเกินในลำไส้ใหญ่จากการได้รับยาปฏิชีวนะที่ฉีดทางหลอดเลือดดำ ซึ่งระดับยาจะเข้าสู่กระแสเลือดทันที ด้วยการใช้ยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปแบบรับประทาน จึงสามารถทำได้ เพราะนอกจากไม่ส่งผลกระทบต่อการลดระดับยาปฏิชีวนะในกระแสเลือดแล้ว ในทางกลับกันมีข้อมูลสนับสนุนการใช้ยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไป ในการรักษาผู้ป่วยท้องร่วงเฉียบพลันจากอาหารเป็นพิษได้อย่างปลอดภัยมาเป็นเวลานาน จึงเป็นการสนับสนุนว่ายาถ่านกัมมันต์น่าจะมีผลต่อการดูดซับสารพิษและสารเคมีบางส่วนในลำไส้ได้

เภสัชจลนศาสตร์ของยาเซฟไตรแอกโซนและการศึกษาผลกระทบต่อจุลชีพประจำถิ่น

“ยาปฏิชีวนะ” เสมือนเป็นดาบสองคม กล่าวคือเราให้เพื่อหวังจะใช้กำจัดเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในตำแหน่งต่าง ๆของการติดเชื้อในร่างกาย แต่คงหลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ยาปฏิชีวนะจะทำลายแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็นมิตรของร่างกายไปด้วย มีการศึกษาหลายการศึกษาในอดีตแสดงให้เห็นแล้วว่า แม้เพียงการได้รับยาปฏิชีวนะเพียงครั้งเดียว ก็ส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ด้วย หากยานั้นมีการดูดซึมเข้ากระแสเลือดและมีเภสัชจลนศาสตร์ของยา ที่ทำให้มีระดับยาในลำไส้ใหญ่สูงมากพอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในปีค.ศ. 1988 ยุคที่ยากลุ่มเซฟาโลสปอริน รุ่นที่ 3 (third generation cephalosporin) ยังจัดว่าเป็นยาใหม่ มีการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซน หรือ เซโฟแท็กซิม เพียง 1 ครั้งทางหลอดเลือดดำ เพื่อใช้ป้องกันการติดเชื้อในผู้ป่วยก่อนผ่าตัดมดลูกทางช่องคลอด พบว่าตรวจพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ประจำถิ่นในลำไส้ (flora strain) ในอุจจาระของผู้ป่วยลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับก่อนได้รับยาปฏิชีวนะ โดยเริ่มเห็นได้ชัดตั้งแต่วันที่ 3 หลังได้รับยา [15] และมีการยืนยันด้วยการศึกษาต่อมาอีกเป็นจำนวนมาก เกี่ยวกับผลเสียนี้ของยาปฏิชีวนะที่ให้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ว่าย่อมนำไปสู่ผลข้างเคียงต่าง ๆโดยเฉพาะการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาดังกล่าวแล้วก่อนหน้า

เนื่องจากยาเซฟไตรแอกโซนเป็นยาปฏิชีวนะ ที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อีกทั้งสามารถบริหารยาได้ง่ายเพียงวันละครั้งและราคาไม่แพง จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกในทุกระดับของระบบสาธารณสุข จึงเป็นยาที่เป็นเป้าหมายหลักในการศึกษานี้

ด้วยเภสัชจลนศาสตร์ของยา เมื่อได้รับการบริหารยาเซฟไตรแอกโซน (ceftriaxone) ขนาด 2 กรัม ฉีดทางหลอดเลือดดำหนึ่งครั้ง ระดับยาในเลือดจะสูงขึ้นที่ 30 นาทีโดยเฉลี่ย คือ 257 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับระดับยาในสารละลายนอกหลอดเหลือดมีความต่างกันตามตำแหน่งของร่างกาย โดยมีการกำจัดยาทางปัสสาวะเป็นส่วนมากร้อยละ 34 - 63 จึงทำให้ระดับยาในปัสสาวะสูง ภายหลังการได้รับยาเซฟไตรแอกโซน 2 กรัม ทางหลอดเลือดดำหนึ่งครั้งนั้น สามารถตรวจพบระดับยาในปัสสาวะ เฉลี่ย 43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ± 10) ที่ 48 ชั่วโมง ส่วนที่เหลือขับออกทางน้ำดี โดยมีข้อมูลที่พบว่ายาเซฟไตรแอกโซน เป็นยาที่มีวงจรการเข้าออกระหว่างกระแสเลือดกับทางเดินอาหาร (enterohepatic circulation) ต่ำ แต่มีส่วนที่กำจัดทางน้ำดีผ่านทางอุจจาระอยู่ประมาณร้อยละ 30 [16] ทำให้รบกวนแบคทีเรียจุลชีพประจำถิ่นเนื่องจากยาที่ตกค้างในลำไส้ปริมาณมาก

สำหรับข้อมูลเท่าที่มีการเก็บรวบรวมในมนุษย์ เป็นการศึกษาในกลุ่มทดลองที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซน 2 กรัม ทางหลอดเลือดดำเป็นระยะเวลา 5 วันต่อเนื่อง พบว่าระดับยาดังกล่าวในลำไส้มีความหลากหลาย อยู่ในช่วง 10 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 24-72 ชั่วโมง [17]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1.1 ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

แม้จะเป็นเพียงการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น แต่จำเป็นต้องขอเก็บอุจจาระตัวอย่างทั้งจากอาสาสมัครสุขภาพดี (เพื่อนำตัวอย่างอุจจาระที่ไม่มีเซฟไตรแอกโซนมาเป็นหลอดเปรียบเทียบ 1 ราย) และจากผู้ป่วยที่ต้องได้รับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำด้วยเหตุอื่นใดอยู่ก่อน อันไม่ได้เกิดจากเหตุของงานวิจัยนี้ (ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำไปแล้วอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซึ่งเชื่อว่าสามารถตรวจพบระดับยาเซฟไตรแอกโซนส่วนเกินในอุจจาระได้ 10-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ทั้งนี้ผู้อนุญาตให้เก็บตัวอย่างอุจจาระ จำเป็นต้องผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์ต่อไปนี้ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion Criteria)

- อายุ ตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
- สามารถให้คำยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยได้ โดยมีสติสัมปชัญญะครบถ้วน
- สามารถถ่ายอุจจาระได้เองทางทวาร (ปราศจากการสวนหรือล้วงทวาร) หรือ ทางช่องเปิดที่เชื่อมต่อกับลำไส้ใหญ่ (colostomy)

เกณฑ์การคัดกลุ่มตัวอย่างออกจากโครงการวิจัย (Exclusion Criteria)

- ได้รับยาปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟาโลสปอรินส์มาก่อนในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา (ไม่รวมถึงยาเซฟไตรแอกโซนที่ได้รับทางหลอดเลือดดำอันเป็นเหตุให้เข้าสู่การศึกษาครั้งนี้)
- ตั้งครรภ์

ทั้งนี้มีการชี้แจงอาสาสมัครและผู้ป่วยผู้อนุญาตให้เก็บตัวอย่างอุจจาระ ด้วยการชี้แจงเป็นเอกสารและคำแนะนำจากแพทย์ผู้วิจัยหลักด้วยตนเอง และมีการลงลายมือชื่อของผู้ให้ความยินยอมในเอกสาร ที่ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (COA.1055/2019) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

3.1.2 ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

การคำนวณขนาดตัวอย่าง โดยมีสมมติฐานดังต่อไปนี้

- no correlation between samples within patients
- error in the variance was 1
- 90% power to detect these differences in repeated measures at a 2-sided significance level of 5%
- จะได้ขนาดตัวอย่าง (N) = 6 ที่จะพิสูจน์สมมติฐานการวิจัยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

```
Estimated sample size for repeated-measures ANOVA
F test for within subject with Greenhouse-Geisser correction
Ho: delta = 0  versus  Ha: delta != 0

Study parameters:

        alpha =    0.0500
        power =    0.9000
        delta =    1.9724
          N_g =         1
        N_rep =         4
        means =   <matrix>
        Var_w =    0.9726
       Var_we =    0.2500
        Var_e =    1.0000
          rho =    0.0000

Estimated sample sizes:

            N =         6
```

รูปที่ 3 แสดงข้อมูลผลลัพธ์จากการใช้โปรแกรม STATA v.6 ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

3.2.1 ขั้นตอนก่อนเริ่มงานวิจัย

- ส่งโครงร่างงานวิจัยเพื่อขอพิจารณาทางจริยธรรม จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 335/62, COA No. 1055/2019)
- ขออนุมัติการทำวิจัยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จากผู้อำนวยการรพ. (หนังสืออนุมัติการทำวิจัยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เลขที่ ECC 8/2562)

- ลงทะเบียนยืนยันการทำงานวิจัยทางคลินิกในฐานข้อมูลระดับสากล Thai Clinical Trial Registration (TCTR No. TCTR20190917003)
- ขออนุมัติการทำวิจัยและขอรับการพิจารณาข้อเสนอโครงการวิจัย เพื่อพิจารณาด้านความปลอดภัยทางชีวภาพและการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ จากคณะกรรมการพิจารณาความปลอดภัยทางชีวภาพ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (หนังสืออนุมัติ เลขที่ MDCU-IBC 020/2019)

3.2.2 การขอความยินยอมในการเก็บตัวอย่างอุจจาระ

- เก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซน และเป็นไปตามเกณฑ์คัดเลือกผู้ป่วยสำหรับงานวิจัยนี้ ระหว่างที่เข้ารับการรักษาเป็นผู้ป่วยใน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือน มกราคม - มีนาคม 2563
- เก็บตัวอย่างอุจจาระควบคุมจากอาสาสมัครสุขภาพดี 1 ราย ซึ่งสุ่มเลือกจากรายชื่อผู้บริจาคอุจจาระที่เข้าร่วมการศึกษา “การลดระยะเวลาโคโลไนเซชั่นของเชื้อกลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีที่ดื้อยาปฏิชีวนะคาร์บาพีเนมในลำไส้ใหญ่ของผู้ป่วยใน โดยการปลูกถ่ายอุจจาระจากผู้บริจาคสุขภาพดีที่ไม่มีความเกี่ยวข้อง กับผู้ป่วย: การทดลองแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุมในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์” และยินยอมให้เก็บตัวอย่างอุจจาระมาใช้ในงานวิจัยนี้ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.3 ขั้นตอนการเก็บ เตรียมผสม และรักษาคงสภาพ ของตัวอย่างอุจจาระให้พร้อมใช้ทดสอบ

- เมื่อผู้ป่วยถ่ายอุจจาระ ให้เก็บตัวอย่างอุจจาระในภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อ ปิดฝาให้มิดชิด และแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (^{O}C) ไว้ที่หอผู้ป่วยระหว่างรอนำส่งห้องปฏิบัติการ
- รับตัวอย่างอุจจาระจากหอผู้ป่วยภายใน มายังห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาโรคติดเชื้อ อาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ ชั้น 5C โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

- ชั่งตัวอย่างอุจจาระแบ่งใส่หลอดบรรจุ หลอดละ 1 กรัม แล้วเจือจางด้วยสารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากันจะได้สารละลายอุจจาระความเข้มข้น 1:10 เท่า
- นำสารละลายอุจจาระความเข้มข้น 1:10 ไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน (water bath) ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์เบต้าแล็คเทมเมส (beta – lactamase) ที่อาจตกค้างและตรวจพบได้ในอุจจาระของผู้ป่วยบางราย ทั้งนี้การอุ่นควบคุมอุณหภูมิด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ได้ผ่านการทดสอบเบื้องต้นด้วยสารละลายของยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนใน 0.9% โซเดียมคลอไรด์ที่ระบุความเข้มข้นมาตรฐานเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ว่าไม่ส่งผลรบกวนการตรวจวัดความเข้มข้นของยาด้วยวิธีการที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังนั้นตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยทุกราย ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนนี้เหมือนกันทั้งหมด

รูปที่ 4 แสดงการชั่งตัวอย่างอุจจาระแบ่งบรรจุในหลอดทดลองพลาสติกโดยผู้วิจัยหลัก

รูปที่ 5 แสดงการเจือจางตัวอย่างอุจจาระเพื่อให้ได้สารละลายอุจจาระความเข้มข้น 1:10

- หลังจากผ่านขั้นตอนหยุดการทำงานของเอนไซม์เบต้าแล็คเทมเมสแล้ว นำสารละลายอุจจาระนั้นไปปั่นตกตะกอนมวลกากอุจจาระ ที่ความเร็วรอบ 3,000 จี (G-force) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ไปเปต (pipette) ดูดเฉพาะสารแขวนลอยส่วนใส (supernatant) ที่มียาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนอยู่แบ่งใส่ (aliquot) ในหลอดบรรจุทนจุดเยือกแข็ง ไว้หลาย ๆ หลอด ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างอุจจาระตั้งต้นว่าได้ปริมาณมากเพียงใด และแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส และเมื่อต้องการนำมาใช้ทดสอบ นำมาเฉพาะหลอดที่ต้องการเพื่อละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้งาน หลอดที่เหลือสามารถเก็บรักษาคงสภาพในตู้แช่แข็ง (freezer) ไว้ ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทางชีวภาพและชีวเคมี

หมายเหตุ: โดยทั่วไปมีสารน้ำที่ผ่านเข้าสู่ลำไส้ใหญ่เฉลี่ย 1,000 มิลลิลิตรต่อวัน และมนุษย์ผู้ใหญ่ทั่วไปขับถ่ายอุจจาระเฉลี่ย 100 กรัม/วัน (เทียบเท่า 100 มิลลิลิตร/วัน) ดังนั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หากนำอุจจาระมาเจือจาง 1:10 เท่า จึงเป็นการจำลองสารละลายตัวอย่างของสารละลายอุจจาระเมื่อเริ่มผ่านจากลำไส้เล็กเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (cecum) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เราต้องการให้ยาถ่านกัมมันต์เริ่มออกฤทธิ์ทำงานเช่นเดียวกัน จึงใช้สารละลายอุจจาระ 1:10 ที่ผ่านขั้นตอนเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้วนี้ เป็นตัวแทนของ cecal fluid (สารละลายอุจจาระตั้งต้น) นำไปใช้เพื่อผสมกับยาถ่านกัมมันต์ในขั้นตอนทดสอบต่างๆต่อไป

รูปที่ 6 แสดงเครื่องปั่นตกตะกอนที่ใช้ในการศึกษา

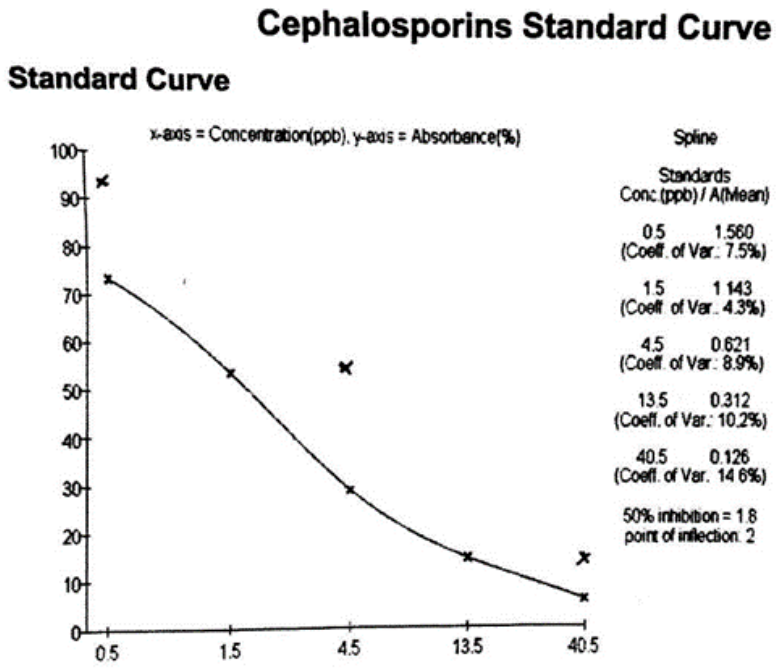
3.2.4 วิธีการตรวจวัดระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ และการแปลผล

ดังกล่าวแล้วข้างต้นว่า การตรวจวัดระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ ยังไม่มีห้องปฏิบัติการใดในประเทศไทยเปิดให้บริการ หากต้องพัฒนาแนวทางใหม่สำหรับการตรวจด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ต้องใช้งบประมาณสูงและระยะเวลานาน การศึกษานี้จึงเลือกใช้การทดสอบที่มีการพัฒนาแล้วจากประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งใช้สำหรับการตรวจวัดระดับยาเซฟไตรแอกโซนในสินค้าบริโภค นำมาทดสอบในหลอดทดลองแล้วว่า สามารถประยุกต์ใช้ทดสอบระดับยาในอุจจาระได้

ชุดทดสอบ Cephalosporin ELISA kit catalog# DEIABL-QB31 ที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้พื้นฐานการตรวจด้วยวิธี indirect competitive enzyme – linked immunoassay (ELISA) ของบริษัท Creative Diagnostics ^{R}, USA ทั้งนี้เอกสารกำกับผลิตภัณฑ์ระบุความสามารถของชุดทดสอบในการตรวจวัดระดับยากลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 40.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมียามาตรฐานเซฟทีโอเฟอร์ (ceftiofur) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นยาควบคุม พร้อมกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกลุ่มเซฟาโลสปอริน กับร้อยละการดูดซับแสงของการทดสอบ ELISA จากหลุมตัวอย่างนั้น ๆ เมื่ออ่านผลที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงฉลากกำกับรุ่นชุดทดสอบ และน้ำยาต่าง ๆในกล่องผลิตภัณฑ์



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ กลุ่มเซฟาโลสปอริน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) กับร้อยละการดูดซับแสงของการทดสอบตัวอย่างนั้น ๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA เมื่อตัวอย่าง (sample) แต่ละตัวอย่างที่อยู่ในหลุม (well) ผ่านขั้นตอนการเติมและล้างน้ำยาตามขั้นตอนครบทุกขั้นตอนแล้ว (ภาคผนวก ก) จะถูกนำเข้าเครื่องอ่านผล ELISA ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร โดยการศึกษานี้ใช้เครื่องอ่านผล Thermo Fisher scientific ^{R} รุ่น MULTISKAN GO ซึ่งเครื่องจะรายงานผลเป็นค่าความหนาแน่นของแสง (optical density; OD) ของแต่ละหลุม และเนื่องจากการตรวจวัดระดับยาอาศัยหลักการ indirect competitive ELISA หมายความว่า ค่า OD ที่สูง มีความเข้มข้นของยาต่ำ ในขณะที่ ค่า OD ที่ต่ำ มีความเข้มข้นของยาสูง

โดยตัวอย่างอุจจาระแต่ละตัวอย่างต้องถูกทดสอบซ้ำ 2 หลุม (duplicate wells) และใช้ค่าเฉลี่ย OD ของ 2 หลุม เป็นตัวแทนค่ากลาง ตามมาตรฐานของการทำ ELISA หรือ หากหลุมใดหลุมหนึ่งเกิดข้อผิดพลาดทำให้ไม่สามารถอ่านค่าได้ สามารถใช้ค่าทดสอบจากหลุมสำรองเป็นตัวแทนของตัวอย่างนั้นได้

จากนั้นนำค่าเฉลี่ย OD ของหลุมตัวอย่างที่ทดสอบไปเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนร้อยละของหลุมตัวอย่างควบคุมที่ไม่มียาเซฟไตรแอกโซนอยู่ ในการศึกษานี้ คือ 0.9% โซเดียมคลอไรด์ จะได้เป็นร้อยละการดูดซับแสง แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นยา (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 8

ตัวอย่าง

ค่า เฉลี่ย OD ของหลุมควบคุม 0.9% โซเดียมคลอไรด์ = 2.15

ค่า เฉลี่ย OD ของหลุมควบคุมสารละลายยาเซฟไตรแอกโซน 30 นาโนกรัม/มล. = 0.27

- ร้อยละของสัดส่วน OD = (0.27/2.15) x 100 = 12.56
- ทำซ้ำที่ความเข้มข้นของเซฟไตรแอกโซนต่าง ๆ กัน นำไปกำหนดจุด (plot) ระหว่างค่าร้อยละ OD กับค่าความเข้มข้น (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ได้เป็นกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8)

ค่า เฉลี่ย OD ของหลุมตัวอย่าง Sample X_x = 0.74

- ร้อยละของสัดส่วน OD = (0.74/2.15) x 100 = 34.42
- เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8) พบว่าที่การดูดซับแสงร้อยละ 34.42 เทียบได้กับความเข้มข้นของยาที่ประมาณ 4 นาโนกรัม/มล.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.5 การทดสอบความแตกต่างความสามารถในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ ของยาถ่านกัมมันต์ 3 ยี่ห้อ และการผสมกับสารละลายอุจจาระ

ผู้วิจัยวางแผนเลือกตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยเพียงรายเดียวมาทดสอบ

นำตัวอย่างสารละลายอุจจาระความเข้มข้น 1:10 ที่แช่แข็งไว้มาละลายที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 4 หลอด เพื่อใช้เป็นสารละลายอุจจาระตั้งต้น

หลอดที่ 1 ไม่ผสมยาถ่านกัมมันต์

หลอดที่ 2, 3 และ 4 ผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ A, B และ C ตามลำดับ (รูปที่ 9)

ในขั้นตอนผสม ยาถ่านกัมมันต์จะถูกผสมรวมกับสารละลายอุจจาระตั้งต้นนี้ในหลอดที่ 2 - 4 และเขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นสารละลายอุจจาระทั้ง 4 หลอด จะถูกนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีระบบเครื่องสั่นเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นขั้นตอนจำลองสภาวะให้เสมือนการผสมกันของยาถ่านกัมมันต์และสารละลายอุจจาระในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (cecum) จนกระทั่งออกมาเป็นอุจจาระของมนุษย์ เช่นเดียวกันทั้ง 4 หลอด

เมื่อครบระยะเวลาแล้ว นำสารละลายอุจจาระตัวอย่างไปปั่นตกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 3,000 จี (G- force) เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ไปเปตดูดเฉพาะสารแขวนลอยส่วนใส ที่พร้อมนำไปทดสอบ ในการศึกษานี้เรียกสารละลายอุจจาระสุดท้ายนี้ว่า “Sample X”

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อนำ Sample X ไปเจือจางจนได้ตัวอย่างที่เหมาะสมในการทดสอบ ELISA แล้ว จึงเลือกยี่ห้อยาถ่านกัมมันต์ที่มีค่าร้อยละของการดูดซับแสงสูงที่สุด ซึ่งหมายความว่าตรวจพบระดับความเข้มข้นยาน้อยที่สุด อันกล่าวเป็นนัยได้ว่า ยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อนั้นมีประสิทธิผลในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับยี่ห้ออื่น และหลอดที่ 1 (ไม่ผสมยาถ่านกัมมันต์) โดยจะมีเพียง 1 ยี่ห้อนี้เท่านั้น ที่จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบกับ Sample X ของผู้ป่วยทุกรายในขั้นตอนสุดท้ายของการศึกษานี้ต่อไป

A.

B.

C.

รูปที่ 9 แสดงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ยี่ห้อระบุ A, B และ C ตามลำดับ

3.2.6 การเจือจางตัวอย่างอุจจาระ

เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ทดสอบระดับยาเซฟไตรแอกโซนในการศึกษานี้ ดังรายละเอียดข้อ 3.2.4 มีความสามารถในการตรวจวัดระดับยาอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 40.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ระดับยาในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำ จากการค้นข้อมูลในการศึกษาก่อนหน้าพบว่ามีความหลากหลายสูงมากเป็นช่วงกว้าง เฉลี่ย 10 – 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับสะสม กล่าวคือเมื่อได้รับยาต่อเนื่องติดกันหลายวันย่อมมีระดับยาในอุจจาระสูงกว่าผู้ที่ได้รับยาเพียง 1 ครั้ง จึงทำให้จำเป็นต้องเจือจางสารละลายอุจจาระเพื่อให้ระดับยาที่ความเข้มข้นลดลงมาและอยู่ในช่วงที่เครื่องมือสามารถวัดได้

Sample null ของอาสาสมัครสุขภาพดี และ Sample X ของผู้ป่วยแต่ละราย ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างอุจจาระ ดังรายละเอียดข้อ 3.2.5 (หลอดที่ 1) ถูกวางแผนให้เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ที่หลากหลาย ได้แก่ 1:30 , 1:300 และ 1:3000 เท่า เพื่อหาสารละลายที่เจือจางที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ทดสอบขั้นตอนสุดท้าย โดยความเข้มข้นนั้นจะต้องมีจำนวนเท่าของการเจือจางไม่น้อยไปกว่าจำนวนเท่าของการเจือจางที่เหมาะสมของ Sample null เพื่อกำจัดปัจจัยกวนของกากอุจจาระที่เข้มข้นจนเกินไปและส่งผลรบกวนการทดสอบ ELISA ทำให้การแปลผลเกิดผลบวกลวงของระดับยาเซฟไตรแอกโซนได้ หมายความว่า ตัวกากอุจจาระเองในอุจจาระควบคุมของอาสาสมัครสุขภาพดี ที่ไม่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำนั้น หากไม่ได้รับการเจือจางที่เหมาะสม จะมีความเข้มข้นมากเกินไปจนทำให้ ค่า OD ของการทดสอบ ELISA สูงหลอกผิดปกติ (false high) ได้ ดังนั้น Sample X ทุกตัวอย่างจะต้องได้รับการเจือจางที่มากกว่าหรือเท่ากับ Sample null และไม่เจือจางมากเกินไปจนทำให้ระดับยาลดลงน้อยกว่า 0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเครื่องมือทดสอบไม่สามารถวัดได้ ด้วยเช่นกัน

ทั้งนี้ Sample X ของผู้ป่วยแต่ละราย ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้น ๆ จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบผสมยาถ่านกัมมันต์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.7 การกำหนดและชั่งตวงวัด ขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่แตกต่างกันในการทดสอบ และการผสมกับสารละลายอุจจาระ

ชั่งน้ำหนักยาถ่านกัมมันต์ของทั้ง 3 ยี่ห้อให้มีปริมาณสุทธิของผงถ่านกัมมันต์ที่เท่ากัน หมายความว่า หากยี่ห้อใดมีน้ำหนักของยาไม่ตรงกับปริมาณสุทธิของถ่านกัมมันต์ที่ระบุในฉลากยา อาจมีส่วนประกอบอื่นผสมอยู่ด้วย จำเป็นต้องคำนวณขนาดของยาให้ได้ส่วนประกอบของถ่านกัมมันต์สุทธิที่เท่ากันทั้ง 3 ยี่ห้อ

ซึ่งเมื่อผ่านขั้นตอนเลือกยี่ห้อยาถ่านกัมมันต์ในข้อ 3.2.5 จนได้ยี่ห้อที่มีประสิทธิผลในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระสูงสุดแล้ว จะนำยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อนั้น มาชั่งเป็นปริมาณที่ต่างกันอีก 3 ขนาด กล่าวคือ 30, 150 และ 500 มิลลิกรัมของปริมาณสุทธิของถ่านกัมมันต์ เพื่อใช้ผสมกับสารละลายอุจจาระ 1:10 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่ 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) จากนั้นนำส่วนผสมเหล่านี้ไปผ่านสภาวะจำลองลำไส้ใหญ่ ด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีระบบเครื่องสั่นเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 จี (G - force) เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปเปตดูดสารแขวนลอยส่วนใสไปเป็นสารละลายตัวอย่าง Sample X (เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.5) ก่อนนำไปทดสอบหาค่าการเจือจางที่เหมาะสม (ดังรายละเอียดข้อ 3.2.6) และทดสอบหาระดับยาเซฟไตรแอกโซนในแต่ละสารตัวอย่างด้วยเครื่องมือ ELISA ต่อไป (ดังรายละเอียดข้อ 3.2.4)

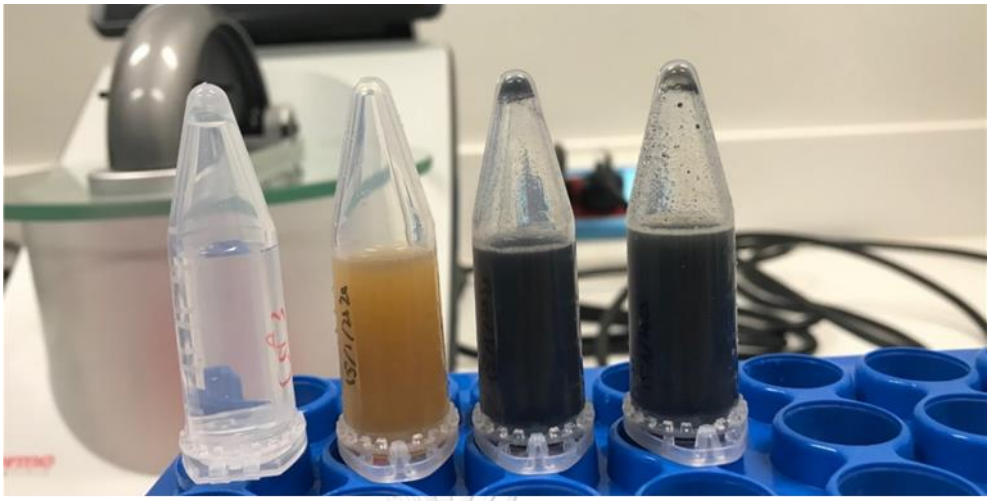
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

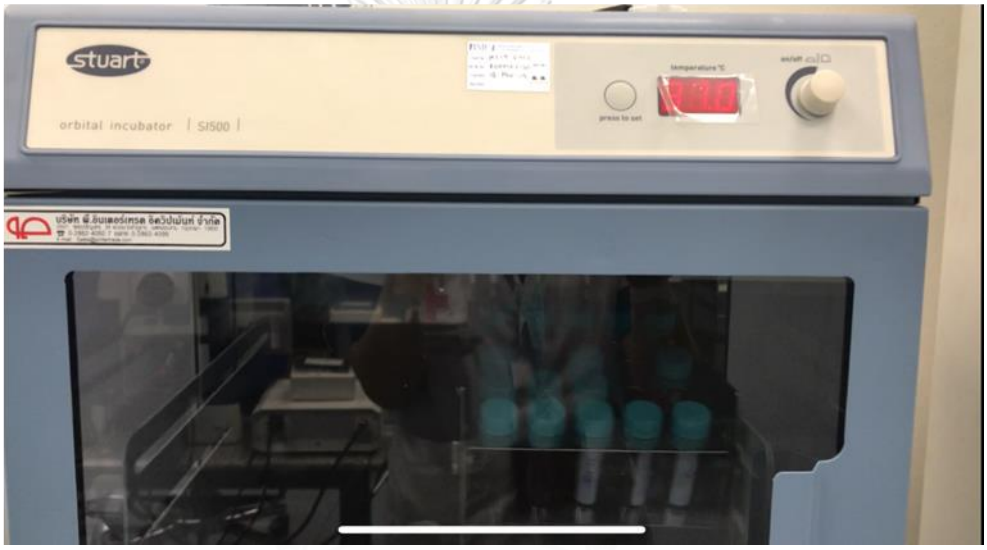
ทั้งนี้ เนื่องจากค่าเฉลี่ยของอุจจาระโดยทั่วไปของผู้ใหญ่ คือ 100 กรัมต่อวัน และขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่ใช้โดยทั่วไปตามคำแนะนำบนฉลากยาสำหรับใช้รักษาอาการท้องร่วงอาหารเป็นพิษ คือ 3 – 4 กรัมต่อวัน เป็นที่มาของการทดสอบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ที่ขนาดความเข้มข้น 3 กรัมต่ออุจจาระ 100 กรัม หรือ 30 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) นั่นเอง

สำหรับการศึกษาเรื่องแนวคิดการนำยาถ่านกัมมันต์มาดูดซับยาปฏิชีวนะในลำไส้ใหญ่มนุษย์ที่เคยมีการศึกษาในต่างประเทศมาก่อนหน้า ด้วยยาถ่านกัมมันต์ชนิดพิเศษ ที่มีชื่อว่า DAV132 มีรายงานว่าผลการศึกษาสามารถดูดซับยาปฏิชีวนะม็อกซิฟล็อกซาซิน (moxifloxacin) ส่วนเกินในลำไส้ใหญ่ และปกป้องแบคทีเรียจุลชีพประจำถิ่นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยขนาด DAV132 ที่มี

ส่วนผสมของยาถ่านกัมมันต์เฉลี่ย 15 กรัมต่อวัน [13] ส่วนขนาดยาที่ใช้สำหรับการช่วยลดการดูดซึมสารพิษในกระเพาะอาหารด้วยการใส่สายสวนจมูก เฉลี่ยคือ 50 กรัมต่อครั้ง จึงเป็นที่มาของขนาดความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่เลือกใช้ที่ขนาดความเข้มข้น 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) ในทำนองเดียวกัน

รูปที่ 10 แสดงการชั่งน้ำหนักเม็ดยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C เพื่อคำนวณหาปริมาตรสุทธิของส่วนประกอบยาถ่านกัมมันต์ที่ต้องการใช้จริง (*รูปบน* : รูปยา 1 เม็ด ระบุว่า มีส่วนประกอบยาถ่านกัมมันต์ 250 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักยารวม 545.1 มิลลิกรัม และ *รูปล่าง* : รูปยาที่จำเป็นต้องผ่านการบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดเพื่อสะดวกต่อการชั่งและการนำไปใช้)





รูปที่ 11 *รูปบน* ; แสดงตัวอย่างหลอดบรรจุสารตัวอย่าง สารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์, สารละลายอุจจาระ 1:10, สารละลายอุจจาระ 1:10 ที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ A และ สารละลายอุจจาระ 1:10 ที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา), *รูปล่าง* ; หลอดพลาสติกบรรจุสารตัวอย่างที่อยู่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีเครื่องสั่นเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อจำลองปฏิกิริยาที่สภาวะใกล้เคียงกับลำไส้ใหญ่ของมนุษย์มากที่สุด

3.3 การรวบรวมข้อมูล

3.3.1 สถานที่เก็บข้อมูล

รวบรวมตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยที่ให้ความยินยอม โดยผู้ป่วยจะได้รับเอกสารชี้แจงเกี่ยวกับงานวิจัย (ภาคผนวก ข) และลงนามยินยอมให้เก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่องานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ค) โดยอยู่ในช่วงระหว่างที่ผู้ป่วยนอนรักษาโรคหลัก ณ หอผู้ป่วยในต่าง ๆ ประจำอาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้แก่ หอผู้ป่วย 28C, 27A, 27B, 26A, 26B, 25C, 19B, 18B, 17C, 16B และ 16C

เมื่อผู้ทำวิจัยรับตัวอย่างอุจจาระจากหอผู้ป่วยในแล้ว จะนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอุจจาระ การเก็บรักษาตัวอย่างอุจจาระในตู้แช่แข็ง รวมถึงการทดสอบ ELISA เพื่อหาระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ ที่ห้องปฏิบัติการประจำสาขาวิชาโรคติดเชื้อ ณ อาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ ชั้น 5C

3.3.2 ผู้เก็บข้อมูล

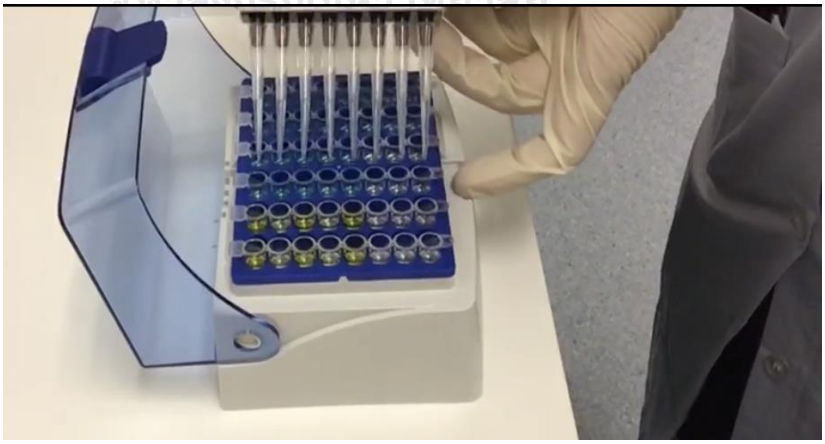
ผู้วิจัยหลัก (น.ส.ปัทมา ต.วรพานิช) เป็นผู้เก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างอุจจาระ และเป็นผู้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยตนเอง โดยมีนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ (น.ส.วรรณา กะหวัง) และอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยหลัก (อ.ดร.นพ.วรพจน์ นิลรัตนกุล) เป็นผู้กำกับควบคุมแผนการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการอย่างใกล้ชิด

ทั้งนี้ ผู้วิจัยหลัก นักวิทยาศาสตร์ และอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยหลัก ได้รับวุฒิบัตรแสดงการเข้ารับการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการและสอบผ่านหลักสูตรแนวทางปฏิบัติความปลอดภัยทางชีวภาพจากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ก่อนเริ่มทำการศึกษานี้ (ภาคผนวก ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.3 การบันทึกข้อมูล

ผู้วิจัยหลักเป็นผู้บันทึกข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นของผู้ป่วยลงในคอมพิวเตอร์ และ บันทึกข้อมูลของการทดสอบ ELISA ในแต่ละครั้งลงในหน่วยความจำของเครื่องอ่านผล ELISA ThermoFisher Scientific® ณ ห้องปฏิบัติการประจำสาขาวิชาโรคติดเชื้อ พร้อมกับเก็บข้อมูลลงในสมุดบันทึก และไฟล์อิเล็กโทรนิกส์ในคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลของผู้วิจัยด้วย



รูปที่ 12 แสดงการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการในขั้นตอนการทดสอบ ELISA โดยผู้วิจัยหลัก

รูปที่ 13 แสดงการนำถาด (plate) ELISA ชนิด 96 หลุมเข้าเครื่องอ่านผล(ELISA reader) Thermo Fisher Scientific [R] รุ่น MULTISKAN พร้อมการเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อบันทึกข้อมูลผลการทดสอบ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่คาดว่าจะได้รับเป็นข้อมูลเชิงปริมาณ กล่าวคือ ระดับความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ โดยมีการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างหลอดที่ไม่ได้ผสมกับหลอดที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ที่ความเข้มข้นของขนาดยาถ่านกัมมันต์ 3 ขนาด ทั้งนี้เนื่องจากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการศึกษาระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือด พบว่ามีระดับยาที่แตกต่างกันในช่วงกว้าง ทำให้คาดการณ์ได้ว่าข้อมูลที่ได้รับมีโอกาสที่จะมีการกระจายตัวที่ไม่ปกติ เพราะไม่ได้กำหนดตัวแปรควบคุมในเรื่องระยะเวลาการเก็บอุจจาระนับจากได้รับยาปฏิชีวนะครั้งแรก อีกทั้งผู้ป่วยไม่สามารถควบคุมให้ผู้ป่วยแต่ละรายถ่ายอุจจาระในเวลาเดียวกันได้ การคำนวณขนาดตัวอย่างก่อนทำการศึกษาจึงอ้างอิงจากการคำนวณด้วยสถิติชั้นสูงดังกล่าวแล้วในข้อ 3.1.2

เมื่อสอบถามจากผู้เชี่ยวชาญด้านสถิติชั้นสูงและชีวะสถิติ แนะนำวิธีการทางสถิติที่ใช้ทดสอบสมมุติฐานเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในลักษณะดังกล่าวของการศึกษานี้ ซึ่งข้อมูลเป็น non-parametric, dependent variable, ตัวแปรตามเป็นข้อมูลชนิดต่อเนื่อง continuous data และตัวแปรอิสระเป็นข้อมูล categorical data ควรทดสอบโดยการปรับข้อมูล non-parametric data ด้วยการ take $\log_e$ ของความเข้มข้นของระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ และหาความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนของระดับยาที่เหลืออยู่ในหลอดที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ที่ขนาดยาต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาตั้งต้นในหลอดที่ไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ (geometric mean reduction ratio) เพื่อช่วยกำจัดอิทธิพลของการกระจายตัวแบบไม่ปกติของข้อมูล และกำจัดปัจจัยด้านการเจือจางที่แตกต่างกันของแต่ละตัวอย่างได้ด้วย จากนั้นใช้วิธีการหานัยสำคัญทางสถิติของค่า geometric mean reduction ratio ด้วยวิธี repeated measure ANOVA โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นของข้อมูลร้อยละ 95, α (Alpha) หรือ Type I error = 0.05 และ β (Beta) หรือ Type II error = 0.2 โดยผู้วิจัยใช้โปรแกรม Stata version 16 ในการวิเคราะห์ผล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา

ประชากรที่เข้าเกณฑ์คัดเลือกและสามารถรวบรวมได้ในการศึกษานี้ รวมทั้งสิ้น 8 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ที่เข้ารับการรักษาเป็นผู้ป่วยในของ รพ.จุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือนมกราคม - มีนาคม พ.ศ. 2563 โดยผู้ป่วยแต่ละรายมีข้อบ่งชี้ของการได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำ จากการวินิจฉัยหลักของแพทย์เจ้าของไข้ อยู่ก่อนหน้าเข้าร่วมการศึกษานี้ เมื่อได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยแต่ละรายในการขอเก็บตัวอย่างอุจจาระ แพทย์ผู้ทำวิจัยจะนำภาชนะสำหรับเก็บตัวอย่างอุจจาระไปให้ผู้ป่วย เมื่อผู้ป่วยถ่ายอุจจาระตามกิจวัตรปกติ และเก็บตัวอย่างได้แล้ว จึงแจ้งเจ้าหน้าที่ประจำหอผู้ป่วยเพื่อติดต่อให้ผู้วิจัยมารับตัวอย่างอุจจาระไปยังห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงทำให้ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยแต่ละราย (X1 – X8) มีความหลายหลายของช่วงเวลาตั้งแต่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนครั้งแรกจนถึงเวลาที่เก็บตัวอย่างอุจจาระ โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี ที่ไม่เคยได้รับยาปฏิชีวนะใด ๆ มาก่อนหน้าภายใน เดือนที่ผ่านมา ผู้บริจาคตัวอย่างอุจจาระเป็นอุจจาระควบคุมที่ไม่มียาเซฟไตรแอกโซน (Null) และได้รับคำยินยอม มี 1 ราย โดยคัดเลือกจากผู้บริจาคตัวอย่างอุจจาระในโครงการวิจัย “การลดระยะเวลาโคโลไนเซชั่นของเชื้อกลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีที่ดื้อยาปฏิชีวนะ คาร์บาพีเนมในลำไส้ใหญ่ของผู้ป่วยในโดยการปลูกถ่ายอุจจาระจากผู้บริจาคสุขภาพดีที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับผู้ป่วย: การทดลองแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุมในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์” ซึ่งผู้บริจาคได้ให้ความยินยอมในการนำตัวอย่างอุจจาระที่เก็บไว้ มาใช้เพื่อการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในภายหลังเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดคุณลักษณะของประชากรผู้ป่วย การวินิจฉัยหลัก/ข้อบ่งชี้ของการได้รับยาเซฟไตรแอกโซนและช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยแต่ละราย

ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยและอาสาสมัคร	เพศ	อายุ (ปี)	การวินิจฉัยหลัก / ข้อบ่งชี้ของการได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำ	วันแรกที่ได้รับยา	ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างอุจจาระ นับจากได้รับยาครั้งแรก (ชม.)	จำนวนครั้งของยาที่ได้รับก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระ
X1	ญ	35	ERCP for CBD stone removal	13 ม.ค. 63	17	1
X2	ช	69	Acute cellulitis	13 ม.ค. 63	14	1
X3	ญ	69	Infected wound	13 ม.ค. 63	41	2
X4	ช	52	Acute pyelonephritis	15 ม.ค. 63	38	2
X5	ช	69	Bacterial pneumonia	19 ม.ค. 63	42	2
X6	ญ	79	Acute cholangitis	2 มี.ค. 63	58	3
X7	ช	45	Acute pyelonephritis	10 มี.ค. 63	49	3
X8	ญ	89	Acute pyelonephritis	13 มี.ค. 63	73	4
Null	ญ	25	อาสาสมัครสุขภาพดี	-	-	0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 ผลการทดสอบสภาวะจำลองลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

ผู้วิจัยทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลการทำงานของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซน ที่สภาวะต่าง ๆ เพื่อวางแผนเลือกสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะในลำไส้ใหญ่มนุษย์มากที่สุด มาเป็นแนวทางในการทดสอบการทดลองจริงในงานวิจัยนี้

กล่าวคือ ใช้สารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นหลอดควบคุมผลลบ (negative control) และ ใช้สารละลายยาเซฟไตรแอกโซนใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นหลอดควบคุมผลบวก (positive control) และผสมยาถ่านกัมมันต์ขนาด 75 มิลลิกรัม ลงในแต่ละหลอด และเปรียบเทียบระดับยาเซฟไตรแอกโซนที่ตรวจวัดได้ด้วยการทดสอบ ELISA เมื่อทำปฏิกิริยาการผสมระหว่าง ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส กับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ตั้งหลอดทดลองให้ทำปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่มีระบบสั่นเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำหลอดทดลองไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 จี (G - force) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารแขวนลอยส่วนใสไปทดสอบ ELISA ได้ผลค่า OD และร้อยละการดูดซับแสง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า OD (optical density) และ ร้อยละการดูดซับแสง (% Adsorbance) ที่ใช้ในการหาระดับยาเซฟไตรแอกโซนด้วยการทดสอบ ELISA ที่สภาวะต่าง ๆ

สารละลาย	25^{O} C	25^{O} C + ถ่านกัมมันต์ 75 mg/ml	37^{O} C	37^{O} C + ถ่านกัมมันต์ 75 mg/ml
0.9% NaCl	OD = *2.162	OD = 2.089	OD = 2.322	OD = 2.23
	*100%	96.62%	107.4%	103.15%
Ceftriaxone in 0.9% NaCl solution (30 ng/ml)	OD = 0.459	OD = 1.188	OD = 0.448	OD = 2.098
	21.23%	54.95%	23.03%	97.04%

*กำหนดให้ค่า OD ของหลอดควบคุมลบ ซึ่งไม่มียาเซฟไตรแอกโซนอยู่เลยเทียบเท่าการดูดซับแสง 100%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ดังที่กล่าวเรื่องการแปลผลค่าร้อยละการดูดซับแสง เพื่อนำไปเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซนในสิ่งส่งตรวจนั้น ๆ ในรายละเอียดข้อ 3.2.4 กล่าวโดยคร่าวคือเมื่อ ร้อยละการดูดซับแสงเพิ่มขึ้น หมายความว่ามีความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซนลดลง

จึงเห็นได้ว่า เมื่อทำการผสมยาถ่านกัมมันต์ ในหลอดทดลองควบคุมลบที่ไม่มียาเซฟไตรแอกโซนอยู่ ยาถ่านกัมมันต์เองไม่มีผลรบกวนการทดสอบ ELISA ไม่ว่าที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 องศาเซลเซียส กล่าวคือร้อยละการดูดซับแสงอยู่ใกล้เคียงช่วง 100% เสมอ และในขณะเดียวกันเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ลงในหลอดทดลองสารละลายเซฟไตรแอกโซน 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ทำให้ระดับยาลดลงทั้ง 2 สภาวะ แต่ที่ 37 องศาเซลเซียสมีประสิทธิผลที่ดีกว่าคือสามารถดูดซับยาได้จนเกือบหมด จึงเป็นที่มาของแผนการวิจัยนี้ที่กำหนดให้ผสมยาถ่านกัมมันต์ในหลอดทดลองที่สภาวะจำลองลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

4.3 ผลการทดสอบหาค่าการเจือจางตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่เหมาะสมกับการทดสอบ

ผู้วิจัยได้นำสารละลายอุจจาระความเข้มข้น 1:10 ที่เก็บรักษาคงสภาพไว้ด้วยการแช่แข็ง –80 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้องเพื่อพร้อมนำไปทดสอบ ELISA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

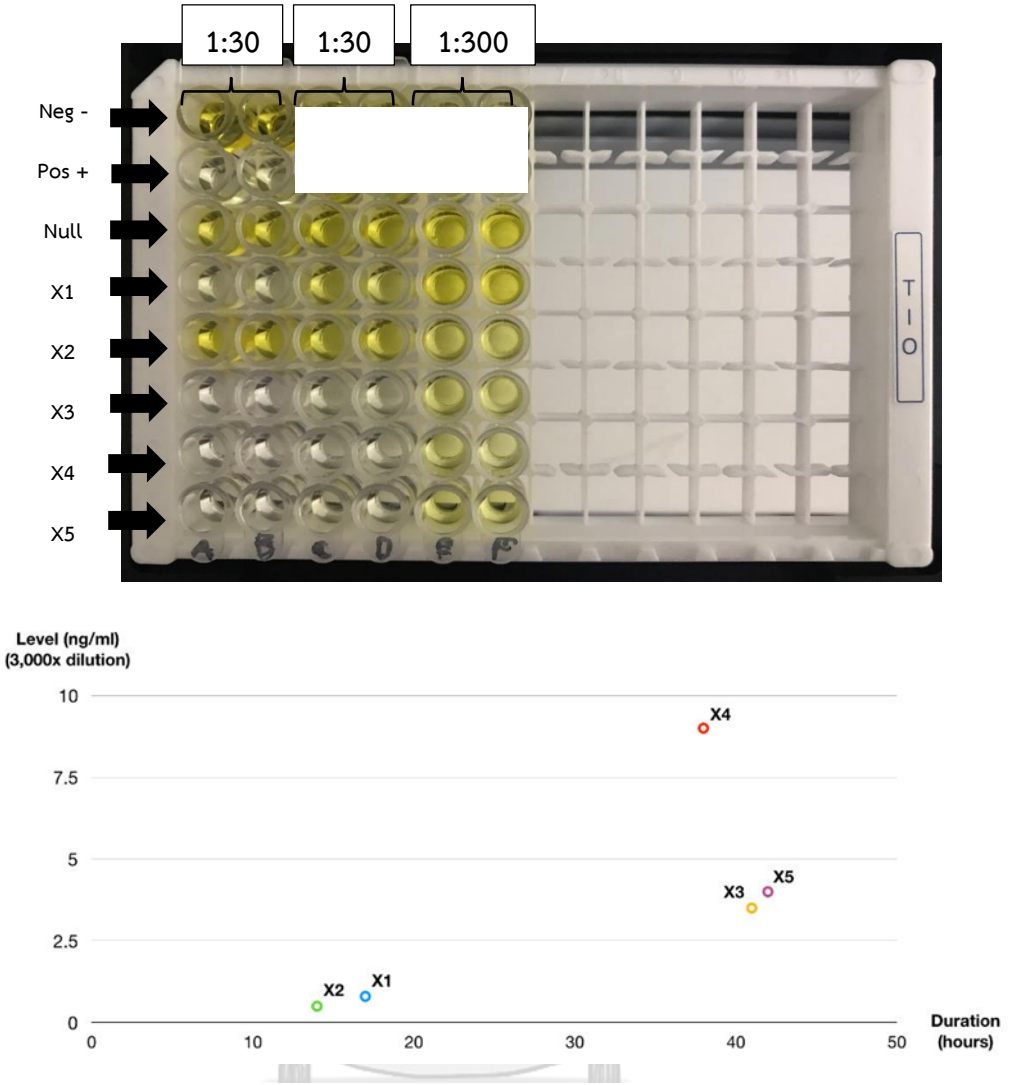
ดังที่กล่าวแล้วว่าเครื่องมือ ELISA ที่ใช้ทดสอบระดับยาเซฟไตรแอกโซน มีช่วงระดับยาที่ตรวจได้จำกัด 0.5 – 40.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จึงจำเป็นต้องเจือจางตัวอย่างสาระละลายอุจจาระให้เหมาะสม แต่ด้วยผู้ป่วยแต่ละรายได้รับจำนวนครั้งของยาเซฟไตรแอกโซนไม่เท่ากัน และ เนื่องจากการศึกษาในหลอดทดลองนี้ อนุญาตให้ผู้ป่วยถ่ายอุจจาระเองตามธรรมชาติ โดยปราศจากการสวนหรือให้รับประทานยาระบายเพื่อเร่งการถ่ายอุจจาระใด ๆ ส่งผลให้ช่วงเวลาที่เก็บอุจจาระภายหลังได้รับยา ก็มีความแตกต่างกันไปด้วย เบื้องต้นได้ทำการทดสอบในตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วย 5 รายแรกที่เก็บตัวอย่างได้ในเวลาไล่เลี่ยกัน นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:30, 1:300 และ 1:3,000 เท่า พร้อมกับใช้ตัวอย่างอุจจาระควบคุมที่ไม่มียาเซฟไตรแอกโซนจากอาสาสมัคร เปรียบเทียบกับสารละลาย 0.9%NaCl เป็นตัวอย่างควบคุมผลลบ และสารละลายยาเซฟไตรแอกโซนใน 0.9%NaCl ความเข้มข้น 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นตัวอย่างควบคุมผลบวก เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานในการหาความสัมพันธ์ของร้อยละการดูดซับแสง ของการทดสอบ ELISA กับระดับยาเซฟไตรแอกโซน

(นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ของสารละลายอุจจาระแต่ละตัวอย่าง โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3 และ รูปที่ 14

ตารางที่ 3 แสดงค่าร้อยละการดูดซับแสง (%) ของการทดสอบ ELISA และค่าระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ceftriaxone) ที่ทดสอบได้ (นาโนกรัม/มล.; ng/ml) จากความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8) ในตัวอย่างอุจจาระ Null, X1 – X5 และตัวอย่างควบคุม

สารละลายตัวอย่างอุจจาระ	**เจือจาง 1:30 %การดูดซับแสง, *ระดับยา (ng/ml)***	**เจือจาง 1:300 %การดูดซับแสง, *ระดับยา (ng/ml)***	**เจือจาง 1:3,000 %การดูดซับแสง, *ระดับยา (ng/ml)***
X1	14.23%, *15 ng/ml*	48.38%, *2.5 ng/ml*	70.09%, *0.8 ng/ml*
X2	43.06%, *3 ng/ml*	59.72%, *1.5 ng/ml*	85.21%, *< 0.5 ng/ml*
X3	4.34%, *> 40.5 ng/ml*	9.58%, *> 40.5 ng/ml*	35.41%, *3.5 ng/ml*
X4	4.76%, *> 40.5 ng/ml*	7.62%, *> 40.5 ng/ml*	23.42%, *9 ng/ml*
X5	5.99%, *> 40.5 ng/ml*	10.61%, *40 ng/ml*	32.89%, *4 ng/ml*
Null	72.61%, *0.5 ng/ml*	87.68%, *< 0.5 ng/ml*	87.51%, *< 0.5 ng/ml*
สารละลายควบคุมลบ (0.9% NaCl); ceftriaxone 0 ng/ml			100%, *0 ng/ml*
สารละลายควบคุมบวก; ceftriaxone 30 ng/ml			13.59%, *30 ng/ml*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 14 *รูปบน* ; แสดงถาดหลุมที่ใช้ทดสอบ ELISA ขั้นตอนสุดท้ายก่อนนำไปอ่านผล, *รูปล่าง* ; กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ แกนตั้ง : ระดับยาเซฟไตรแอกโซน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ที่วัดได้ของสารละลายตัวอย่างอุจจาระ X1 – X5 ณ การเจือจางเป็นความเข้มข้น 1:3,000 กับ แกนนอน : ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างอุจจาระนับจากที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนครั้งแรก (ชั่วโมง)

4.4 ผลการทดสอบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ 3 ยี่ห้อ ในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ

ผู้วิจัยทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อต่าง ๆ โดยรวบรวมได้ 3 ยี่ห้อ ดังรูปที่ 9 กล่าวคือ ยี่ห้อ A เป็นยาถ่านกัมมันต์รูปแบบผงละเอียดคุณภาพบริสุทธิ์ สำหรับการใช้งานทางการแพทย์ ของบริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์ ซึ่งเป็นหนึ่งในยี่ห้อที่ใช้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในการรักษาผู้ป่วยด้วยการทำหัตถการสวนล้างสารพิษในกระเพาะอาหารทางสายจมูกเมื่อมีข้อบ่งชี้ ในขณะที่ยี่ห้อ B และ C เป็นยาถ่านกัมมันต์ชนิดแคปซูลและแบบเม็ดตามลำดับ ที่วางขายตามร้านขายยาทั่วไปตามท้องตลาด ที่นิยมใช้เป็นการรักษาตามอาการในภาวะท้องร่วงอาหารเป็นพิษ ท้องเสีย และช่วยขับลม โดยยี่ห้อ B มีชื่อการค้าว่า “เกร๊ทเตอร์ คา อา บอน” ผลิตโดยบริษัท เกร๊ทเตอร์ฟาร์ม่า จำกัด สามารถแกะแคปซูลออกและนำผงถ่านที่บรรจุอยู่ไปใช้งานได้ทันที ส่วนยี่ห้อ C มีชื่อการค้าว่า “เดลต้า คาร์บอน” ผลิตโดยบริษัท เภสัชกรรมศรีประสิทธิ์ จำกัด ซึ่งต้องนำยาในรูปแบบเม็ดไปบดจนเป็นผงละเอียดและคำนวณเป็นขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่เป็นส่วนผสมที่ต้องการเป็นสัดส่วนกับขนาดยารวม เพื่อนำไปชั่งตวงให้ได้เฉพาะขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่ต้องการก่อนนำไปใช้งานจริง

ขั้นตอนการเปรียบเทียบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ทั้ง 3 ยี่ห้อข้างต้น เรานำไปผสมกับสารละลายตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย X3 เพียง 1 ราย เนื่องจากจากการทดสอบหาระดับยาในข้อ 4.3 พบว่า ตัวอย่าง X3 มีระดับยาที่เหมาะสมในช่วงการทดสอบ ELISA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการทดสอบพบว่าประสิทธิผลการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนของยี่ห้อ C สูงกว่ายี่ห้อ A และ ยี่ห้อ A สูงกว่ายี่ห้อ B ตามลำดับ และเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์แต่ละยี่ห้อในหลอดตัวอย่าง Null และหลอดทดลองควบคุมลบ(สารละลาย 0.9% NaCl) ซึ่งไม่มียาเซฟไตรแอกโซนเลยนั้น พบว่ายาถ่าน กัมมันต์ไม่รบกวนผลการทดสอบ ELISA นอกจากนี้เมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ลงในหลอดควบคุมบวกซึ่งมียาเซฟไตรแอกโซนมาตรฐานความเข้มข้น 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนได้จนตรวจไม่พบเลย ทั้ง 3 ยี่ห้อ โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 4

ดังนั้น

ผู้วิจัยตัดสินใจเลือกยี่ห้อ C เป็นยาถ่านกัมมันต์ที่นำมาใช้ในการทดสอบหลักของการศึกษานี้

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดการทดสอบหาระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ng/ml) ในสารละลายตัวอย่างอุจจาระ X3 และ Null ในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบระหว่างไม่ผสม และผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) 3 ยี่ห้อ ที่ความเข้มข้นของถ่านกัมมันต์ต่าง ๆ (mg/g) โดยมีสารละลายควบคุมลบและควบคุมบวก

สารละลายตัวอย่างอุจจาระ	ไม่ผสม AC	ผสม AC ยี่ห้อ A		ผสม AC ยี่ห้อ B		ผสม AC ยี่ห้อ C	
		30 mg/g	150 mg/g	30 mg/g	150 mg/g	30 mg/g	150 mg/g
X3 (1:1,000)	> 40.5 ng/ml	N/A	> 40.5 ng/ml	N/A	N/A	N/A	13 ng/ml
X3 (1:3,000)	3.5 ng/ml	1.8 ng/ml	N/A	3 ng/ml	N/A	N/A	N/A
Null (1:3,000)	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	N/A	N/A	< 0.5 ng/ml
สารละลายควบคุมลบ (0.9% NaCl)	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	N/A	< 0.5 ng/ml	N/A	< 0.5 ng/ml	N/A
สารละลายควบคุมบวก (ceftriaxone 30 ng/ml)	30 ng/ml	< 0.5 ng/ml	N/A	< 0.5 ng/ml	N/A	< 0.5 ng/ml	N/A

หมายเหตุ : N/A – not applicable ; ไม่ได้ทำการทดสอบ

4.5 ผลการทดสอบประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ที่ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือด

หลังจากทดสอบ ELISA ในขั้นตอนที 4.3 จะเห็นได้ว่า ตัวอย่าง X1 และ X2 ซึ่งเป็นตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้จากผู้ป่วยหลังจากได้รับยาเซฟไตรแอกโซนเพียง 1 ครั้ง ภายในไม่เกิน 24 ชั่วโมงนั้น มีระดับยาเซฟไตรแอกโซนตั้งต้นต่ำกว่า X3 - X5 กล่าวคือ ระดับยาที่เหมาะสมในการทดสอบควรอยู่ในช่วงระหว่างความเข้มข้น 1:30 – 1:300 สำหรับ X1 และ X2 ในขณะที่ตัวอย่าง X3 - X5 มีระดับยาเซฟไตรแอกโซนสูงกว่า สามารถเจือจางเพื่อให้ได้ช่วงระดับยาที่เหมาะสมในการตรวจวัดที่ความเข้มข้น 1:300 – 1:3,000

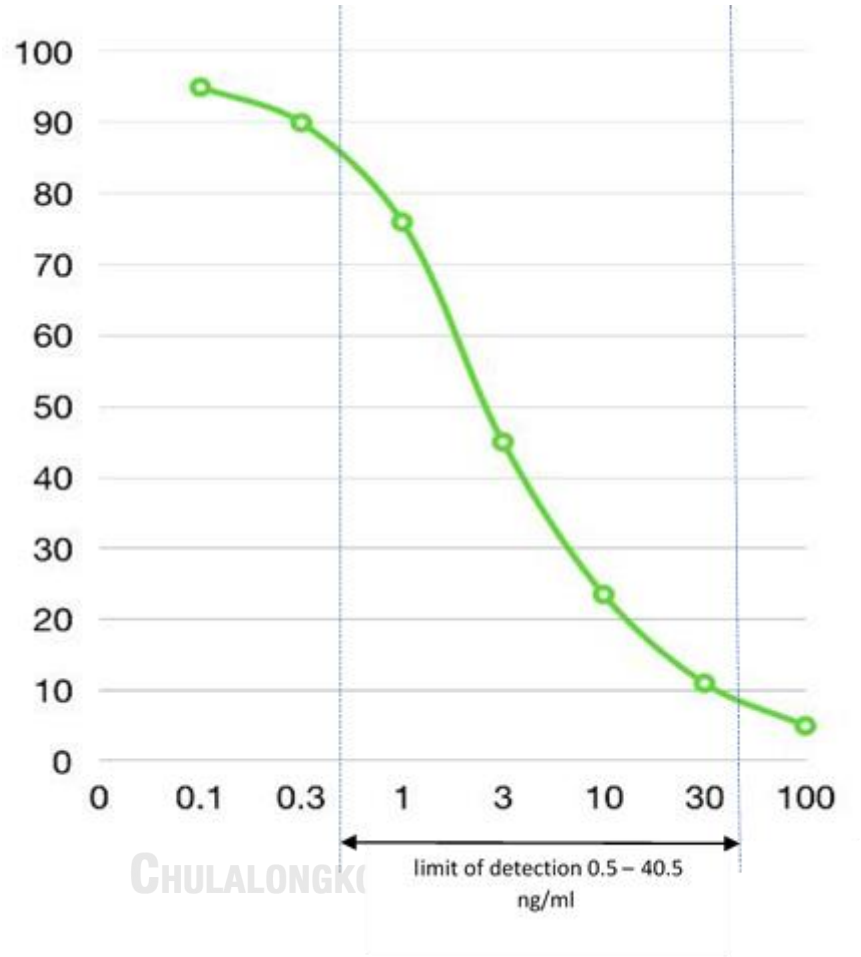
แต่เมื่อทดสอบตัวอย่างอุจจาระ Null ซึ่งไม่มียาเซฟไตรแอกโซนอยู่ ณ ความเข้มข้น 1:30 พบว่าก็มีโอกาสเกิดผลรบกวนการทดสอบ ELISA ได้เนื่องจากค่าที่ตรวจได้คือ 0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไม่เท่ากับความจริงที่ควรตรวจวัดไม่ได้เลย ซึ่งมีโอกาสเป็นผลจากองค์ประกอบของอุจจาระที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจนรบกวนการดูดซับแสงของการทดสอบ ผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกใช้การเจือจางตัวอย่างอุจจาระของ X1 และ X2 ที่ความเข้มข้น 1:100 เพื่อกำจัดผลกระทบต่อผลการทดสอบดังกล่าวนี้

และเมื่อทำการทดสอบตัวอย่าง X3 ในขั้นตอนที่ 4.4 พบว่า ณ ความเข้มข้น 1:1,000 ยังไม่เหมาะสม เนื่องจากระดับยาเซฟไตรแอกโซนที่ตรวจได้ยังมีค่าสูงกว่าค่าจำกัดของเครื่องมือ ELISA ที่ตรวจได้ในช่วง 0.5 – 40.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ สำหรับความเข้มข้นที่ 1:3,000 ตรวจพบระดับยาตั้งต้นเพียง 3.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ลงไป อาจทำให้เห็นความแตกต่างของระดับยาเซฟไตรแอกโซนที่ลดลงได้ไม่ชัดเจน จึงตัดสินใจเลือกใช้การเจือจางตัวอย่างอุจจาระของ X3 – X5 ที่ความเข้มข้น 1:2,000

สำหรับตัวอย่างอุจจาระ X6 – X8 ซึ่งเก็บตัวอย่างได้ในเวลาต่อมา พบว่าเป็นตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนมากกว่า 1 ครั้ง จึงพิจารณาให้ทดสอบที่ความเข้มข้น 1:2,000 เช่นเดียวกับการทดสอบของ X3 – X5 ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทั้งนี้ ได้ทำการทดสอบพร้อมกับสารละลายมาตรฐานเซฟไตรแอกโซนใน 0.9% NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ของการดูดซับแสงกับความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซน ภายใต้การทดสอบคราวเดียวกันใหม่ ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานที่ใช้หาความสัมพันธ์ของระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระในหลอดทดลอง (แกนนอน) ด้วยการทดสอบวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งรายงานผลเป็นร้อยละการดูดซับแสง (แกนตั้ง) โดยมีข้อจำกัดของเครื่องมืออยู่ในช่วง 0.5 – 40.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

รายละเอียดของผลการทดสอบหลักที่ทำการศึกษา และการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับยาเซฟไตรแอกโซนของตัวอย่างอุจจาระแต่ละตัวอย่าง เมื่อไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ กับเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C ที่ความเข้มข้น 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม (ของส่วนประกอบถ่านกัมมันต์สุทธิ) ต่อปริมาณตัวอย่างอุจจาระตั้งต้น 1 กรัม (ดังรายละเอียดการเตรียมตัวอย่างอุจจาระและการผสมยาถ่านกัมมันต์ ข้อ 3.2.3 – 3.2.5) แสดงดังในตารางที่ 5

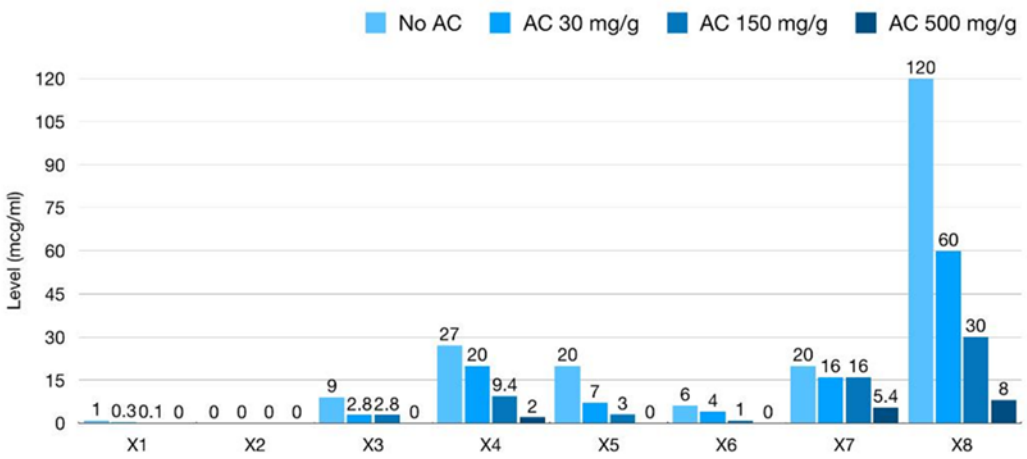
ตารางที่ 5 แสดงระดับยาเซฟไตรแอกโซน (ng/ml) ที่ได้จากการทดสอบ ELISA ของสารละลายตัวอย่าง X1 – X8 และ Null ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวอย่าง เปรียบเทียบระหว่างหลอดที่ไม่ผสม กับ หลอดที่ผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) ยี่ห้อ C ด้วยขนาดความเข้มข้น 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) (mg/g)

สารละลายตัวอย่างอุจจาระ	ไม่ผสม AC	ผสม AC 30 mg/g	ผสม AC 150 mg/g	ผสม AC 500 mg/g
X1 (1:100)	10 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	< 0.5 ng/ml
X2 (1:100)	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml
X3 (1:2,000)	4.5 ng/ml	1.4 ng/ml	1.4 ng/ml	< 0.5 ng/ml
X4 (1:2,000)	13.5 ng/ml	10 ng/ml	4.7 ng/ml	1 ng/ml
X5 (1:2,000)	10 ng/ml	3.5 ng/ml	1.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml
X6 (1:2,000)	3 ng/ml	2 ng/ml	0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml
X7 (1:2,000)	10 ng/ml	8 ng/ml	8 ng/ml	2.7 ng/ml
X8 (1:2,000)	>40.5 ng/ml (60) *	30 ng/ml	15 ng/ml	4 ng/ml
Null (1:100)	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml
Null (1:2,000)	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml

*เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณความสัมพันธ์ของค่า OD ที่วัดได้จริงและร้อยละการดูดซับแสงบนกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 15) (ng/ml)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากตารางที่ 5 หากนำระดับยาเซฟไตรแอกโซนที่ตรวจวัดได้จากการทดสอบ ELISA ณ ค่าการเจือจางที่ความเข้มข้นตั้งต้นของการทดสอบนั้น ๆ มาคูณกลับเป็นขนาดยาที่ความเข้ม 1:1 จะได้ระดับยาเซฟไตรแอกโซนสัมบูรณ์ (absolute concentration) ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยแต่ละราย (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยจะเห็นได้ว่าหลังจากผสมยาถ่านกัมมันต์ ระดับยาเซฟไตรแอกโซนลดลงอย่างชัดเจนและมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 แผนภูมิแท่งแสดงระดับยาเซฟไตรแอกโซนสัมฤทธิ์ในตัวอย่างอุจจาระ (แกนตั้ง) เมื่อไม่ได้ผสมยาถ่านกัมมันต์ เปรียบเทียบกับการผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) ที่ขนาดยา 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) จำแนกตามผู้ป่วยแต่ละราย (X1 – X8) (แกนนอน)

จะเห็นได้ว่า X1 ตรวจพบระดับยาเซฟไตรแอกโซนสัมฤทธิ์ในอุจจาระเพียง 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยตัวอย่าง X1 ถูกเก็บภายหลังได้รับยาทางหลอดเลือดดำ 17 ชั่วโมง และตรวจไม่พบยาเซฟไตรแอกโซนเลยในตัวอย่าง X2 ซึ่งเก็บภายหลังได้รับยาเพียง 14 ชั่วโมง

ตรวจพบระดับยาเซฟไตรแอกโซนสัมฤทธิ์เป็น 9, 27, 20, 6, 20 และ 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากตัวอย่าง X3 – X8 ตามลำดับ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บภายหลังได้รับยามากกว่า 24 ชั่วโมงขึ้นไป กล่าวได้ว่าได้รับยาตั้งแต่ 2 ครั้งขึ้นไป โดยมีค่าเฉลี่ย (mean) อยู่ที่ 33.67 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; SD 39.25) หากจำแนกตามจำนวนครั้งที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซน ได้เป็นกลุ่มที่ได้รับยา 2 ครั้งก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระมี 3 ราย (X3 – X5) มีค่าเฉลี่ยของระดับยาสัมฤทธิ์ในอุจจาระ คือ 18.67 (± SD 7.41) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, กลุ่มที่ได้รับยา 3 ครั้งก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระมี 2 ราย (X6, X7) มีค่าเฉลี่ยของระดับยาสัมฤทธิ์ในอุจจาระ คือ 13 (± SD 7) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มที่ได้รับยา 4 ครั้งก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระมีเพียงรายเดียว (X8) ซึ่งระดับยาในอุจจาระสูงมากกว่าที่เครื่องมือ ELISA แนะนำ (เจือจางด้วยความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม) แต่สามารถคำนวณด้วยค่า OD ที่วัดได้เพื่อหาความสัมพันธ์กับกราฟมาตรฐานจะได้ค่าคำนวณของระดับยาสัมฤทธิ์ในตัวอย่าง X8 อยู่ที่ 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับการตรวจสอบนัยสำคัญทางสถิติของระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระที่ลดลง เมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ในหลอดทดลอง จะเห็นได้ว่า ข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ทางสถิติมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-parametric distribution) จึงจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ ดังรายละเอียดข้อ 3.4 และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาสัดส่วนของ geometric mean reduction ของความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซน เมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์เปรียบเทียบกับความเข้มข้นตั้งต้นที่ไม่ผสมยาถ่านกัมมันต์ในตัวอย่างอุจจาระที่ทดสอบในขั้นตอนสุดท้าย

ทั้งนี้มีการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยขนาดตัวอย่าง 3 รูปแบบ กล่าวคือ

- วิเคราะห์ข้อมูลจากทั้ง 8 ตัวอย่าง (N = 8)
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยตัด X2 ออก เนื่องจากวัดระดับยาเซฟไตรแอกโซนในตัวอย่างอุจจาระก่อนผสมยาถ่านกัมมันต์ไม่ได้ตั้งแต่ต้น ทำให้ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของระดับยาที่ลดลงเมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ได้ (N = 7)
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยตัดทั้ง X2 (ดังเหตุผลที่กล่าวแล้ว) และ X8 ซึ่งมีระดับยาเซฟไตรแอกโซนตั้งต้นสูงเกินกว่าค่าแนะนำของเครื่องมือทดสอบ ELISA เป็นเหตุให้ข้อมูลที่ได้จากการคำนวณจากความสัมพันธ์กับกราฟมาตรฐาน อาจมีความคลาดเคลื่อน (N = 6)

โดยทั้ง 3 รูปแบบมีขนาดประชากรตั้งแต่ 6 ตัวอย่างขึ้นไป ซึ่งเพียงพอกับการพิสูจน์สมมติฐานที่คำนวณขนาดตัวอย่างไว้ตอนต้น (sample size calculation; N = 6) มีรายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 6 และ รูปที่ 17

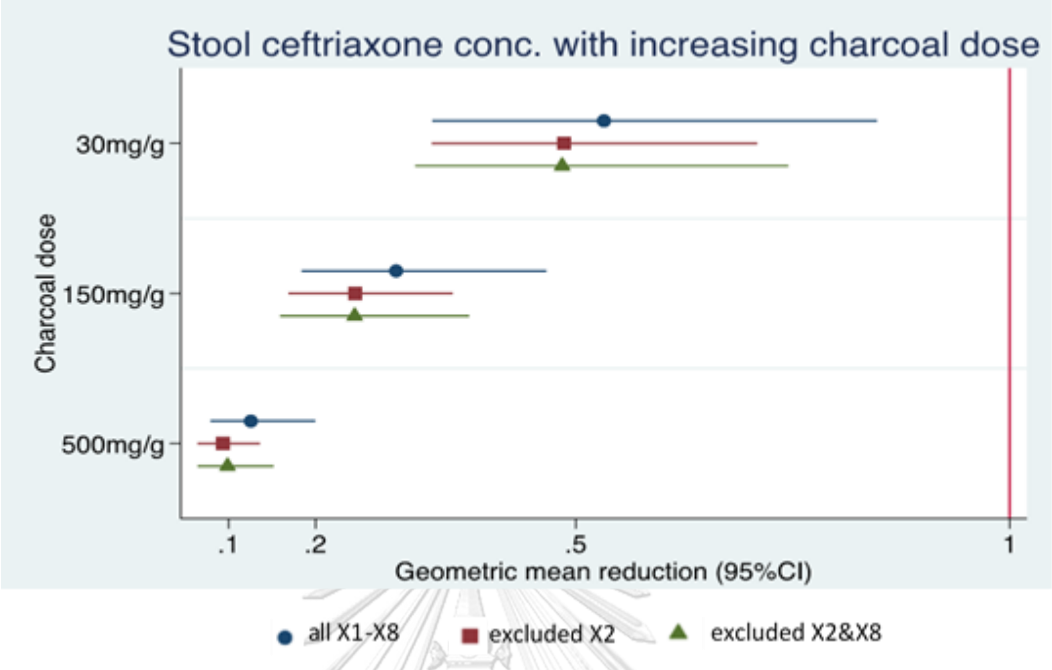
ตารางที่ 6 แสดงการวิเคราะห์หาสัดส่วน (ratio) ของระดับยาเฉลี่ยที่ลดลง (geometric mean reduction; GMR) เมื่อเทียบระหว่างไม่ผสมกับผสมยาถ่านกัมมันต์ (activated-charcoal; AC) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พร้อมการคำนวณร้อยละประสิทธิผลการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ (%)

การวิเคราะห์ 3 แบบ: X1-X8 (N =8), ตัด X2 ออก (N =7) และ ตัด X2, X8 ออก (N =6)

AC (มก/กรัมของอุจจาระ) (mg/g)	GMR ratio (95% CI)	*p*-value (< 0.05)	ร้อยละ (%) ของประสิทธิผลการดูดซับ
X1-X8 (N=8)			
ไม่ผสม AC	1	N/A	N/A
ผสม AC 30 mg/g	0.53 (0.33-0.85)	0.008	47%
ผสม AC 150 mg/g	0.29 (0.18-0.47)	<0.001	71%
ผสม AC 500 mg/g	0.13 (0.08-0.2)	<0.001	87%
ตัด X2 ออก (N=7)			
ไม่ผสม AC	1	N/A	N/A
ผสม AC 30 mg/g	0.49 (0.33-0.71)	<0.001	51%
ผสม AC 150 mg/g	0.25 (0.17-0.36)	<0.001	75%
ผสม AC 500 mg/g	0.09 (0.06-0.14)	<0.001	91%
ตัด X2, X8 ออก (N=6)			
ไม่ผสม AC	1	N/A	N/A
ผสม AC 30 mg/g	0.48 (0.31-0.74)	<0.001	52%
ผสม AC 150 mg/g	0.25 (0.16-0.38)	<0.001	75%
ผสม AC 500 mg/g	0.1 (0.06-0.15)	<0.001	90%

หมายเหตุ : N/A – not applicable ; ไม่ได้ทำการทดสอบ

Chulalongkorn University



รูปที่ 17 แผนภูมิแสดงสัดส่วนระดับยาเซฟไตรแอกโซนเฉลี่ยที่ลดลง (geometric mean reduction ratio (95% CI)) จำแนกตามขนาดความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่ผสมในหลอดตัวอย่างอุจจาระ และแจกแจงตามการวิเคราะห์ 3 รูปแบบ : X1-X8 (all X1-X8) (N = 8), ตัด X2 ออก (excluded X2) (N = 7) และ ตัด X2, X8 ออก (excluded X2&X8) (N = 6)

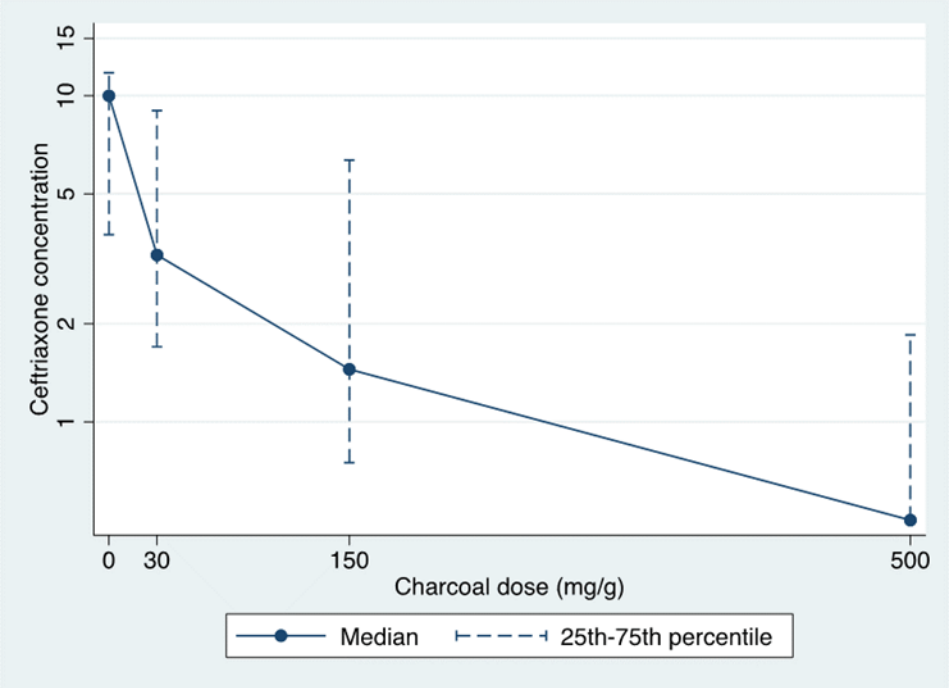
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จะเห็นได้ว่ายาถ่านกัมมันต์มีประสิทธิผลในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้ผลลัพธ์เป็นไปในแนวทางเดียวกันไม่ว่าจะวิเคราะห์ในรูปแบบใดก็ตามทั้ง 3 รูปแบบที่ใช้ขนาดตัวอย่างประชากรต่างกัน

หากอาศัยการวิเคราะห์จาก X1-X8 (N=8) พบว่าขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่ใช้ไม่ว่าจะ 30, 150 หรือ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) ทำให้ระดับยาเซฟไตรแอกโซนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ GMR ratio เท่ากับ 0.53 (95% CI 0.33 – 0.85, *p*-value < 0.001), 0.29 (95% CI 0.18 – 0.47, *p*-value < 0.001) และ 0.13 (95% CI 0.08 – 0.2, *p*-value < 0.001) ตามลำดับ

4.6 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของประสิทธิผลการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระกับขนาดของยาถ่านกัมมันต์ที่แตกต่างกัน

หากอาศัยการวิเคราะห์จาก X1-X8 (N=8) พบว่าขนาดยาถ่านกัมมันต์ที่ใช้ 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) มีประสิทธิผลคิดเป็นร้อยละการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ อยู่ที่ร้อยละ 47, 71 และ 87 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแนวโน้มประสิทธิผลในการดูดซับเพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับขนาดของยาถ่านกัมมันต์ที่สูงขึ้นอย่างชัดเจน จึงได้ทำการหาความสัมพันธ์ ของขนาดของยาถ่านกัมมันต์ที่สูงขึ้นกับความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระที่ลดลง สามารถสร้างเป็นกราฟให้เข้าใจง่ายได้ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระที่ลดลง (แกนตั้ง; $\log_e$ scale) กับขนาดของยาถ่านกัมมันต์ที่ใช้ผสมในหลอดทดลอง (แกนนอน) ที่เพิ่มขึ้น

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

คุณสมบัติของผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับสารพิษ ได้พิสูจน์จากการศึกษานี้แล้วว่ามีประโยชน์ทางการแพทย์ นอกเหนือไปจากการใช้ดูดซับสารพิษในกระเพาะอาหาร กล่าวคือสามารถนำมาใช้ดูดซับยาปฏิชีวนะส่วนเกินที่หลงเหลือในอุจจาระจากลำไส้ใหญ่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลลัพธ์ที่สำคัญที่ได้จากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่ายาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปที่มีขายตามร้านขายยา มีประสิทธิผลในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ เมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์ในสารละลายตัวอย่างอุจจาระในหลอดทดลอง ณ สภาวะจำลองการทำงานของลำไส้ใหญ่ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่ 30, 150 หรือ 500 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) และประสิทธิผลจะเพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่สูงขึ้นตามลำดับ แต่รูปแบบความสัมพันธ์ไม่เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น ซึ่งมีประสิทธิผลการดูดซับอยู่ที่ร้อยละ 47, 71 และ 87 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าผู้ป่วยรายที่ 2 มีระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระต่ำมากจนตรวจไม่พบเลยด้วยการทดสอบ ELISA ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถระบุความแตกต่างของระดับยาเซฟไตรแอกโซนที่ต่างกันระหว่างผสมและไม่ผสมยาถ่านกัมมันต์ได้ ส่วนผู้ป่วยรายที่ 8 มีระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระสูงมากจนเกินค่าแนะนำของการทดสอบ ELISA ที่ใช้ในการศึกษานี้ ทำให้ระดับยาที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานมีโอกาสคลาดเคลื่อนได้ ซึ่งหากวิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่รวมตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยรายที่ 2 และไม่รวมตัวอย่างอุจจาระจากทั้งผู้ป่วยรายที่ 2 และรายที่ 8 ก็พบว่าไม่ว่าจะวิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูลที่แตกต่างกัน 3 แบบดังกล่าวนั้น ได้แก่ N = 8 (X1-X8), N = 7 (X1, X3-

X8) หรือ N = 6 (X1, X3-X7) ก็ให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกันทั้งหมด และขนาดตัวอย่างก็เพียงพอตามที่ได้คำนวณไว้ในตอนแรกที่ต้องการขนาดตัวอย่างขั้นต่ำอย่างน้อย 6 ราย จึง เป็นการยืนยันสมมติฐานว่ายาถ่านกัมมันต์มีประสิทธิผลในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ความหลากหลายของระดับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระ ซึ่งอยู่ในช่วง 0 – 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของผู้ป่วยในการศึกษานี้ มีข้อสังเกตที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับจำนวนครั้งของยาเซฟไตรแอกโซนที่ผู้ป่วยรายนั้นได้รับ รวมทั้งช่วงเวลานับจากที่ได้รับยาครั้งแรกไปจนกระทั่งเวลาที่เก็บตัวอย่างอุจจาระ กล่าวคือ เมื่อได้รับยาจำนวนครั้งมากกว่า และ/หรือ ช่วงเวลาก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระเมื่อนับจากเวลาที่ได้รับยาครั้งแรกนานกว่า มักมีแนวโน้มระดับยาในอุจจาระสูงกว่า ดังนั้นจะเห็นได้ว่า X1 และ X2 ได้รับยาเพียงครั้งเดียวทั้งคู่ทำให้มีระดับยาตั้งต้นในอุจจาระน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง X2 เก็บตัวอย่างอุจจาระภายหลังได้รับยาเพียง 14 ชั่วโมง ทำให้ตรวจไม่พบระดับยาในอุจจาระเลย ในขณะที่ X1 เก็บตัวอย่างอุจจาระภายหลังได้รับยา 17 ชั่วโมง ยังตรวจพบระดับยาอยู่บ้างแต่น้อยมากเพียง 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ X3, X4, X5 และ X7 ได้รับยา 2-3 ครั้ง และเก็บตัวอย่างอุจจาระภายหลังได้รับยาครั้งแรกเป็นระยะเวลาไม่ต่างกันมากนัก เฉลี่ย 42.5 ± 4.03 ชั่วโมง พบว่ามีระดับยาในอุจจาระใกล้เคียงกัน เฉลี่ย 19 ± 6.44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสำหรับ X8 ซึ่งได้รับยามากที่สุดคือ 4 ครั้งและเก็บตัวอย่างอุจจาระภายหลังได้รับยานานที่สุดคือ 73 ชั่วโมง ก็พบว่ามีระดับยาในอุจจาระสูงที่สุด คือ 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน) แต่สำหรับ X6 ซึ่งได้รับยา 3 ครั้งและเก็บอุจจาระภายหลังได้รับยาครั้งแรกไปแล้วนานถึง 58 ชั่วโมง กลับพบว่ามีระดับยาในอุจจาระต่ำกว่าที่ควรจะเป็น โดยตรวจได้เพียง 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากการไปทบทวนพฤติกรรมการขับถ่ายอุจจาระพบว่าผู้ป่วยรายที่ 6 เกิดอาการท้องผูกเมื่อเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล จึงไม่ได้ขับถ่ายอุจจาระทุกวันเหมือนตอนภาวะร่างกายปกติ จึงอาจอธิบายได้ว่าอุจจาระบางส่วนที่ค้างอยู่ในลำไส้ใหญ่ก่อนที่จะได้รับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซน มีการขยับตัวช้ากว่าปกติ ทำให้ตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้อาจไม่ได้เป็นตัวแทนของอุจจาระภายหลังได้รับยาทั้งหมด และเมื่อมีการเก็บตัวอย่างอุจจาระจึงอาจมีส่วนของอุจจาระตกค้างซึ่งไม่มียาเซฟไตรแอกโซนผสมอยู่ด้วย ทำให้ค่าระดับยาที่ได้ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น จากข้อมูลที่ได้นี้นำไปสู่การวางแผนการศึกษาในอนาคตหากต้องการศึกษาระดับยาในอุจจาระ ต้องคำนึงถึงข้อจำกัดในระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างอุจจาระและข้อจำกัดกรณีผู้ป่วยมีการขับถ่ายผิดปกติร่วมด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าแนวโน้มระดับยาในอุจจาระสูงขึ้น เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะหลายครั้งและเป็นเวลานานขึ้น ย่อมนำไปสู่การเสียสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ อันได้รับผลกระทบจากยาปฏิชีวนะส่วนเกินเหล่านี้ได้มากขึ้นตามมาเช่นกัน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าหากยาถ่านกัมมันต์ดูดซับยาส่วนเกินเหล่านี้ในอุจจาระได้ จะช่วยปกป้องการเสียสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นได้หรือไม่ และอย่างไร อันเป็นแผนงานการศึกษาในขั้นตอนถัดไปของทีมผู้วิจัย

จุดแข็งของการวิจัย

DAV132 เป็นยาถ่านกัมมันต์รูปแบบพิเศษที่ถูกออกแบบทางเภสัชวิศวศาสตร์ (pharmaco-engineering) ให้สามารถรับประทานแล้วไปแตกตัวออกฤทธิ์ทำงานเมื่ออยู่ในลำไส้ใหญ่เท่านั้น และมีรายงานการศึกษาว่าสามารถดูดซับยาปฏิชีวนะมอกซิฟล็อกซาซินในลำไส้ใหญ่มนุษย์ที่ได้รับยาทางการรับประทานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งปกป้องการเสียสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม DAV132 ยังอยู่ในขั้นตอนการวิจัยเพิ่มเติม และยังไม่ได้วางขายตามท้องตลาด [13]

แต่สำหรับยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไป ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนเกี่ยวกับคุณประโยชน์นี้ งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่พิสูจน์ประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ และจุดแข็งของงานวิจัยนี้คือ เมื่อเราสามารถพิสูจน์ได้ว่ายาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปนี้มีประสิทธิผลดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และนำไปศึกษาต่อยอดในแง่การปกป้องการเสียสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นต่อไปได้ทันที โดยยาถ่านกัมมันต์ทั่วไปนี้มีราคาถูก ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และจะเห็นได้ว่าแม้ด้วยการใช้ขนาดยาถ่านกัมมันต์เพียง 30 มิลลิกรัม/กรัม (ของอุจจาระ) ก็มีประสิทธิผลการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระได้เกือบร้อยละ 50 ซึ่งจากการศึกษานี้ พบว่าการใช้ยาขนาดดังกล่าวสามารถลดระดับความเข้มข้นของยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระได้เหลือลดลงต่ำกว่าค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อ Enterbacterales (MIC ≤ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ anaerobes (MIC ≤ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [18] สายพันธุ์ประจำถิ่นโดยส่วนใหญ่ของลำไส้มนุษย์ในผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนมาไม่เกิน 3 ครั้ง อันสามารถอนุมานได้ว่าเมื่อระดับยาถูกดูดซับไปได้มากเพียงพอที่จะไม่ทำลายเชื้อจุลชีพประจำถิ่นอีกด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกจากนี้ ขนาดยาถ่านกัมมันต์นี้เทียบเท่ากับการรับประทานยาถ่านกัมมันต์เฉลี่ย 3 กรัมต่อวันในผู้ใหญ่ที่มีการขับถ่ายอุจจาระปกติวันละ 100 กรัม หรือ 100 มิลลิลิตร อันเป็นขนาดยาปกติตามข้อแนะนำฉลากยามาตรฐานของยาถ่านกัมมันต์ ในข้อบ่งชี้บรรเทาอาการท้องเสียอาหารเป็นพิษ ที่ใช้ได้อย่างปลอดภัย และไม่มีข้อควรระวังที่อันตราย ดังนั้นหากงานวิจัยต่อยอดในการศึกษาในมนุษย์ให้ผลลัพธ์ที่ดีสอดคล้องกับการศึกษาในหลอดทดลองของการศึกษานี้ ย่อมนำไปสู่ประโยชน์ในวงกว้างได้คุ้มค่าเป็นอย่างยิ่ง

ข้อจำกัดในการวิจัย

จุดต่างจาก DAV132 คือ ยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปแบบรับประทาน หากต้องการนำมาใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน ยาถ่านกัมมันต์ทั่วไปย่อมดูดซับยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ทำให้ลดประสิทธิภาพและระดับยาปฏิชีวนะในกระแสเลือด จึงนับว่ายังมีข้อจำกัดในแง่การวางแผนการศึกษาด้วยการกำหนดระยะห่างของยาที่รับประทานคนละเวลาตามแต่เภสัชจลนศาสตร์ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่ต้องวางแผนงานวิจัยในอนาคตต่อไป ซึ่งอาจไม่สามารถทดแทน/เทียบเท่าการใช้ DAV132

นอกจากนี้เนื่องจากประสิทธิผลการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนด้วยยาถ่านกัมมันต์มีความสัมพันธ์กับขนาดยาที่ใช้ ดังนั้น หากผู้ป่วยได้ยาทางหลอดเลือดดำต่อเนื่องนานกว่า 3 ครั้ง ส่งผลให้ระดับยาส่วนเกินสะสมในอุจจาระย่อมสูงขึ้นตาม หากต้องการดูดซับยาได้เพิ่มขึ้นและใช้ขนาดยาถ่านกัมมันต์สูงขึ้น ทำให้ไม่สะดวกในการใช้งานจริงหากต้องให้ผู้ป่วยรับประทานยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปจำนวนหลายเม็ด และต่อเนื่องตลอดควบคู่กับการได้รับยาเซฟไตรแอกโซน หากนำไปใช้จริงอาจต้องเริ่มพัฒนาในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะระยะสั้น รวมถึงต้องมีการบริหารยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปรับประทานครั้งแรก ก่อนเริ่มยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนอีกด้วย

สำหรับความแตกต่างในแง่ประสิทธิผลของการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อต่าง ๆ ที่การศึกษานี้ได้พยายามทำการศึกษาเบื้องต้น ยังมีข้อจำกัดในแง่เสถียรภาพของผลการทดสอบ เนื่องจากงบประมาณทางด้านวัสดุอุปกรณ์ของชุดทดสอบ ELISA ทำให้ตัดสินใจทดสอบด้วยตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยเพียงรายเดียว และแบ่งการทดสอบเป็นหลายขั้นตอน ผลลัพธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ที่ได้อาจยังไม่สามารถนำไปใช้ขยายความในแง่การใช้งานทางคลินิกได้ จำเป็นต้องการการทดสอบด้วยตัวอย่างอุจจาระที่หลากหลาย และทดสอบด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ณ จุดเวลาเดียวกันเพิ่มเติม ก่อนสรุปความทางการใช้งานทางคลินิก การศึกษานี้เพียงต้องการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น

การศึกษานี้ต้องการทดสอบสมมติฐานในแง่ประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระเป็นหลัก ความแตกต่างของความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างอุจจาระที่แตกต่างกันของผู้ป่วยแต่ละราย จึงไม่มีผลต่อผลลัพธ์หลักซึ่งเป็นสัดส่วนของระดับยาที่เหลืออยู่เมื่อผสมยาถ่านกัมมันต์เทียบกับไม่ผสมยาถ่านกัมมันต์ อย่างไรก็ตามระดับยาที่ตรวจวัดได้นั้นต้องอาศัยการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA ที่มีค่าจำกัดของช่วงการตรวจวัด ทำให้ขั้นตอนการเจือจางสารละลายอุจจาระค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน และใช้เวลานาน

สุดท้ายนี้ แม้ว่าจะมีข้อจำกัดหลายข้อดังการอภิปรายข้างต้น แต่หากมีการศึกษาต่อยอดทางคลินิกที่รัดกุมมากขึ้น และได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติม นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นของแนวคิดใหม่ในการปกป้องสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นที่ดีต่อไปได้อีกหนึ่งแนวทาง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สรุปผล

- ยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วมีประสิทธิผลในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลองจากอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- ยาถ่านกัมมันต์ยี่ห้อ C มีประสิทธิภาพในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลองจากอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาทางหลอดเลือดดำสูงที่สุด จากการทดลองเบื้องต้นในการศึกษานี้
- ประสิทธิผลการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในอุจจาระของยาถ่านกัมมันต์ จะเพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ที่สูงขึ้น แต่รูปแบบความสัมพันธ์ไม่เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น กล่าวคือ ดูดซับได้ร้อยละ 47, 81 และ 87 เมื่อใช้ความเข้มข้นของยาถ่านกัมมันต์ 30, 150 และ 500 มิลลิกรัม/กรัม(อุจจาระ) ตามลำดับ
- งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลสำคัญต่อการศึกษาต่อยอดในการศึกษาในมนุษย์อาสาสมัครของทีมผู้วิจัยต่อไป เพื่อทดสอบสมมติฐานในการปกป้องการเสียสมดุลของจุลชีพประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำควบคู่ไปกับยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปในขนาดปกติ 30 มิลลิกรัม/กรัม(อุจจาระ) ซึ่งเทียบเท่ากับการรับประทานยาถ่านกัมมันต์เฉลี่ย 3 กรัมต่อวัน ซึ่งเป็นขนาดยาที่รับประทานทั่วไปในการรักษาภาวะท้องร่วงจากอาหารเป็นพิษ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อเสนอแนะ

หากสามารถพัฒนาแนวทางการตรวจระดับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนด้วยวิธี HPLC ได้ จะทำให้แนวทางการศึกษาวิจัยแม่นยำมากขึ้น และซับซ้อนน้อยลงเนื่องจากไม่ต้องทำการทดสอบในขั้นตอนการหาความเข้มข้นของตัวอย่างอุจจาระที่เจือจางได้เหมาะสมกับการทดสอบ ELISA ในผู้ป่วยแต่ละราย และได้ค่าการทดสอบเป็นระดับยาที่วัดได้โดยตรงและแปลผลได้ทันที ซึ่งอาจต้องการเงินทุนวิจัยที่สูง และพัฒนาร่วมกับภาควิชาเภสัชวิทยาต่อไป

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

เอกสารกำกับชุดทดสอบ cephalosporin ELISA ที่ใช้ในการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

CD
CREATIVE DIAGNOSTICS

Cephalosporins ELISA Kit

Cat.: DEIABL-QB31

1. Background

The cephalosporins are a class of β-lactam antibiotics originally derived from Acremonium, which was previously known as "Cephalosporium". Together with cephamycins they constitute a subgroup of β-lactam antibiotics called cephems.

The ELISA kit is a new product based on ELISA technology, which is fast, easy, accurate and sensitive compared with common instrumental analysis and only needs 1.5h in one run, so it can considerably minimize operation error and work intensity.

2. Test Principle

This kit is based on indirect-competitive ELISA technology. The microtiter wells are coated with coupling antigen. Cephalosporins residue in the sample competes with the antigen coated on the microtiter plate for the antibody. After the addition of enzyme conjugate, TMB substrate is used to show the color. Absorbance of the sample is negatively related to the cephalosporins in it, after comparing with the Standard Curve, multiplied by the dilution factor, cephalosporins quantity in the sample can be calculated.

3. Applications

This kit can be used in quantitative and qualitative analysis of cephalosporins in animal tissue (pork, chicken, beef, fish and shrimp) and milk.

4. Cross-reactions

Ceftiofur.....100%
Ceftriaxone.....169%
Cefotaxime.....63%
Cefazolin.....<0.1%

5. Materials Required

5.1 Equipments

---Microtiter plate spectrophotometer (450nm/630nm)
---Rotary evaporator or nitrogen gas drying system
---Homogenizer
---Shaker
---Vortex mixer
---Centrifuge
---Analytical balance (inductance: 0.01g)
---Graduated pipette: 10ml
---Rubber pipette bulb
---Polystyrene centrifuge tubes: 2ml, 50ml
---Glass test tube: 10ml
---Volumetric flask: 100ml, 500ml
---Micropipettes: 20ul-200ul,100ul-1000ul, 250ul-multipipette

5.2 Reagents

---Concentrated hydrochloric acid (HCl, AR)
---Acetonitrile (AR)
---N-hexane (AR)
---Deionized water

6. Kit Components

- Microtiter plate with 96 wells coated with antigen
- Ceftiofur standard solutions. (1ml×6 bottles)
  0 ppb, 0.5ppb, 1.5ppb, 4.5ppb, 13.5ppb, 40.5 ppb
- Spiking standard solution: 1ml, **1ppm**
- Enzyme conjugate (12ml).....red cap
- Antibody solution (7ml).....green cap
- Solution A (7ml) .....white cap
- Solution B (7ml) .....red cap
- Stop solution (7ml) .....yellow cap
- 20×Concentrated wash solution (40ml) ..... transparent cap
- 2×Concentrated extraction solution (50ml) ..... blue cap

7. Reagents Preparation

Solution 1: 0.05M HCl

Dilute 2.1ml of concentrated HCl with water to 500ml.

Solution 2: Sample extraction buffer

Mix 80ml of acetonitrile with 20ml of 0.05M HCl solution.

Solution 3: Extraction solution

Dilute the 2×concentrated extraction solution with deionized water in the volume ratio of 1:1(*e.g. 10ml of 2×extraction solution + 10ml of deionized water*), which will be used for sample extraction, *this solution can be stored at 4℃ for 1 month*.

Creative Diagnostics. All rights reserved
45-16 Ramsey Road Shirley, NY 11967, USA
Tel: 631-624-4882 Fax: 1-631-938-8221
E-mail: info@creative-diagnostics.com
www.creative-diagnostics.com

Solution 4: Wash solution

Dilute the 20×concentrated wash solution with deionized water in the volume ratio of 1:19(*e.g. 5ml of 20×wash solution + 95ml of deionized water*), which will be used for washing the plates. *This solution can be stored at 4℃ for 1 month.*

8. Sample Preparations

8.1 Notice and precautions before operation

(a) Please use one-off tips in the process of experiment, and change the tips when absorbing different reagent.

(b) Make sure that all experimental instruments are clean.

8.2 Tissue (pork, chicken, beef, fish and shrimp):

---Take 2.0± 0.05g of homogenized tissue sample into a 50ml tube, then add 8ml of sample extraction buffer (**solution** 2), shake for 5min, and then centrifuge for separation: 3000g / ambient temperature / 5min..

---Transfer 1ml of the supernate into a 10ml clean glass tube, dry with 50-60℃ water bath under nitrogen gas stream.

---Add 1ml of n-hexane, vortex for 30s, then add 1ml of extraction solution (**solution** 3), vortex for 30s to dissolve completely, centrifuge for separation: 3000g / ambient temperature / 5min..

---Remove the upper n-hexane layer, and take 50μl of the lower aqueous layer per well for assay.

Dilution factor: 4

8.2 Milk

---Take 100μl of raw milk into 2ml tube, and add 900μl of extraction solution (**solution** 3), then mix completely.

---Take 50μl per well for assay.

Dilution factor: 10

9. Assay process

9.1 Notice before assay

9.1.1 Make sure all reagents and microwells are all at room temperature (20-25℃).

9.1.2 Return all the rest reagents to 2-8℃ immediately after used.

9.1.3 Washing the microwells correctly is an important step in the process of assay; it is the vital factor to the reproducibility of the ELISA analysis.

9.1.4 Avoid the light and cover the microwells during incubation.

9.2 Assay Steps

9.2.1 Take all reagents out at room temperature (20-25℃) for more than 30min, homogenize before use.

9.2.2 Get the microwells needed out and return the rest into the zip-lock bag at 2-8℃ immediately.

9.2.3 The diluted wash solution should be rewarmed to be at room temperature before use.

9.2.4 **Number:** Numbered every microwell positions and all standards and samples should be run in duplicate. Record the standards and samples positions.

9.2.5 **Add standard solution/sample and antibody solution:** Add 50μl of standard solution(**Kit provided**) or prepared sample to corresponding wells. Add 50μl of antibody solution(**Kit provided**). Mix gently by rocking the plate manually and incubate for 30min at 4-8℃ with cover.

9.2.6 **Wash:** Remove the cover gently and pour the liquid out of the wells and rinse the microwells with 250μl diluted wash solution (**solution** 4) at interval of 10s for 4-5 times. Absorb the residual water with absorbent paper (*the rest air bubble can be eliminated with unused tip*).

9.2.7 **Add Enzyme conjugate:** Add 100μl of enzyme conjugate(**Kit provided**) to each well, Mix gently by rocking the plate manually and incubate for 30min at 25℃ with cover. *Repeat the wash step again.*

9.2.8 **Coloration:** Add 50μl solution A(**Kit provided**) and 50μl solution B(**Kit provided**) to each well. Mix gently by rocking the plate manually and incubate for 15min at 25℃ with cover(see 12.8).

9.2.9 **Measure:** Add 50μl of stop solution(**Kit provided**) to each well. Mix gently by rocking the plate manually and measure the absorbance at 450nm (*It's suggested measure with the dual-wavelength of 450/630nm. Read the result within 5min after addition of stop solution*).

10. Results

10.1 Percentage absorbance

The mean values of the absorbance values obtained for the standards and the samples are divided by the absorbance value of the first standard (zero standard) and multiplied by 100%. The zero standard is thus made equal to 100% and the absorbance values are quoted in percentages.

Creative Diagnostics. All rights reserved
45-16 Ramsey Road Shirley, NY 11967, USA
Tel: 631-624-4882 Fax: 1-631-938-8221
E-mail: info@creative-diagnostics.com
www.creative-diagnostics.com

$$\text{Absorbance}\ (\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B ——absorbance standard (or sample)

B0 ——absorbance zero standard

10.2 Standard Curve

—To draw a standard curve: Take the absorbance value of standards as y-axis, semi logarithmic of the concentration of the cefitiofur standards solution (ppb) as x-axis.

—The cephalosporins concentration of each sample (ppb), which can be read from the calibration curve, is multiplied by the corresponding dilution factor of each sample followed, and the actual concentration of sample is obtained.

Please notice:

For evaluation of the result, special software has been developed, which can be provided on request.

11. Sensitivity, accuracy and precision

Test Sensitivity: **0.5ppb**

Detection limit

Animal tissue.....2ppb

Milk.....5ppb

Accuracy

Tissue(pork, beef, chicken).....80±20%

Tissue(fish and shrimp).....80± 20%

Milk.....100±20%

Precision

Variation coefficient of the ELISA kit is less than 10%.

12. Notice

12.1 The mean values of the absorbance values obtained for the standards and the samples will be reduced if the reagents and samples have not been regulated to room temperature (20-25℃).

12.2 Do not allow microwells to dry between steps to avoid unsuccessful reproducibility and operate the next step immediately after tap the microwells holder.

12.3. Shake each reagent gently before use.

12.4. Keep your skin away from the stop solution for it is the 0.5M H_2SO_4 solution.

12.5 Don't use the kits out of date. Don't exchange the reagents of different batches, or else it will drop the sensitivity.

12.6 Keep the ELISA kits at 2-8℃,do not freeze. Seal rest microwell plates, Avoid straight sunlight during all incubations. Covering the microtitor plates is recommended.

12.7 Substrate solution should be abandoned if it turns colors. The reagents may be turn bad if the absorbance value (450/630nm) of the zero standard is less than 0.5(A450nm<0.5).

12.8 The coloration reaction needs 15min after the addition of solution A and solution B. And you can prolong the incubation time from 20min to more if the color is too light to be determined. Never exceed 25min, on the contrary, shorten the incubation time properly.

13. Storage

Storage condition: 2-8℃.

Storage period: 12 months

Creative Diagnostics. All rights reserved
45-16 Ramsey Road Shirley, NY 11967, USA
Tel: 631-624-4882 Fax: 1-631-938-8221
E-mail: info@creative-diagnostics.com
www.creative-diagnostics.com

ภาคผนวก ข

เอกสารชี้แจงข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชื่อโครงการวิจัย **การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนส่วนเกินในอุจจาระของอาสาสมัครที่ได้รับยาทางหลอดเลือด และผลลัพธ์ในการปกป้องจุลชีพประจำถิ่น (ขั้นตอนที่ 1)**

ผู้สนับสนุนการวิจัย ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ พญ.ปัทมา ต.วรพานิช

ที่อยู่ที่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-256-4587

เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 089-239-3400

ผู้วิจัยร่วม

ชื่อ อ.นพ.วรพจน์ นิลรัตนกุล

ที่อยู่ที่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-256-4587

เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 082-742-0555

ผู้วิจัยร่วม

ชื่อ อ.ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

ที่อยู่ที่ทำงานหรือสถานศึกษาของผู้วิจัย หน่วยแบคทีเรียวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-256-4132

เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 24 ชั่วโมง 086-989-1570

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยในกลุ่มอายุ 18 ปีขึ้นไปที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการวินิจฉัยโดยแพทย์เจ้าของไข้ของท่านได้ชี้แจงร่วมกับท่านแล้วมีความเห็นให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ “เซฟไตรแอกโซน” ทางหลอดเลือดดำอยู่ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้อยู่แล้ว และท่านมีการขับถ่ายอุจจาระได้ตามปกติ สามารถเป็นผู้อนุญาตให้เก็บตัวอย่างอุจจาระได้โดยมิต้องได้รับยาถ่าย/ยาสวน/การล้วงทวารใด ๆ

ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัย ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัย หากท่านมีข้อสงสัยใดเพิ่มเติม กรุณาซักถามจากแพทย์ผู้ทำวิจัย ซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัย ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาสำคัญที่นำไปสู่อัตราตายเป็นลำดับต้นๆของโลก จึงเป็นที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ยาปฏิชีวนะมีบทบาทในการใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย และนำไปสู่ปัญหาสืบเนื่องตามมากล่าวคือ การตั้งถิ่นฐาน และการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา อันเกิดจากผลสืบเนื่องของยาปฏิชีวนะส่วนเกินที่ตกค้างในลำไส้ใหญ่ไปกำจัดแบคทีเรียประจำถิ่นด้วย จนเกิดการเสียสมดุล และเพิ่มการเติบโตของแบคทีเรียดื้อยาขึ้นมาแทน

แนวคิดการใช้ถ่านกัมมันต์ซึ่งเป็นสารดูดซับสารพิษที่เรารู้จักกันดีอย่างแพร่หลาย จึงเกิดขึ้นในต่างประเทศในช่วงยุค 5 ปีที่ผ่านมา และแสดงผลการศึกษาที่น่าสนใจว่าการได้รับถ่านกัมมันต์ร่วมไปกับยาปฏิชีวนะ ช่วยปกป้องแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ได้จริง ให้สมดุลคงอยู่เหมือนกับตอนที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ

จึงเป็นการดีที่ในประเทศไทยควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันแนวคิดนี้ ด้วยการใช้ยาถ่านกัมมันต์ชนิดทั่วไปในการดูดซับยาปฏิชีวนะในหลอดทดลอง ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษา</u>

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เป็นการศึกษาประสิทธิผลของการใช้ยาถ่านกัมมันต์ในการดูดซับยาปฏิชีวนะเซฟไตรแอกโซนในหลอดทดลอง เปรียบเทียบทั้งในการทดลองโดยผสมยาและอุจจาระภายนอก กับการทดลองจากอุจจาระของผู้ป่วยที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำอยู่แล้ว (เช่นเดียวกับท่าน)

จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 5 คน (เป็นอย่างน้อย)

<u>วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย</u>

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์ผู้วิจัย (ท่านได้รับยาฉีดเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำตามความเห็นของแพทย์เจ้าของไข้ของท่านก่อนจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้อยู่แล้ว) แพทย์ผู้ทำการ วิจัยจะขอเก็บอุจจาระปริมาณ 5-10 กรัม (1-2 ช้อนโต๊ะ) เพื่อนำไปทดลองในหลอดทดลอง โดยไม่สามารถระบุถึงตัวท่านได้ในภายหลัง

ไม่มีการบริหารยา/ทำหัตถการอื่นเพิ่มเติม อันเป็นเหตุจากโครงการวิจัยนี้กับท่าน

ระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย ไม่เกิน 60 วัน

<u>ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ท่านไม่มีภาระผูกพันธ์ใดต่อโครงการวิจัย

<u>ความเสี่ยงที่อาจได้รับ</u>

ท่านไม่มีความเสี่ยงใดอันเป็นผลจากการวิจัยในหลอดทดลองนี้

<u>ประโยชน์ที่อาจได้รับ</u>

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อสังคม โดยสามารถพัฒนานวัตกรรมการปกป้องแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ และลดโอกาสการตั้งถิ่นฐานและการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านจุลชีพเป็นเวลานาน อันนำไปสู่การลดระยะเวลาการนอนโรงพยาบาล และลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาแทรกซ้อนในโรงพยาบาลตามมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย</u>

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง

<u>ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย</u>

ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าธรรมเนียมทางการแพทย์ และ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

<u>ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย</u>

ไม่มีค่าตอบแทน แต่ท่านจะได้รับเงินชดเชยค่าเดินทาง/ค่าเสียเวลาเป็นจำนวน 200 บาทต่อวันที่มีการเก็บตัวอย่างอุจจาระ

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน

จากการลงนามยินยอมของท่าน ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ผู้ตรวจสอบการวิจัย และหน่วยงานควบคุมระเบียบกฎหมาย สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม โดยไม่ละเมิดสิทธิของท่านในการรักษาความลับเกินขอบเขตที่กฎหมายและระเบียบกฎหมายอนุญาตไว้

จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ของท่านให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

การยกเลิกการให้ความยินยอม

หากท่านต้องการยกเลิกการให้ความยินยอมดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ พญ.ปัทมา ต.วรพานิช หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ ชั้น 5 โซนซี (C) 1873 ถ.พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวและตัวอย่างอุจจาระของท่านจะไม่ถูกเก็บเพิ่มเติมอีก

CHULALONGKORN UNIVERSITY

การจัดการกับตัวอย่างอุจจาระที่เหลือ

ตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากท่าน ผู้วิจัยอาจจะจัดการ ดังต่อไปนี้

1. ขอเก็บตัวอย่างอุจจาระที่เหลือไว้ที่หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่องานวิจัยในอนาคตเป็นระยะเวลาไม่เกิน 20 ปี โดยไม่สามารถระบุถึงตัวท่านได้ และผู้วิจัยจะยื่นโครงการวิจัยให้คณะกรรมการการจริยธรรมการวิจัยพิจารณาให้การรับรองทุกครั้ง หากมีการใช้ตัวอย่างอุจจาระเพื่องานวิจัยในอนาคต
2. ทำลายทิ้งด้วยวิธีมาตรฐาน

<u>สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ในการวิจัยนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
5. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
6. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย และสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
7. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์/โทรสาร 0-2256-4493 ในเวลาราชการ หรือ e-mail : medchulairb@chula.ac.th

การลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ขอขอบคุณในการให้ความร่วมมือของท่านมา ณ ที่ นี้

.....

ภาคผนวก ค

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

	คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการสำหรับอาสาสมัคร	AF 09-05/5.0 หน้า 1/2

การวิจัยเรื่อง การศึกษาประสิทธิผลของยาถ่านกัมมันต์ ในการดูดซับยาเซฟไตรแอกโซนส่วนเกินในอุจจาระของอาสาสมัครที่ได้รับยาทางหลอดเลือด และผลลัพธ์ในการปกป้องจุลชีพประจำถิ่น (ขั้นตอนที่ 1)

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

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่ .....

ข้าพเจ้า ☐ เป็นบุคคลทั่วไป ☐ เป็นผู้ป่วยที่ได้รับยาเซฟไตรแอกโซนทางหลอดเลือดดำอยู่ก่อนหน้างานวิจัยนี้ ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย และวิธีการวิจัย อย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัย และต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การจัดการกับตัวอย่างอุจจาระ

☐ ไม่มีตัวอย่างชีวภาพ

☐ มีแต่ไม่มีการขอเก็บ

■ มีและขอเก็บตัวอย่างอุจจาระที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า ☐ ยินยอม

☐ ไม่ยินยอม

ให้เก็บตัวอย่างอุจจาระที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต แต่จะไม่สามารถระบุตัวอย่างถึงตัวข้าพเจ้าได้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(พญ.ปัทมา ต.วรพานิช) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง

สำเนาวุฒิบัตรแสดงการผ่านฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ และ สอบผ่านหลักสูตร แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพของผู้วิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ศูนย์ความปลอดภัย อาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ร่วมกับ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอมอบวุฒิบัตรฉบับนี้ เพื่อแสดงว่า

ปัทมา ต.วรพานิช

ได้เข้ารับการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการและสอบผ่านหลักสูตร
แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ
ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ให้ไว้ ณ วันที่ 4 มกราคม 2562 วันหมดอายุ วันที่ 3 มกราคม 2565

ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วีไลวัลย์
ผู้อำนวยการ
ศูนย์ความปลอดภัย อาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์ ดร.พิลกฤษณ์ แสงวณิช
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
ประธานคณะกรรมการพัฒนาหลักสูตรฯ
หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์

62220020

CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

1. Hsu, L.Y., et al., *Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii and Enterobacteriaceae in South and Southeast Asia.* Clin Microbiol Rev, 2017. 30(1): p. 1-22.
2. Bonten, M.J. and R.A. Weinstein, *The role of colonization in the pathogenesis of nosocomial infections.* Infect Control Hosp Epidemiol, 1996. 17(3): p. 193-200.
3. Tischendorf, J., R.A. de Avila, and N. Safdar, *Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobactericeae: A systematic review.* Am J Infect Control, 2016. 44(5): p. 539-43.
4. Bartlett, J.G., *Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea.* N Engl J Med, 2002. 346(5): p. 334-9.
5. Khanna, S., et al., *A Novel Microbiome Therapeutic Increases Gut Microbial Diversity and Prevents Recurrent Clostridium difficile Infection.* J Infect Dis, 2016. 214(2): p. 173-81.
6. Millan, B., et al., *Fecal Microbial Transplants Reduce Antibiotic-resistant Genes in Patients With Recurrent Clostridium difficile Infection.* Clinical Infectious Diseases, 2016. 62(12): p. 1479-1486.
7. Kokai-Kun, J.F., J.L. Sarver, and R.J. Carman, *Characterization of Clostridium difficile isolates collected during a phase 2b clinical study with SYN-004 (ribaxamase) for the prevention of C. difficile infection.* Anaerobe, 2018. 53: p. 30-33.
8. Murray, P.R. and H. Masur, *Current approaches to the diagnosis of bacterial and fungal bloodstream infections in the intensive care unit.* Crit Care Med, 2012. 40(12): p. 3277-82.
9. Vandenbogaerde, J. and F. Colardyn, *Untractable fecalith's and hypercalcemia, both associated with Fuller's earth therapy in fatal case of paraquat poisoning.* J Toxicol Clin Toxicol, 1982. 19(9): p. 1011-2.
10. Bennett, A. and G. Stryjewski, *Severe hypokalemia caused by oral and rectal administration of bentonite in a pediatric patient.* Pediatr Emerg Care, 2006.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

22(7): p. 500-2.

11. Ahmed, M.J., *Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: Review.* Environ Toxicol Pharmacol, 2017. 50: p. 1-10.
12. Grall, N., et al., *Oral DAV*131*, a charcoal-based adsorbent, inhibits intestinal colonization by beta-lactam-resistant Klebsiella pneumoniae in cefotaxime-treated mice.* Antimicrob Agents Chemother, 2013. 57(11): p. 5423-5.
13. de Gunzburg, J., et al., *Protection of the Human Gut Microbiome From Antibiotics.* J Infect Dis, 2018. 217(4): p. 628-636.
14. Park, S., et al., *Clinical Effects of Activated Charcoal Unavailability on Treatment Outcomes for Oral Drug Poisoned Patients.* Emergency Medicine International, 2018. 2018: p. 4642127.
15. Brautigam, H.H., H. Knothe, and R. Rangoonwala, *Impact of cefotaxime and ceftriaxone on the bowel and vaginal flora after single-dose prophylaxis in vaginal hysterectomy.* Drugs, 1988. 35 **Suppl** 2: p. 163-8.
16. Karachalios, G. and K. Charalabopoulos, *Biliary excretion of antimicrobial drugs.* Chemotherapy, 2002. 48(6): p. 280-97.
17. Meijer, B.C., et al., *Effects of ceftriaxone on faecal flora: analysis by micromorphometry.* Epidemiol Infect, 1991. 106(3): p. 513-21.
18. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, in *CLSI supplement M*100. 2020: Wayne, PA.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Pattama Torvorapanit
วัน เดือน ปี เกิด	28 May 1986
สถานที่เกิด	Saraburi
วุฒิการศึกษา	Chulalongkorn University
ที่อยู่ปัจจุบัน	222/70 ศุภาลัยเอลีท สุรวงศ์ ถ.นเรศ แขวงสี่พระยา เขตบางรัก กรุงเทพฯ 10500
ผลงานตีพิมพ์	1. Navaporn Worasilchai, Ariya Chindamporn, Rongpong Plongla, Pattama Torvorapanit, Kasama Manothummetha, Nipat Chuleerarux, Nitipong Permpalung. In Vitro Susceptibility of Thai Pythium insidiosum Isolates to Antibacterial Agents, Antimicrobe Agents Chemother, 2020 Mar 24;64(4). pii: e02099-19. 2. ปัทมา ต.วรพานิช, วรพจน์ นิลรัตนกุล. Nosocomial Diarrhea: What Do We Look for ? , Chula ID Book Series, บริษัท ปริ้นท์แอนด์มอร์ จำกัด, 2563:170-213. 3. Permpalung N, Worasilchai N, Manothummetha K, Torvorapanit P, Ratanawongphaibul K, Chuleerarux N, Plongla R, Chindamporn A. Clinical outcomes in ocular pythiosis patients treated with a combination therapy protocol in Thailand: A prospective study, Medical mycology, 2019 Nov 1;57(8):923-928. 4. Susaengrat N, Torvorapanit P, Plongla R, Chuleerarux N, Manothummetha K, Tuangsirisup J, Worasilchai N, Chindamporn A, Permpalung N. Adjunctive antibacterial agents as a salvage therapy in relapsed vascular pythiosis patients, International Journal of Infectious Diseases, 2019 Nov;88:27-30. 5. ปัทมา ต.วรพานิช, วรพจน์ นิลรัตนกุล. Respiratory tract Viral Infection, Chula ID Book Series, บริษัท ปริ้นท์แอนด์มอร์ จำกัด, 2562:95-135. 6. Permpalung N, Pitisuttihum P, Torvorapanit P, Kitithamvong P,

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Thisyakorn U. Systematic review: Initial fluid resuscitation for children with dengue shock syndrome, Asian Biomed, 2009 Dec 3(6):579-588.

รางวัลที่ได้รับ

1. Outstanding 2nd year Medical Student Award 2005, Department of Student Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
2. Highest Distinction (Academic Merit) 2006, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
3. Highest Distinction (Academic Merit) 2007, Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY