บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ศึกษาแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์ เพื่อประเมิน ฤทธิ์ยาไทกิซัยคลินต่อเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม การศึกษาครั้งนี้ ใช้ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม จากตัวอย่างเชื้อของผู้ป่วยโรงพยาบาลศิริราช

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การวางแผนและเตรียมการก่อนดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 2 สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการวิจัย

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ข้อมูล และอภิปรายผลการวิจัย

ขั้นตอนที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ขั้นตอนที่ 1 การวางแผนและเตรียมการก่อนการวิจัย

1. ศึกษาข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์ของยาไทกิซัยคลิน

2. ศึกษาข้อมูลการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์โดยอาศัยกราฟการฆ่าเชื้อ

3. สำรวจข้อมูลเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยใน โรงพยาบาลศิริราช

4. กำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม เข้าสู่งานวิจัยตามเกณฑ์ต่อไปนี้

<u>เกณฑ์การคัดเชื้อเข้าสู่งานวิจัย</u>

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งให้ผลของการทำ disc diffusion test ต่อยาไทกิซัยคลินเป็น S (susceptible)

<u>เกณฑ์คัดเชื้อออกจากงานวิจัย</u>

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งให้ผลของการทำ disc diffusion test ต่อยาไทกิซัยคลิน เป็น I (intermediate) และ R (resistant)

5. จำนวนตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม เพื่อนำมาใช้คัดเลือก

กำหนดให้ใช้ตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม จำนวน 3 สายพันธุ์ (isolate) จากสิ่งส่งตรวจ 3 ชนิด ได้แก่ อุจจาระ ปัสสาวะ และไม้ป้ายจากทวารหนัก (rectal swab) จากผู้ป่วยในที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศิริราช

178663146

6. จัดเตรียมแบบบันทึกที่ใช้ในงานวิจัย
   - แบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาคผนวก ก
   - แบบบันทึกข้อมูลจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาคผนวก ข
7. เสนอโครงร่างการวิจัยผ่านคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

ขั้นตอนที่ 2 สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการวิจัย

สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ

ก. สารเคมี

1. ผงยาไทกิซัยคลิน (Tigecycline powder)
   (Pfizer Inc, USA)
2. แผ่นยาไทกิซัยคลิน ขนาด 15 มคก. (Tigecycline disc)
   (BD, USA)
3. นอร์มัลซาไลน์ (Sterile saline solution 0.9%)
   (Pharma Innova, Thailand)
4. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile water for injection)
   (Pharma Innova, Thailand)
5. Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth
   (Fluka, Switzerland)
6. Mueller-Hinton agar
   (Oxoid Ltd, England)

ข. อุปกรณ์ เครื่องมือ

1. เครื่องวัดสี (Vitek colorimeter)
   (BioMerieux Vitek Inc., USA)
2. ถาดหลุมเลี้ยงเชื้อขนาด 24 หลุม (Tissue culture plate 24 well)
   (Corning Incorporated, USA)
3. ถาดหลุมเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุม (Tissue culture plate 96 well)
   (Corning Incorporated, USA)

1786632146

4. จานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อขนาด 10 เซนติเมตร (Sterile petri dish)
   (Greiner Bio One, Germany)
5. ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab)
   (Thai gauze, Thailand)
6. ขวดเลี้ยงเชื้อ (Tissue culture flask)
   (Corning Incorporated, USA)
7. ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autometic pipette)
   (Axygen, Poland)
8. ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดหลายช่อง (Multichannel automatic pipette)
   (Axygen8, Poland)
9. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
   (Zx^3 Velp® Scientifica, Europe)
10. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical balance)
    (รุ่น XR205SM-DR, Precisa Gravimetrics AG, Switzerland
11. เครื่องชั่งดิจิตอล (Satorius)
    (รุ่น Gottingen 2355, GMBH, Germany)
12. เครื่องแก้ว (Glassware)
    (Pyrex, USA)
13. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
    (รุ่น ULE 700, Oven memmert, Germany)
14. หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave)
    (รุ่น HVE-50, Hirayama manufacturing corp., Japan)
15. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)
    (รุ่น NU-440SPEC, Nuaire™ biological safety cabinets Class II, USA)
16. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Constant temperature incubator shaker)
    (รุ่น 211C, Optic Ivymen® system, Spain)
17. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
    (รุ่น 100-800, Memmert, Germany)

178632146

18. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Colony counter)

(รุ่น 570, Suntex colony counter, Taiwan)

19. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิติดลบ (Freezer)

(รุ่น A700-87C, Froilabo®, France)

วิธีการวิจัย

ก. การศึกษากราฟการฆ่าเชื้อกับเวลา

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

1.1 ชั่งผง Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth จำนวน 22 กรัม

1.2 เติมน้ำกลั่นเพื่อละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

2.1 ชั่งผง Mueller-Hinton Broth Agar จำนวน 38 กรัม

2.2 เติมน้ำกลั่นเพื่อละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.4 นำอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 20 มิลลิลิตร เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหนา 4 มิลลิเมตร ปิดฝา รอจนอาหารแข็งตัว คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้แล้วนำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนก่อนนำไปใช้งาน

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลชีพ

3.1 นำ stock culture ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งคัดแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ 3 ชนิด ได้แก่ อุจจาระ ปัสสาวะและไม้ป้ายจากทวารหนัก (rectal swab) ออกจากตู้แช่แข็ง

3.2 นำ Loop เผาไฟให้ร้อนแดงแล้วรอให้เย็น

3.3 ใช้ Loop แตะ stock culture มาขีดถี่ ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งบริเวณที่ 1 เพื่อกระจายเชื้อตั้งต้น

178632146

3.4 ใช้ Loop นำเชื้อจากบริเวณที่ 1 ไปยังบริเวณที่ 2 โดยลดความถี่ในการขีดเชื้อลงเล็กน้อย

3.5 ใช้ Loop นำเชื้อจากบริเวณที่ 2 ไปยังบริเวณที่ 3 โดยลดความถี่ในการขีดเชื้อลงอีก

3.6 ใช้ Loop นำเชื้อจากบริเวณที่ 3 ไปยังบริเวณที่ 4 โดยขีดเชื้อไม่ให้มีการทับกันของรอยขีดเชื้อ เพื่อให้สามารถแยกโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony) ของเชื้อจุลชีพ

3.7 ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้แล้วนำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion

4.1 เตรียมสารละลายเชื้อด้วยวิธี Direct colony suspension โดยนำโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ได้จากข้อ 3.6 มาใส่ลงในหลอดแก้วที่บรรจุสารละลาย sterile saline solution 0.9% ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard เทียบเท่ากับเชื้อจำนวน $1.5x10^8$ CFU/ml

4.2 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile swab) จุ่มลงในสารละลายเชื้อ (ในข้อ 4.1) หมุนไม้พันสำลีหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้เชื้อซึมเข้าให้ทั่ว นำไม้พันสำลีมาแตะกับผิวด้านในของหลอดแก้ว แล้วหมุนไม้พันสำลีเพื่อให้เปียกพอหมาด ๆ นำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเป็น 3 ระนาบ ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วป้ายรอบขอบด้านในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

4.3 ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง (ภายใน 15 นาที) ใช้ปากคีบ (forceps) ปราศจาก เชื้อ (โดยลนกับเปลวไฟแล้วปล่อยให้เย็น) คีบแผ่นยาไทกิซัยคลินมาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ กดเบา ๆ ให้แผ่นยาไทกิซัยคลินติดกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.4 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสทันที หรือภายใน 15 นาที โดยวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อคว่ำลง บ่มเชื้อนาน 16-18 ชั่วโมง

4.5 อ่านและแปลผลการทดสอบ โดยนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มเชื้อครบตามกำหนดเวลาแล้ว มาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น ถ้าเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด ≥ 19, 15-18 และ ≤ 14 มม.ให้แปลผลเป็น S (susceptible), I (intermediate) และ R (resistant) ตามลำดับ พร้อมบันทึกในแบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

1786632146

5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC)

นำเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งให้ผลการทำ disc diffusion test ต่อยาไทกิซัยคลินเป็น S (susceptible) จำนวน 3 สายพันธุ์ (จากข้อ 4.5) มาหาค่า MIC ด้วยวิธี two fold serial dilution (ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้งและทำร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน คือ *E. coli* ATCC 25922 เพื่อควบคุมคุณภาพการหาค่า MIC) พร้อมบันทึกลงใน แบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย ภาคผนวก ก

5.1 เตรียมสารละลายเชื้อให้มีเชื้อจำนวน $5x10^5$ CFU/mL โดยนำสารละลายในข้อ 4.1 จำนวน 100 ไมโครลิตร (มคล.) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจำนวน 30 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย

5.2 เตรียมสารละลายไทกิซัยคลินความเข้มข้น 32 มคก./มล.ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยปิเปตต์สารละลายไทกิซัยคลิน ความเข้มข้น 1,000 มคก./มล. จำนวน 160 มคล ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจำนวน 4,840 มคล. แล้วผสมให้กันด้วยเครื่องผสมสารละลาย

5.3 แบ่งถาดหลุมเลี้ยงเชื้อขนาด 24 หลุม เป็น 2 ส่วนๆ ละ 12 หลุม

5.4 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจำนวน 1 มล. ลงในหลุมที่ 2 – หลุมที่ 11 และ 2 มล. ลงในหลุมที่ 12

5.5 เติมสารละลายในข้อ 5.2 จำนวน 2 มล. ลงในหลุมที่ 1

5.6 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายในหลุมที่ 1 จำนวน 1,000 มคล. ใส่ลงในหลุมที่ 2 แล้วผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยดูด-ปล่อย สารละลายลงในหลุม 5 ครั้ง

5.7 ทำซ้ำในข้อ 5.6 ไปจนถึงหลุมที่ 10 เมื่อผสมสารละลายดีแล้ว ให้ดูดสารละลายในหลุมที่ 10 จำนวน 1,000 มคล. ทิ้งไป

5.8 เติมสารละลายในข้อ 5.1 ลงในหลุมที่ 1- หลุมที่ 11 จะได้สารละลายความเข้มข้นดังนี้ หลุมแรกมีความเข้มข้น 16 มคก./มล. หลุมถัดไปมีความเข้มข้น 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 มคก./มล. ตามลำดับ ชุดควบคุมผลบวก (positive control) คือ หลุมที่ 11 ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียและไม่มีสารละลายไทกิซัยคลิน ชุดควบคุมผลลบ (negative control) คือ หลุมที่ 12 ซึ่งไม่มีเชื้อแบคทีเรียและไม่มีสารละลายไทกิซัยคลิน

5.9 ปิดฝาครอบถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ เขย่าเบาๆอีกครั้ง และนำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

5.10 อ่านและแปลผล โดยตรวจสอบการเกิดความขุ่นของเชื้อทดสอบในจานเพาะเชื้อด้วยตา เปล่าเทียบกับชุดควบคุม ค่า MIC คือ หลุมแรกของค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารละลายไทกิซัยคลินที่ไม่เกิด ความขุ่นขึ้นเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด พร้อมบันทึกในแบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

1786632146

6. การหากราฟการฆ่าเชื้อกับเวลา (Time-kill curve)

ใช้เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมที่มีค่า MIC สูงสุด (ไม่เกิน 2 มคก./มล.) มาทำการศึกษาหากราฟการฆ่าเชื้อกับเวลา

6.1 เตรียมสารละลายเชื้อให้มีจำนวนเชื้อ 1.5×10^8 ดังวิธีในข้อ 4.1

6.2 บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวลงในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวน 10 ขวดๆ ละ 30 มล.

6.3 เติมสารละลายเชื้อในข้อ 6.1 จำนวน 100 มคล. ลงในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 6.2 เพื่อให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 5×10^5 CFU/ml และนำไปบ่มเพาะในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า นาน 2 ชั่วโมง

6.3 เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มเพาะเชื้อให้เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 20 มคล. และเริ่มต้นนับเวลาเป็นชั่วโมงที่ 0

6.4 เติมสารละลายไทกิซัยคลิน 9 ความเข้มข้นตามที่กำหนดลงในแต่ละขวด โดยกำหนดความเข้มข้นของยาเป็นจำนวนเท่าของ MIC เพื่อให้ครอบคลุมฤทธิ์การยับยั้งเชื้อต่ำสุด (minimum inhibition) ได้แก่ 0.25 x MIC, 0.5 x MIC, 1 x MIC ฤทธิ์ที่มีประสิทธิผลต่อการฆ่าเชื้อ (efficient bacterial killing) ได้แก่ 2 x MIC, 4 x MIC และฤทธิ์การฆ่าเชื้อสูงสุด (maximum bacterial killing) ได้แก่ 8 x MIC,16 x MIC, 32 x MIC, 64 X MIC ให้ขวดที่ 10 เป็นชุดควบคุม 1 ขวด (ไม่เติมสารละลายไทกิซัยคลิน)

6.5 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 20 มคล.ที่เวลา 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

6.6 ทำการศึกษาหากราฟการฆ่าเชื้อกับเวลา (ข้อ 6.1 ถึง 6.5) จำนวน 3 ครั้ง

7. การนับจำนวนเชื้อ

7.1 เตรียมถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ ขนาด 96 หลุม เขียนหมายเลขกำกับไว้ที่ถาดให้แนวตั้ง คือ ลำดับ dilution ของสารละลาย และแนวนอน คือ ลำดับของความเข้มข้นของสารละลายไทกิซัยคลิน

7.2 เติม sterile normal saline 0.9% จำนวน 180 มคล. ลงในแต่ละหลุม

7.3 เติมตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 20 มคล. ลงในหลุมแรก (dilution ที่ 1) ของทุกความเข้มข้น

7.4 เจือจางตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่าตามลำดับ (serial 10-fold dilution) โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดหลายช่อง ดูดสารละลายหลุมละ 20 มคล. ใส่ลงในหลุมถัดไป (dilution ที่ 2) ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยดูด-ปล่อยสารละลายลงในหลุม 5 ครั้ง

1786632146

7.5 ทำซ้ำในข้อ 7.4 จนถึง หลุมที่ 8 (dilution ที่ 8) แล้วดูดสารละลายในหลุมที่ 8 จำนวน 20 มคล. ทิ้งไป

7.6 แบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเป็น 4 ส่วน เท่าๆ กัน หยดสารละลายในข้อ 7.4-7.5 ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละส่วน จำนวน 5 หยด หยดละ 10 µL ปิดฝาและรอให้แห้ง คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง โดยหยดสารละลายแต่ละหลุมจำนวน 2 ครั้ง

7.7 นับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับโคโลนี และบันทึกลงในแบบบันทึกจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ณ เวลาใด ๆ (ภาคผนวก ข)

7.8 สร้างกราฟการฆ่าเชื้อ ณ เวลาใด ๆ โดยนำจำนวนเชื้อ เวลาและความเข้มข้นของยาไทกิซัยคลินมาพล็อตกราฟการฆ่าเชื้อ

ข. การสร้างแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์

1. การวิเคราะห์หาแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์ของไทกิซัยคลิน

ข้อมูลของกราฟการฆ่าเชื้อที่ได้จากการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบสอดคล้องกับสมการแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์ โดยใช้โปรแกรม Scientist® (Micromath, Salt Lake City, UT, USA) สำหรับรูปแบบสมการที่นำมาวิเคราะห์ประกอบด้วยรูปแบบของสมการที่พัฒนาสร้างขึ้นจำนวน 16 รูปแบบ ดังนี้

สมการที่ 1 เป็นรูปแบบสมการพื้นฐานที่พัฒนามาจากสมการ E_{max} model

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \right] \cdot N \qquad \text{สมการที่1}$$

โดยที่ dN/dt คือ จำนวนเชื้อที่เปลี่ยนแปลงในรูปฟังก์ชันของเวลา k_0 คือ อัตราคงที่ของการเจริญเติบโตของเชื้อขณะที่ไม่มียา k_{max} คือ อัตราคงที่ของการฆ่าเชื้อสูงสุด C คือ ความเข้มข้นของยา EC_{50} คือ ความเข้มข้นของยาที่ให้ผลฆ่าเชื้อร้อยละ 50 และ N คือจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

กรณีมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เช่น ระยะเพิ่มจำนวน (log growth phase, $1-e^{-zt}$) สมการที่1 ถูกพัฒนาเปลี่ยนให้เป็น 2 รูปแบบคือสมการที่ 2, 3 และ 4

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \right] \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \cdot N \qquad \text{สมการที่ 2}$$

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 3

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 4

กรณีการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อและพื้นที่ในการเจริญเติบโตถูกจำกัด สมการที่ 1 จะมีปัจจัยจำนวนเชื้อสูงสุด (N_{max}) มาเกี่ยวข้อง ทำให้เกิดรูปแบบสมการที่ 5

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 5

เมื่อนำจำนวนเชื้อสูงสุด (N_{max}) มาพิจารณาร่วมกับระยะเพิ่มจำนวน (z) ในสมการที่ 2-4 ทำให้เกิดรูปแบบสมการที่ 6-8

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \right] \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \cdot N$$ สมการที่ 6

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 7

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 8

นอกจากนี้ ค่า hill factor (h) อาจนำมาพิจารณาเพื่อปรับความชันของ concentration effect ในสมการที่ 1-8 ทำให้เกิดรูปแบบสมการที่ 9-16

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 9

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \right] \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \cdot N$$ สมการที่ 10

178632146

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 11

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 12

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 13

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \right] \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \cdot N$$ สมการที่ 14

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 15

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) - \left(\frac{k_{max} \cdot C^h}{EC_{50}^h + C^h} \right) \cdot \left(1 - e^{-zt}\right) \right] \cdot N$$ สมการที่ 16

รูปแบบสมการที่ 1-16 ถูกนำมาประเมินหารูปแบบสมการที่เหมาะสมกับข้อมูล โดยใช้เกณฑ์การประเมินสมการแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์

การวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชพลศาสตร์จากสมการทางคณิตศาสตร์ มีขั้นตอนดังนี้

1) การวิเคราะห์หาอัตราคงที่ของการเจริญเติบโตของเชื้อขณะที่ไม่มียา (k_0)

การวิเคราะห์หาค่า k_0 ใช้ข้อมูลเชื้อจากชุดควบคุม อธิบายได้ดังนี้ เมื่อไม่เติมสารละลายไทกิซัยคลิน เชื้อ *K. pneumoniae* สามารถเจริญได้อย่างอิสระ และไม่มีอัตราการฆ่าเชื้อสูงสุด ดังนั้นพจน์ $(k_{max} \times C)/(EC_{50}+C)$ จึงมีค่าเป็นศูนย์ ทำให้สมการลดรูปเป็น $dN/dt = k_0 \times N$

2) การวิเคราะห์หาอัตราคงที่ของการฆ่าเชื้อสูงสุด (k_{max})

การหาค่า k_{max} ใช้ข้อมูลเชื้อจากความเข้มข้นไทกิซัยคลินที่ให้ฤทธิ์การฆ่าเชื้อสูงสุด อธิบายได้ดังนี้ ณ ความเข้มข้นไทกิซัยคลินที่ให้ฤทธิ์การฆ่าเชื้อสูงสุด ค่าความเข้มข้นของยา (C) มีค่าสูงกว่า EC_{50} มาก ทำให้สมการลดรูปเป็น $dN/dt = (k_0 - k_{max}) \times N$

1786632146

3) การวิเคราะห์หาสมการแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์

การวิเคราะห์หาสมการแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์ใช้ข้อมูลของกราฟการฆ่าเชื้อทุกชุดข้อมูลรวมถึงข้อมูลชุดควบคุม อธิบายได้ดังนี้ นำค่า k_0 และ k_{max} ที่ได้จากข้อ 1 และ 2 มาเป็นค่าเริ่มต้นสำหรับการหาค่า EC_{50}, N_{max}, z และ h

2. เกณฑ์การประเมินสมการแบบจำลองเภสัชจลนศาสตร์/เภสัชพลศาสตร์

ใช้เกณฑ์ประเมินความสอดคล้องพอดี (Goodness of fit) ซึ่งพิจารณารูปกราฟที่สร้างขึ้นจากแบบจำลองซึ่งสอดคล้อง (fit) กับข้อมูล และค่าสถิติที่ได้จากโปรแกรม Scientist® ได้แก่ ค่า model selection criteria (MSC) ค่า Coefficient of determination (r^2) และค่า correlation ระหว่างค่าคำนวณจากแบบจำลองกับค่าจริง

ค่า MSC คำนวณได้จากสูตรด้านล่าง ซึ่งปรับเปลี่ยนมาจาก Akaike information criterion (AIC) โดยการเพิ่มขึ้นของค่า MSC ชี้ให้เห็นความเหมาะสมของแบบจำลองซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลมากขึ้น

$$MSC = \ln\left(\frac{\sum_{i=1}^{n} w_i\left(Y_{obs_i} - \overline{Y}_{obs_i}\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} w_i\left(Y_{obs_i} - Y_{cal_i}\right)^2}\right) - \frac{2p}{n}$$

เมื่อ p = number of parameters, n = number of points, w = weight applied to each point, Y_{obs}: observed data, $\overline{Y}_{obs}$ = weighted mean of observed data, Y_{cal} = calculated data

3. สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย

1786632146