

ความไวต่อยาต้านเชื้อราของเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนที่ทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชันและ  
ผลการรักษา

นางสาวนนทลี ทองสง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

Antifungal Susceptibilities Using Broth Microdilution of *Cryptococcus Neoformans* and  
Clinical Outcome

Miss Nontalee Thongsong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University



นนทลี ทองสง : ความไวต่อยาต้านเชื้อราของเชื้อคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนที่ทดสอบด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชันและผลการรักษา. (ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES USING BROTH MICRODILUTION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AND CLINICAL OUTCOME) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. นพ. วันล่ำ กุลวิจิต, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. อริยา จินตามพร, 55 หน้า.

ที่มา เชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน ที่ก่อให้เกิดภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง ยาที่ใช้ในการรักษาของไทยประกอบด้วยยาแอมโฟเทอริซิน บี และยาฟลูโคนาโซล โดยข้อมูลเกี่ยวกับความไวของเชื้อราต่อยายังมีน้อยมาก เนื่องจากการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อรายังไม่แพร่หลาย การศึกษานี้มุ่งทดสอบความไวของเชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนต่อยาแอมโฟเทอริซิน บี และยาฟลูโคนาโซล และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความไวต่อยาต้านเชื้อรากับผลของการรักษาที่ 10 สัปดาห์

วิธีการศึกษา นำเชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน ที่เพาะเชื้อขึ้นจากผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 มาทำการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อราแอมโฟเทอริซิน บี และยาฟลูโคนาโซลด้วยวิธีบรอท ไมโครไดลูชัน และเก็บข้อมูลทั่วไป ประวัติการเจ็บป่วย ยาที่ใช้รักษา ผลการเพาะเชื้อซ้ำที่ 2 สัปดาห์ รวมถึงผลของการรักษาที่ 10 สัปดาห์

ผลการศึกษา เชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนทำการทดสอบความไวทั้งหมด 21 เชื้อ เชื้อราทั้งหมดมีค่า MIC ต่อ fluconazole อยู่ที่ 8 microgram/ml. และมีค่า MIC ต่อ amphotericin B อยู่ที่ 0.5-1 microgram/ml. โดยมีอัตราการเสียชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 33.3

สรุปผลการศึกษา เชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนทั้งหมดมีความไวต่อยา fluconazole และ amphotericin B โดยไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างการค่า MIC กับผลของการรักษาที่ 10 สัปดาห์ได้

ภาควิชา ..... อายุรศาสตร์ ..... ลายมือชื่อนิติ.....  
สาขาวิชา ..... อายุรศาสตร์ ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ปีการศึกษา ..... 2554 ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5374639030 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS : AMPHOTERICIN B / CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS / FLUCONAZOLE / SUSCEPTIBILITY

NONTALEE THONGSONG : ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES USING BROTH MICRODILUTION OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AND CLINICAL OUTCOME. ADVISOR : ASSOC. PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D. 55 pp.

**Background** *Cryptococcus neoformans* is a fungus caused wide spectrum of diseases including meningitis. Cryptococcal meningitis has high mortality rate. In Thailand, key drugs for treatment of cryptococcal meningitis are amphotericin B and fluconazole. Antifungal susceptibility testing is not widely used in Thailand. This study mainly test antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and fluconazole.

**Methods** Subcultured *Cryptococcus neoformans* that was kept in refrigerator during 2010-2011. Incubated into microplate that contained RPMI 1640 medium and antifungal agent using broth microdilution technique. Recorded MIC of *Cryptococcus neoformans* and clinical data including outcome of treatment at 10 weeks after diagnosis.

**Results** 21 *Cryptococcus neoformans* were tested for antifungal susceptibilities using broth microdilution. The MIC values of all *C. neoformans* isolates for fluconazole were 8 microgram/ml. The MIC values of *C. neoformans* for amphotericin B ranged from 0.5-1 microgram/ml. The 10-week mortality rate was 33.3 percent.

**Conclusions** All *C. neoformans* isolates were susceptible to fluconazole and amphotericin B. We cannot identify the relationships between the MIC values and the mortality rate.

Department:.....Medicine..... Student's Signature.....

Field of Study:.....Medicine..... Advisor's Signature.....

Academic Year:.....2011..... Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

สาขาวิชาโรคติดต่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. รศ. นพ. วันลา กุลวิจิต

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

สาขาวิชาเชื้อรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. รศ. ดร. อริยา จินดามพร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

2. นพ. อาสา ธรรมหงส์

ผู้ทำการตรวจความไวต่อยาต้านเชื้อรา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.4 สมมติฐาน.....	3
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
1.6 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	5
1.7 ปัญหาทางจริยธรรม.....	6
1.8 ขอบเขตการวิจัย.....	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 รูปแบบการวิจัย.....	17
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	17
3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย.....	18
3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	20
3.5 การดำเนินการวิจัย.....	21

	หน้า
3.6 การรวบรวมข้อมูล.....	22
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	23
บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	35
รายการอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	46
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	56



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ค่า MIC ของยาต้านเชื้อรา Fluconazole.....	12
ตารางที่ 2.2 ค่า MIC ต่อยาต้านเชื้อรา Amphotericin B.....	13
ตารางที่ 2.3 ค่า epidemiologic cut off value ของยา fluconazole.....	15
ตารางที่ 4.1 ชนิดของสิ่งส่งตรวจ.....	25
ตารางที่ 4.2 ลักษณะพื้นฐานทางคลินิกของผู้ป่วย.....	26
ตารางที่ 4.3 โรคประจำตัวของผู้ป่วยติดเชื้อ <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	27
ตารางที่ 4.4 ความถี่ของเชื้อราที่ค่า MIC ต่อยาค้านเชื้อราระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	28
ตารางที่ 4.5 ค่า Minimal inhibitory concentration (MIC, microgram/ml.) ของเชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนต่อยาต้านเชื้อรา.....	28
ตารางที่ 4.6 รายละเอียดของการติดเชื้อของผู้ป่วยและผลการรักษา.....	29

## สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 1.1 กรอบความคิดในการวิจัย.....	4
แผนภูมิที่ 1.2 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	5
แผนภูมิที่ 4.1 เชื้อรา <i>Cryptococcus neoformans</i> ที่เข้าการวิจัย .....	24

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 เชื้อรา <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	7
ภาพที่ 2.2 อัตราการเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อรา <i>Cryptococcus neoformans</i> ในผู้ป่วย HIV infection.....	8
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของยา Fluconazole.....	9
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของยา Amphotericin B.....	10
ภาพที่ 2.5 ตัวอย่าง Microdilution plate สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อ ยาต้านเชื้อราด้วยวิธี Broth microdilution.....	10
ภาพที่ 4.1 อายุของผู้ป่วยติดเชื้อรา <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	25
ภาพที่ 4.2 การเสียชีวิตของผู้ป่วยจากเชื้อรา <i>Cryptococcus neoformans</i> เปรียบเทียบ ระหว่างผู้ติดเชื้อ HIV infection และผู้ไม่ติดเชื้อ HIV infection.....	34

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AmB	Amphotericin B
cfu.	Colony forming unit
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CML	Chronic myeloid leukemia
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CRAG	Cryptococcal antigen
CSF	Cerebrospinal fluid
Fluc.	Fluconazole
GM	Geometric mean
HIV	Human immunodeficiency virus
IRIS	Immune reconstitution inflammatory syndrome
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
mcg.	Microgram
MDS	Myelodysplastic syndrome
MIC	Minimal inhibitory concentration
ml.	Milliliter
PCP	Pneumocystis pneumonia
RPMI 1640	Roswell Park memorial institute 1640
SLE	Systemic lupus erythematosus
TB	Tuberculosis

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมน (*Cryptococcus neoformans*) เป็นเชื้อราที่สามารถก่อโรคได้ในประชากรหลากหลายประเภท ตั้งแต่ผู้ที่ภูมิคุ้มกันปกติไม่มีโรคประจำตัวใดๆจนถึงผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องรวมทั้งผู้ป่วย HIV infection ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ และผู้ป่วยมะเร็ง (1)

เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าสู่ร่างกายทางระบบทางเดินหายใจ และก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในปอด ไปจนถึงแพร่กระจายไปทั่วร่างกายได้ แต่ในผู้ป่วยที่ไวต่อการติดเชื้อนั้น เชื้อราคริปโตคอคคัสมักก่อให้เกิดภาวะเชื้อหุ้มสมองอักเสบ (1)

อุบัติการณ์การเกิดภาวะเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อราคริปโตคอคคัสในผู้ป่วย HIV infection อยู่ระหว่าง 0.4-12% ต่อปี โดยอุบัติการณ์สูงสุดอยู่ที่แอฟริกา ส่วน median incidence ต่อปีของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นพบว่าอยู่ที่ 3.0 และมี assumed 90-day case fatality เท่ากับ 55% (2)

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลในประเทศไทยพบว่าเชื้อราคริปโตคอคคัสสามารถพบได้ทุกภาคของไทย โดยเกือบทั้งหมดเป็น serotype A โดยมีค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถระงับการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ต่อยา Fluconazole อยู่ระหว่าง 1-64 microgram/ml. และ MIC ต่อยา Amphotericin B อยู่ระหว่าง 0.03-1 microgram/ml. (3)

ในการรักษาโรคติดเชื้อราคริปโตคอคคัสนั้น ยาที่แนะนำให้ใช้รักษาช่วง induction ประกอบด้วย amphotericin B ร่วมกับ flucytosine เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตามด้วยการให้ consolidation และ maintenance ด้วยยา fluconazole (evidence A-I) (4) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในโลกไม่มียา flucytosine ดังนั้นยาที่ใช้เป็นหลักในการรักษาของประเทศไทยจึงประกอบด้วย ยา amphotericin B และ fluconazole

นอกจากปัจจัยเรื่องยาแล้ว ผลของการรักษาการติดเชื้อราคริปโตคอคคัสยังขึ้นอยู่กับการจัดการ ภาวะความดันภายในสมองสูง (increased intracranial pressure) การรักษาโรคร่วม การเพิ่มระดับ ภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย การป้องกันและรักษา immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) และ อีกปัจจัยที่สำคัญ คือ ภาวะการดื้อยาของเชื้อราคริปโตคอคคัส (1, 4)

ปัจจุบัน ข้อมูลเกี่ยวกับความไวและภาวะดื้อยาของเชื้อราคริปโตคอคคัสในประเทศไทยยังมี น้อยเนื่องจากการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อราอย่างไม่เป็นที่แพร่หลาย อีกทั้งความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับ MIC ที่สูงกับผลของการรักษายังไม่ชัดเจนจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยนี้

## 1.2 คำถามของการวิจัย (Research Questions)

### คำถามหลัก (Primary research question)

ความไวต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซล (Fluconazole) ของเชื้อคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์มแมน (*Cryptococcus neoformans*) ที่เพาะเชื้อขึ้นจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ระหว่างปี 2553-2554 เป็นอย่างไรเมื่อทำการตรวจด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชัน (Broth microdilution)

### คำถามรอง (Secondary research question)

1. ความไวต่อยาต้านเชื้อราแอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ของเชื้อคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์มแมน (*Cryptococcus neoformans*) ที่เพาะเชื้อขึ้นจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาใน

โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี 2553-2554 เป็นอย่างไรเมื่อทำการตรวจด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชัน (Broth microdilution)

2. ค่าความไวต่อยาต้านเชื้อราที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละรายมีผลต่อผลของการรักษาการติดเชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนที่ 10 สัปดาห์หรือไม่

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาความไวต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซล (Fluconazole) และแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) ของเชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน (*Cryptococcus neoformans*) เมื่อทำการตรวจด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชัน (Broth microdilution)

2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าความไวต่อยาต้านเชื้อราในผู้ป่วยแต่ละรายกับผลของการรักษาการติดเชื้อคริปโตคอกคัสที่ 10 สัปดาห์

### 1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)

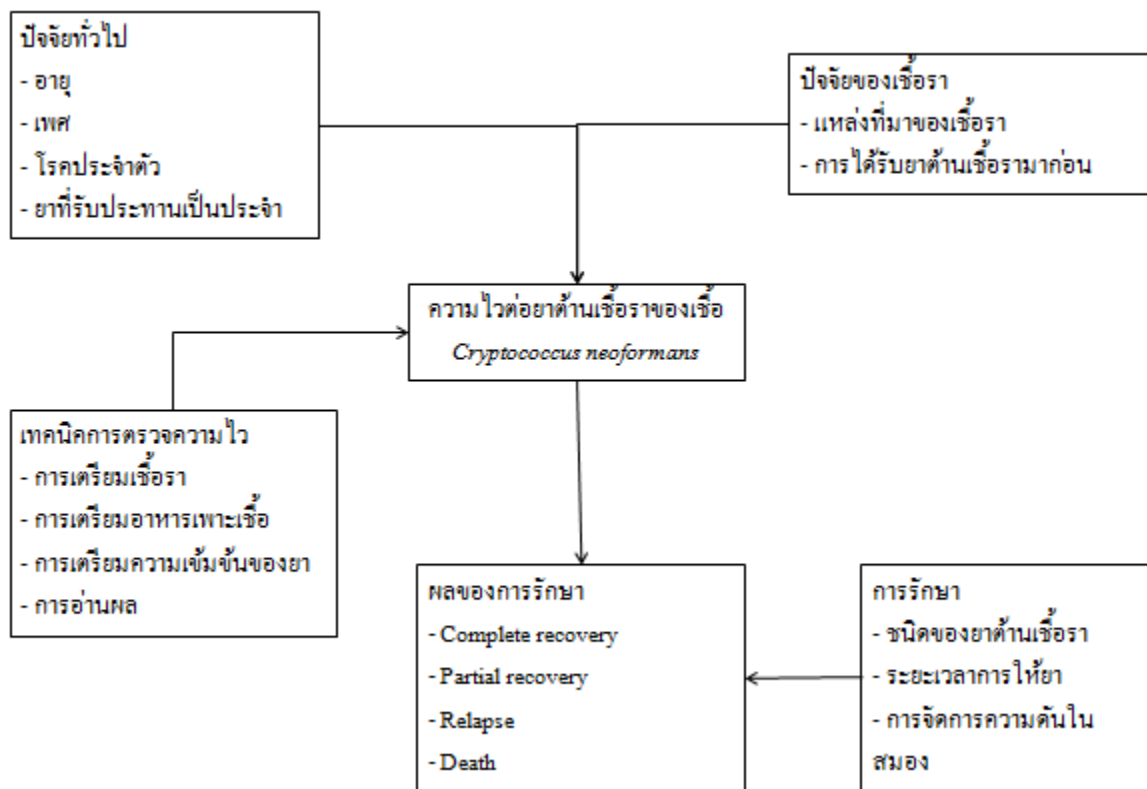
เชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนในการศึกษานี้ไวต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซลเท่ากับร้อยละ 95 ไม่แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าที่มีภาวะคือต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซลที่ร้อยละ 95

เชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนทั้งหมดยังไวต่อยาต้านเชื้อราแอมโฟเทอริซิน บีไม่แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทย

กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนที่ไวต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซล มีอัตราการตายที่ 10 สัปดาห์น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ไวต่อยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## 1.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)

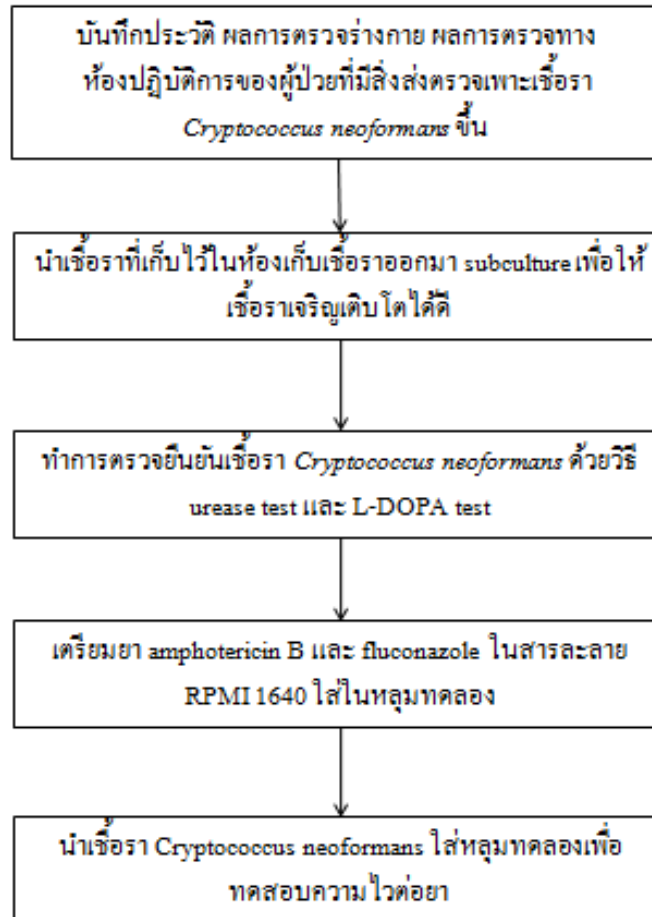
แผนภูมิที่ 1.1 กรอบแนวคิดในการวิจัย





## 1.6 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

แผนภูมิที่ 1.2 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ



แปลผลความไวต่อยาด้านเชื้อรา และหาความสัมพันธ์ระหว่างความไวต่อยาด้านเชื้อราและอัตราการตายที่ 10 สัปดาห์

## 1.7 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

การศึกษานี้ได้ส่งให้คณะกรรมการจริยธรรมของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อขอความเห็นชอบก่อนดำเนินการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา รวมถึงประวัติที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยจะถูกเก็บไว้เป็นความลับ โดยคำนึงถึงสิทธิของผู้ป่วยเป็นสำคัญ เอกสารจะเก็บในแฟ้มข้อมูล ซึ่งเฉพาะผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัยที่จะสามารถเข้าถึงข้อมูลได้ และการนำเสนอผลการวิจัยจะเป็นภาพรวมของการศึกษาทั้งหมด ไม่ได้เป็นข้อมูลการนำเสนอรายบุคคล

## 1.8 ขอบเขตการวิจัย

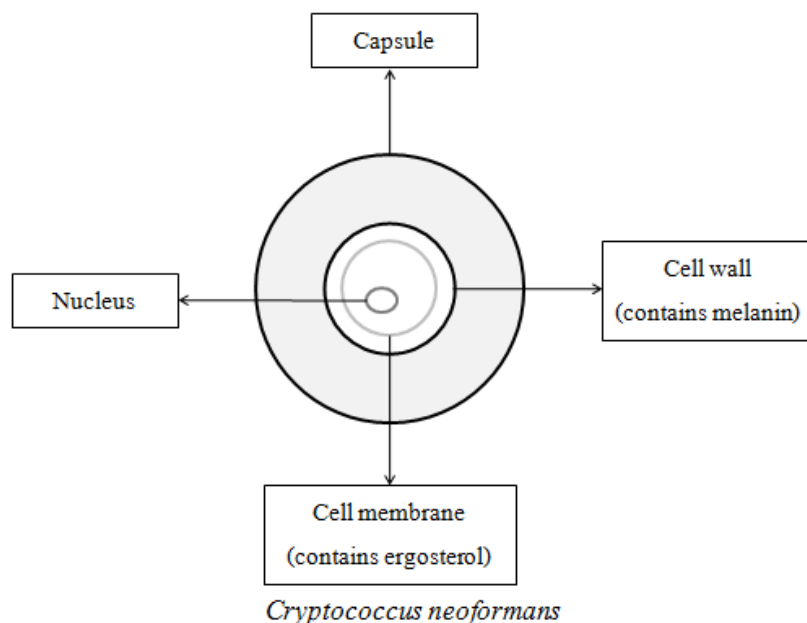
ทำการศึกษาเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมน ทั้งหมดที่เก็บรักษาไว้ในห้องเชื้อรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 โดยเป็นเชื้อราที่เพาะเชื้อขึ้นจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด หรือน้ำไขสันหลัง

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน (*Cryptococcus neoformans*) เป็นเชื้อราที่มี capsule และมีผนังเซลล์ที่สามารถสร้างสารเมลานินได้ (ภาพ 2.1) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้ สามารถก่อโรคได้ทั้งในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วย HIV infection, ผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ และผู้ป่วยมะเร็ง โดยลักษณะสำคัญที่ช่วยระบุเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* แยกจากเชื้อราอื่น คือ การพบ colony สีดำเมื่อเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ L-DOPA และการตรวจพบผลบวกของ urease enzyme

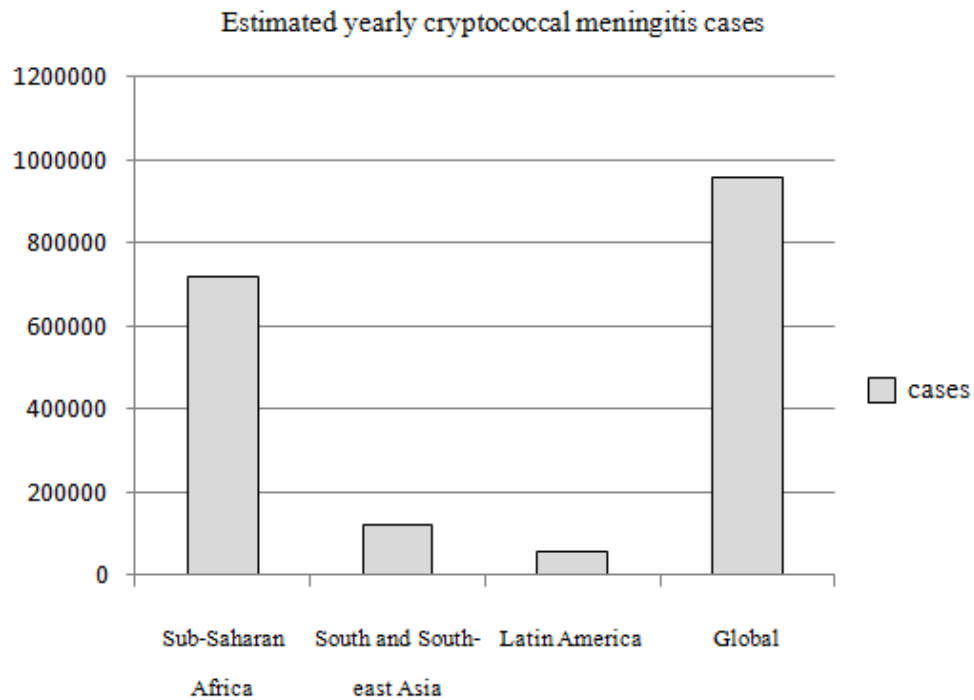
ภาพที่ 2.1 เชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน (*Cryptococcus neoformans*)



เดิมการติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ในคนนั้นพบได้น้อย แต่จำนวนผู้ติดเชื้อราชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้นมากเมื่ออัตราการติดเชื้อ HIV infection ในมนุษย์เพิ่มสูงขึ้น เมื่อพิจารณาถึงช่วงเวลาหลังมีการรักษา HIV infection ด้วย Highly active antiretroviral therapy (HAART) แล้วนั้น พบว่าหลังปี ค.ศ. 1996 อัตราการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* นั้นลดลงมาก แต่ยังคงพบที่สูงกว่าในอดีตและพบมากในผู้ป่วย HIV infection เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อ HIV (5)

เมื่อพิจารณาถึงการเกิดโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* เฉพาะในผู้ป่วย HIV infection นั้น พบว่าภูมิภาคที่พบการติดเชื้อต่อปีมากที่สุด คือ Africa ขณะที่อันดับที่สองนั้นมีภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อยู่ด้วย (2)

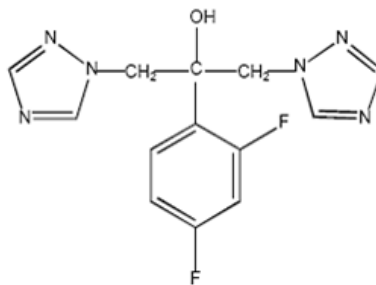
ภาพที่ 2.2 อัตราการเกิดเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ในผู้ป่วย HIV infection



การรักษาการติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* นั้น จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา ซึ่งการใช้ยาที่ถูกต้องเหมาะสมจะทำให้ได้ผลการรักษาที่ดี ส่วนหนึ่งคือ เชื้อรา *Cryptococcus neoformans* นั้น ควรจะมีความไวต่อยาต้านเชื้อราที่ใช้

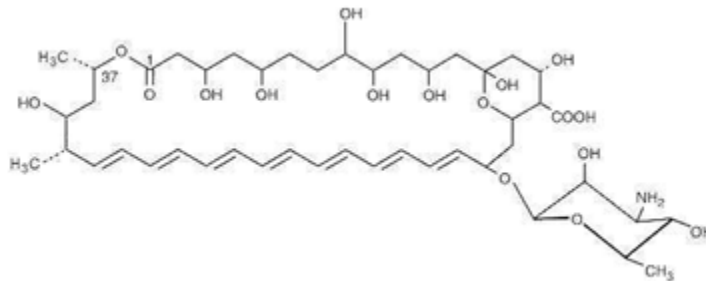
ยา fluconazole เป็นยาในกลุ่ม triazole ซึ่งออกฤทธิ์โดยการยับยั้งกระบวนการ C-14 alpha demethylation ของสาร lanosterol ในเชื้อรา โดยยาเข้าไปจับกับ cytochrome P-450 3-A dependent enzymes ก่อให้เกิดการสะสมของสาร C-14 alpha methyl sterols ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อราและลดความเข้มข้นของสาร ergosterol ที่จำเป็นต่อการ cytoplasmic membrane ของเชื้อรา ซึ่งผลทั้งสองทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ permeability ของ membrane และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (fungistatic effect) (6)

ภาพ 2.3 โครงสร้างของยา fluconazole



การออกฤทธิ์ของยา Amphotericin B เกิดจากการที่โมเลกุลของยาเข้าไปจับกับสาร ergosterol ที่เป็นส่วนหนึ่งของ cell membrane ของเชื้อรา เกิดกระบวนการ depolarization ของ membrane และเกิดเป็นรูที่ membrane ของเชื้อรา ทำให้เกิดการเสีย intracellular potassium และโมเลกุลอื่นๆจากเซลล์เชื้อรา ส่งผลให้เชื้อราตาย (fungicidal effect) นอกจากนี้ ยา Amphotericin B ยังมีผลฆ่าต่อเชื้อราผ่านทาง oxidative pathway อีกด้วย (6)

ภาพ 2.4 โครงสร้างของยา Amphotericin B



วิธีทำการทดสอบความไวต่อยาด้านเชื้อราที่เป็นมาตรฐาน คือ วิธี Broth dilution ซึ่งแบ่งได้เป็น Broth macrodilution และ Broth microdilution (7) กระบวนการทำ คือ การใส่เชื้อราคริปโตคอกคัส นิ โอฟอร์แมนลงไปในหลุมทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมอยู่กับยาด้านเชื้อรา โดยแต่ละหลุมจะมีขนาด ความเข้มข้นของยาที่แตกต่างกันออกไปครั้งละ 1 เท่าตัว หลังจากนั้น นำหลุมทดลองเข้าอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนนำออกมาเพื่ออ่านค่า magnitude of reduction

ภาพที่ 2.5 ตัวอย่าง Microdilution plate สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้านเชื้อรา ด้วยวิธี Broth microdilution



ปัจจุบันเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนยังไม่มีค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) มาตรฐานที่เป็นจุดตัด (cut point) สำหรับแบ่งว่าเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนนั้นมีความไวหรือคือ ต่อต้านเชื้อรา แต่ได้เคยมีการศึกษาในปี ค.ศ. 2000 เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ต่อยา fluconazole ของเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนทั้งหมด 28 เชื้อจากผู้ป่วย 25 รายกับผลของการรักษา พบว่า ค่า MIC ที่  $\geq 16$  microgram/ml. มี treatment failure และ mortality rate มากกว่ากลุ่มที่ MIC  $< 16$  microgram/ml. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (8)

การศึกษาอื่นๆเกี่ยวกับความไวและภาวะคือต่อยา fluconazole ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมน ได้ใช้ค่า MIC ที่  $< 16$  microgram/ml. เป็นค่าที่ใช้บอกภาวะไว (susceptible) ต่อยา fluconazole และใช้ค่า MIC ที่  $\geq 16$  microgram/ml. เป็นค่าที่ใช้บอกภาวะคือ (resistant) ต่อยา fluconazole (9, 10, 11, 12) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาส่วนหนึ่งที่ได้นำเกณฑ์ความไวต่อยาของเชื้อรา *Candida* species จาก CLSI-M27 A3 (7) มาใช้เป็นเกณฑ์กำหนดความไวต่อยาของเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนแทน ทำให้การศึกษาเหล่านี้ใช้ค่า MIC ที่  $< 16$  microgram/ml. เป็นเกณฑ์บอกภาวะไว (susceptible) ต่อยา fluconazole ใช้ค่า MIC ที่ 16-32 microgram/ml. เป็นเกณฑ์บอกภาวะไวปานกลาง (susceptible-dose dependent) ต่อยา fluconazole และใช้ค่า MIC  $\geq 64$  microgram/ml. เป็นเกณฑ์บอกภาวะคือ (resistant) ต่อยา fluconazole (13, 14, 15, 16)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเมื่อทำการทดสอบความไวของเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมน ด้วยวิธี Broth dilution ตามมาตรฐานของ CLSI-M27 A3 (7) พบว่าค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อยา fluconazole ในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกัน ทั้งช่วงของ MIC (MIC range) ค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ร้อยละ 50 และ 90 จากจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบ (MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>) และค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของ MIC (geometric mean) ดังข้อมูลตารางที่ 2.1 และ 2.2

ตารางที่ 2.1 ค่า MIC ของยาด้านเชื้อรา Fluconazole

Year (N) [Ref.]	Fluconazole			
	MIC range	MIC50	MIC90	GM
2000 (134) [13]	0.5->256	4	12	-
2001 (268) [13]	0.5->256	12	96	-
2004 (65) [14]	4-160	8	16	7.7
2005 (29) [10]	0.5-16	2	4	-
2006 (100) [16]	0.12-64	-	16	2
2008 (86) [22]	0.25-64	4	8	3.6
2009 (84) [19]	1-8	4	8	2.19
2010 (67) [23]	0.25-16	4	8	-
2010 (10) [21]	0.25-4	2	4	-
2010 (266) [24]	0.25-64	4	8	2.74
2010 (89) [12]	0.25-32	4	8	-
2011 (31) [25]	1-16	4	8	-

สำหรับยา amphotericin B นั้น ยังไม่มีค่า MIC มาตรฐานที่เป็นจุดตัด (cut point) สำหรับแบ่งว่า เชื้อราคริปโตคอกคัสนั้นมีความไวหรือคือต่อยาด้านเชื้อราเช่นกัน หลายการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ใช้ค่า MIC ที่ < 2 microgram/ml. เป็นค่าที่ใช้บอกภาวะไวต่อยา amphotericin B และใช้ค่า MIC ที่  $\geq$  2 microgram/ml. เป็นค่าที่ใช้บอกภาวะคือต่อยา amphotericin B (9, 11, 12, 13) อย่างไรก็ตาม มีบางการศึกษาที่ใช้ค่าต่างออกไป คือ ใช้ค่า MIC ที่ < 1 microgram/ml. เป็นค่าที่ใช้บอกภาวะไวต่อยา amphotericin B และใช้ค่า MIC ที่  $\geq$  1 microgram/ml. เป็นค่าที่ใช้บอกภาวะคือต่อยา (10)



จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเมื่อทำการทดสอบความไวของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าค่า MIC ต่อยา Amphotericin B ในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกัน ทั้งช่วงของ MIC (MIC range) ค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ร้อยละ 50 และ 90 และค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2.2 ค่า MIC ต่อยาด้านเชื้อรา Amphotericin B

Year (N) [Reference]	Amphotericin B			
	MIC range	MIC50	MIC90	GM
2000 (134) [13]	0.002-1	0.19	0.5	-
2001 (268) [13]	0.002-1	0.09	0.5	-
2004 (65) [14]	0.5-2	1	2	1.2
2005 (29) [10]	0.25-1	0.5	1	-
2006 (100) [16]	0.03-4	-	2	1
2008 (86) [22]	0.03-1	0.25	0.5	0.186
2009 (84) [19]	0.06-1	0.5	0.5	0.35
2010 (67) [23]	0.5-1	1	1	-
2010 (10) [21]	0.12-1	0.5	1	-
2010 (266) [24]	0.03-1	0.25	0.5	0.19
2010 (89) [12]	0.03-0.5	0.12	0.5	-

จากข้อมูลในตารางพบว่า ค่า MIC range, MIC50, MIC90 และ Geometric mean ของ MIC ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนในแต่ละสถานที่การศึกษาและในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน และค่าเหล่านั้นไม่ได้เพิ่มสูงขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ยกเว้นการศึกษาของ Sar et al. (17) ที่ทำการเปรียบเทียบค่า MIC ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนต่อยา amphotericin B และ ยา fluconazole ระหว่างเชื้อที่

เก็บในเดือนเมษายน ค.ศ. 2000 ถึงมีนาคม ค.ศ. 2001 กับเชื้อที่เก็บได้ระหว่างเดือนเมษายน ค.ศ. 2001 ถึงมีนาคม ค.ศ. 2002 โดยผลของการศึกษานี้พบว่า ค่า MIC50 และ MIC90 ต่อยา fluconazole สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาถึงร้อยละของเชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนที่ดื้อต่อยา Amphotericin B และยา fluconazole แล้วนั้นพบที่มีความหลากหลายมาก โดยแนวโน้มการดื้อยาทั่วโลกที่เก็บข้อมูลเชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนทั้งหมด 1,811 เชื้อ ระหว่างปี ค.ศ. 1990 - 2004 พบว่ามีการดื้อยาทั้งสองน้อยกว่าร้อยละ 1 (13) แต่เมื่อดูรายละเอียดข้อมูลจากการศึกษาอื่นๆ แล้วพบที่มีความแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา คือมีทั้งการศึกษาที่ไม่พบการดื้อต่อยา Amphotericin B และยา fluconazole (3, 18, 19, 20, 21) การศึกษาที่พบเชื้อดื้อต่อยา fluconazole ในระดับหลากหลายตั้งแต่ร้อยละ 0.6 จนถึงร้อยละ 14 เช่นในกัมพูชา โดยไม่ดื้อต่อยา Amphotericin B (9, 15, 17, 22, 23, 24, 25) การศึกษาที่พบว่าเชื้อดื้อต่อยา Amphotericin B ร้อยละ 3.3 โดยไม่ดื้อต่อยา fluconazole (26) และมีการศึกษาที่ประเทศสเปนเก็บรวบรวมเชื้อระหว่างปี ค.ศ. 1994 – 2005 พบว่ามีการดื้อต่อยา Amphotericin B ร้อยละ 5.3 และดื้อต่อยา fluconazole ถึงร้อยละ 46.6 (11)

เมื่อดูข้อมูลการดื้อต่อยาด้านเชื้อราของประเทศไทยพบว่าในปี ค.ศ. 2003-2004 เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมน 98 เชื้อ มีเชื้อที่ค่า MIC  $\geq$  16 microgram/ml. ถึงร้อยละ 32.5 และร้อยละ 33.3 ในกลุ่มที่ไม่ได้และได้ fluconazole prophylaxis ตามลำดับ (27) ต่างจากข้อมูลการศึกษาก่อนที่รวมข้อมูล 29 เชื้อในประเทศไทย ไม่พบข้อมูลการดื้อยา (18) ส่วนการเก็บรวบรวมข้อมูลในปี ค.ศ. 2007 พบว่าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบว่าเชื้อ Cryptococcus neoformans มีความไวต่อยาด้านเชื้อรา fluconazole อยู่ที่ร้อยละ 95 (28)

จากข้อมูลที่กล่าวมา จึงเป็นที่มาของการศึกษาเพื่อดูค่า MIC distribution ของเชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และดูร้อยละของการดื้อต่อยา Amphotericin B และ fluconazole เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการรักษาและเก็บเป็นข้อมูลของประเทศไทย โดยจะใช้ค่า MIC ที่  $<$  16 microgram/ml. เป็นค่าที่บอกความไว (susceptible) ต่อยา fluconazole ขณะที่ค่า MIC ระหว่าง 16-32

microgram/ml. เป็นค่าที่บอกรหัส susceptible dose-dependent (S-DD) และค่า MIC ที่ > 32 microgram/ml. เป็นค่าที่บอกรหัสคือ (resistant) ต่อยา fluconazole เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้า (13, 14, 15) และจากข้อมูลในปี ค.ศ. 2011 จากการศึกษาเชื้อราคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน 285 เชื้อ พบว่าค่า epidemiologic cutoff values (ECVs) ที่เท่ากับ 8 microgram/ml. มีเชื้อราชนิด wild-type ร้อยละ 96.9 มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 microgram/ml. (29) ขณะที่ยา Amphotericin B นั้น จะใช้ค่า MIC ที่ < 2 microgram/ml. เป็นค่าที่บอกรหัส susceptible และค่า MIC ที่ >= 2 microgram/ml. เป็นค่าที่บอกรหัส resistant ต่อยาเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (9, 11, 12, 13)

**ตารางที่ 2.3** ค่า epidemiologic cut off value ของยา fluconazole (29)

Antifungal agent	MIC (mg/L)		ECV (mg/L [%])
	Range	Mode	
Fluconazole	0.25-32	4	8 (96.9)

งานวิจัยนี้จะใช้การทดสอบความไวของเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน ต่อยาด้านเชื้อรา Fluconazole และ Amphotericin B ด้วยวิธีมาตรฐาน broth microdilution จากข้อมูลใน Clinical Laboratory Standard Institute ฉบับ M27-A3 ของปี 2008 (7)

ในแง่ของความสัมพันธ์ของค่า MIC ของเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน กับผลของการรักษาการติดเชื้อนั้น ข้อมูลจากการศึกษาในอดีตยังไม่มีความชัดเจน เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาส่วนหนึ่งพบว่า การติดเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน ที่มีค่า MIC ต่อยาที่สูงหรือเชื้อมีการดื้อต่อยานั้น มีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลของการรักษาที่ล้มเหลว และยังมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงกว่าการติดเชื้อด้วยเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมน ที่มีค่า MIC ต่ำกว่าหรือมีความไวต่อยาด้านเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (9, 30, 31, 32) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาในอดีตอีกส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์

ระหว่างค่า MIC ต่อยาด้านเชื้อราที่สูงหรือเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนที่ต่อต่อยากับผลของการรักษาที่ล้มเหลวหรือการเสียชีวิต (14, 15, 33) ดังนั้น จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยาด้านเชื้อรา Fluconazole และยา Amphotericin B กับผลของการรักษา คือ การเสียชีวิตที่ 10 สัปดาห์

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)

Cross-sectional analytic study (Laboratory-based study)

#### 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

##### ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนทุกเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในหน่วยเชื้อราโรงพยาบาล  
จุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554

##### ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study Population)

เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดหรือน้ำไขสันหลัง

##### เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา (Inclusion Criteria)

1. เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนที่เพาะเชื้อขึ้นจากสิ่งส่งตรวจและเก็บรักษาไว้ในหน่วย  
เชื้อราโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนที่สามารถเพาะเชื้อขึ้น (subculture) หลังจากนำออกมา  
จากที่เก็บรักษาไว้

### เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

1. เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนที่มีการปนเปื้อนกับเชื้อโรคอื่นหลังจากการเพาะเชื้อ
2. เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนที่มาจากผู้ป่วยรายเดียวกันภายในเวลา 2 สัปดาห์หลังการเพาะเชื้อขึ้นครั้งแรก

### 3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions)

Antifungal susceptibility คือ ความไวของเชื้อต่อยาต้านเชื้อราชนิดต่างๆ

Minimal inhibitory concentration (MIC) คือ ค่าความเข้มข้นของยาด้านเชื้อราที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้

Magnitude of reduction คือ การลดลงของการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมองด้วยตาเปล่า ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ

- ระดับ 0 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อใส
- ระดับ 1 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นเล็กน้อย
- ระดับ 2 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นประมาณร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเติบโต
- ระดับ 3 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยลดลงไม่ถึงร้อยละ 50
- ระดับ 4 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อเจริญเติบโต

MIC ต่อ ยา Amphotericin B คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเมื่อมองด้วยตาเปล่าได้ โดยมี magnitude of reduction เท่ากับ 0

MIC ต่อ ยา Fluconazole คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเมื่อมองด้วยตาเปล่าได้ โดยมี magnitude of reduction เท่ากับ 2

MIC50 คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่เชื้อจำนวนร้อยละ 50 จากจำนวนเชื้อทั้งหมดถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้

MIC90 คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่เชื้อจำนวนร้อยละ 90 จากจำนวนเชื้อทั้งหมดถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้

Susceptible to fluconazole คือ ภาวะไวต่อยา fluconazole โดยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีค่า MIC ที่  $< 16$  microgram/ml.

Susceptible dose-dependent (S-DD) คือ ภาวะไวต่อยา fluconazole ที่ขึ้นอยู่กับขนาดของยา โดยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีค่า MIC ระบุว่า 16-32 microgram/ml.

Resistant to fluconazole คือ ภาวะดื้อต่อยา fluconazole โดยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีค่า MIC ที่  $> 32$  microgram/ml.

Susceptible to amphotericin B คือ ภาวะไวต่อยา amphotericin B โดยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีค่า MIC ที่  $< 2$  microgram/ml.

Resistant to amphotericin B คือ ภาวะดื้อต่อยา amphotericin B โดยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีค่า MIC ที่  $\geq 2$  microgram/ml.

#### ผลของการรักษา

Clinical cure หมายถึง ผู้ป่วยที่ระดับความรู้สึกด่วงปกติ ไม่มีอาการไข้ ไม่มีอาการคอแข็ง และผลการเพาะเชื้อจากเลือดหรือน้ำไขสันหลังไม่พบเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์มแมน (ถ้ามี) ที่ 10 สัปดาห์หลังเริ่มรักษา

Death หมายถึง ผู้ป่วยที่เสียชีวิตโดยอาจเป็นผลมาจากการติดเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมน หรือเสียชีวิตจากสาเหตุอื่น

### 3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

จากค่าความชุกของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ที่ไวต่อยาต้านเชื้อรา fluconazole เท่ากับร้อยละ 95

เมื่อคิดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกินร้อยละ 10 สามารถคำนวณ sample size จากสูตร

$$n = Z_{\alpha}^2 p(1-p) / \Delta^2 \quad \text{โดย} \quad n = \text{จำนวนประชากรที่คำนวณได้}$$

$$Z_{\alpha} = 1.96 \text{ เมื่อ } \alpha \text{ เท่ากับ } 0.05$$

$$P = \text{อัตราความชุกในตัวอย่างประชากรที่สนใจ} = 0.95$$

$$\Delta = \text{ค่าความผิดพลาดที่ยอมรับได้} = 0.1$$

แทนสูตรการคำนวณ sample size

$$n = 1.96^2 \times 0.95(1-0.95) / 0.1^2$$

$$n = 18.2$$

จากการคำนวณ สรุปว่าขนาดตัวอย่างผู้ป่วยในการศึกษานี้อยู่ที่ 19 ราย



### 3.5 การดำเนินการวิจัย

#### วิธีการศึกษา

##### Subculture

1. นำเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ในตู้เก็บอุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส ออกมา
2. นำเชื้อราลงเพาะเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar
3. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เชื้อราไว้เข้าสู่ Incubate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนได้เชื้อราที่เจริญเติบโตได้ดี

##### Identification

1. นำเชื้อราที่ได้จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพาะลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ L-DOPA
2. นำเชื้อราที่ได้จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อทำการทดสอบการผลิต urease
3. เชื้อราที่ให้ colony สีดำและให้ผลบวกในการทดสอบ urease activity จัดเป็นเชื้อรา

*Cryptococcus neoformans*

##### Broth microdilution

1. ละลายยา Amphotericin B และ Fluconazole ลงในสารละลาย Dimethylsulphoxide และเจือจางลงในสาร RPMI 1640 ตาม CLSI M27-A3 guideline ในลงในหลุมทดลองจนได้ความเข้มข้นระหว่าง 0.03-16 microgram/ml. สำหรับ Amphotericin B และ 0.12-64 microgram/ml. สำหรับ fluconazole
2. ใส่เชื้อราคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนจำนวนเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland ลงในแต่ละหลุมรวมทั้งหลุมที่ไม่มียาด้วย
3. Incubate ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4. อ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ตาม magnitude of reduction ที่ระดับ 0 สำหรับ Amphotericin B และที่ระดับ 2 สำหรับ Fluconazole

### 3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่มาของเชื้อรา ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา Fluconazole และ Amphotericin B ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่ 72 ชั่วโมง ยาที่ใช้ในการรักษา และผลของการเพาะเชื้อซ้ำที่ 2 สัปดาห์ ผลของการรักษาที่ 10 สัปดาห์จะได้รับการบันทึกลงในแบบเก็บข้อมูล ดังภาคผนวกโดยผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวม

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. กราฟแจกแจงความถี่ระหว่างค่า MIC ของยา Amphotericin B และยา fluconazole และจำนวนเชื้อ
2. ตารางค่า MIC, MIC50, MIC90 และ Geometric mean ของยา Amphotericin B และยา fluconazole
3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของยา Amphotericin B และยา fluconazole โดยแบ่งเป็นเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยาและกลุ่มที่ดื้อต่อยา กับผลของการรักษาโดยแบ่งเป็นการรอดชีวิตและการเสียชีวิตที่ 10 สัปดาห์ด้วย Fisher's exact test

## บทที่ 4

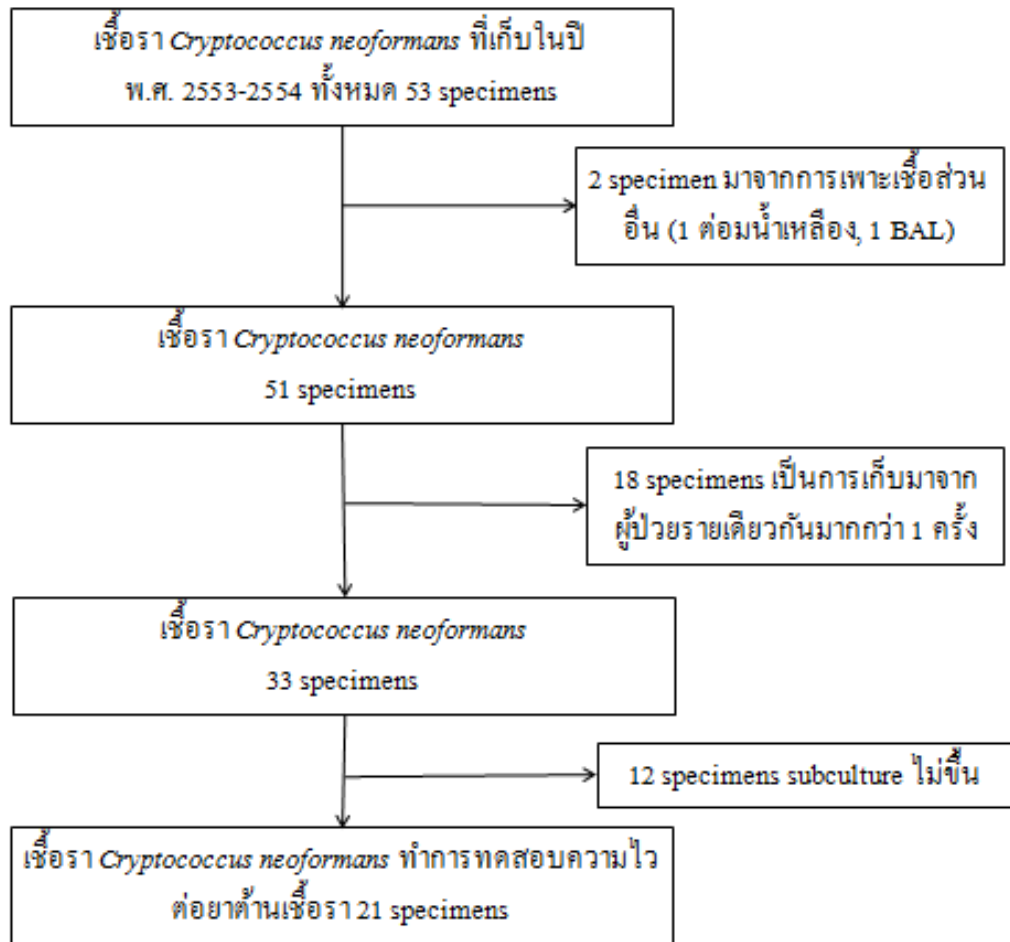
### ผลการวิจัย

มีเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ที่เพาะเชื้อในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 ทั้งหมด 53 specimens โดยมี 2 specimens ที่เป็นการเพาะเชื้อขึ้นจากต่อมน้ำเหลืองและน้ำล้างปอด (Bronchoalveolar lavage) มี 18 specimens ที่เป็นการเพาะเชื้อขึ้นจากผู้ป่วยรายเดียวกันมากกว่า 1 specimen ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ดังนั้นจึงมีเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ที่ได้เพาะเชื้อซ้ำทั้งสิ้น 33 specimens เมื่อทำการเพาะเชื้อซ้ำ พบว่ามี 12 specimens ที่ไม่สามารถเพาะเชื้อขึ้นได้ จึงมีเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ที่ทำการ identification และการตรวจหาความไวต่อยาต้านเชื้อรา Amphotericin B และ Fluconazole ทั้งสิ้น 21 specimens จากผู้ป่วย 21 ราย (แผนภูมิ 4.1)

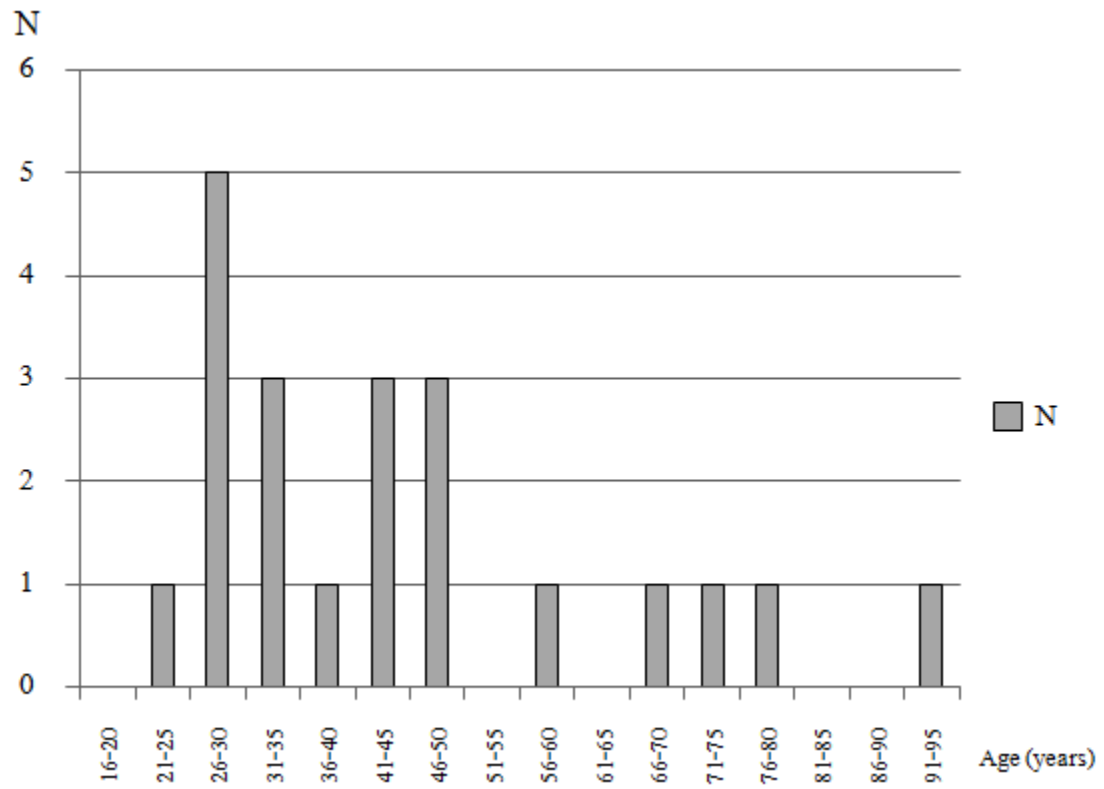
จากผู้ป่วยทั้งสิ้น 21 ราย ประกอบด้วยเพศชาย 11 ราย (ร้อยละ 52.3) และผู้หญิง 10 ราย (ร้อยละ 47.7) มีช่วงอายุตั้งแต่ 22 ปี จนถึง 92 ปี ดังรูป (ภาพ 4.1) โดยมีค่าอายุเฉลี่ย 44.8 ปี และค่ามัธยฐานอายุคือ 42 ปี

เชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ที่เพาะเชื้อขึ้นนั้น ได้มาจากสิ่งส่งตรวจ คือ เลือด 15 ราย (ร้อยละ 71.4) และน้ำไขสันหลัง 6 ราย (ร้อยละ 28.6) (ตาราง 4.1) และลักษณะพื้นฐานทางคลินิกของผู้ป่วยเป็นดังตาราง 4.2

แผนภูมิที่ 4.1 เชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ที่เข้าการวิจัย



ภาพ 4.1 อายุของผู้ป่วยติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans*



ตารางที่ 4.1 ชนิดของสิ่งส่งตรวจ

ชนิดสิ่งส่งตรวจ	N (%)
เลือด	15 (71.4)
น้ำไขสันหลัง	6 (28.6)

ตาราง 4.2 ลักษณะพื้นฐานทางคลินิกของผู้ป่วย

Factors	Median [range]
Age (years)	42 [22 - 92]
Hemoglobin (g%)	9.6 [5.8 - 13.7]
White blood cell (cell/mm <sup>3</sup> )	5,370 [2,660 - 92,070]
Platelet (cell/mm <sup>3</sup> )	261,000 [41,000 - 512,000]
Serum sodium (mEq/L)	134 [127-149]
Opening pressure (cm.H <sub>2</sub> O)	34 [5 - 60]
CSF white blood cell (cell/mm <sup>3</sup> )	22 [0 - 657]
CSF sugar (mg/dL)	36.8 [3.9 - 80]
CSF protein (mg/dL)	59.3 [23 - 297.6]
Alteration of consciousness (%)	23.8

จากผู้ป่วยทั้งหมด 21 ราย พบว่ามีผู้ป่วย 15 ราย (ร้อยละ 71.4) มีโรคติดเชื้อ HIV infection นอกจากนั้น โรคประจำตัวอื่นที่พบ คือ autoimmune disease คือ systemic lupus erythematosus และ autoimmune hepatitis ที่ใช้ steroid ขนาด 30 ถึง 60 mg. ต่อวัน พบ 3 ราย (ร้อยละ 14.2) โรคตับแข็งจากไวรัสตับอักเสบบี 1 ราย (ร้อยละ 4.7) โรคเบาหวานและไขกระดูกฝ่อ (myelodysplastic syndrome) 1 ราย (ร้อยละ 4.7) และผู้ป่วยที่ไม่พบว่ามีโรคประจำตัวหรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน 1 ราย (ร้อยละ 4.7) ข้อมูลดังตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 โรคประจำตัวของผู้ป่วยติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans*

Underlying diseases	N [%]
HIV infection	15 [71.4]
Autoimmune disease <sup>+</sup>	3 [14.2]
Cirrhosis <sup>*</sup>	1 [4.7]
Diabetes mellitus	1 [4.7]
Hematologic disease <sup>§</sup>	2 [9.4]
None	1 [4.7]

+ : 2 SLE, 1 autoimmune hepatitis

\* : HCV related cirrhosis

§ : 1 MDS (in diabetes mellitus patient), 1 CML (in HIV infected patient)

ในจำนวนผู้ป่วย HIV infection ทั้งหมด 13 รายที่ได้รับการเจาะเลือดตรวจค่า CD4 count พบว่าค่า CD4 cell count ของผู้ป่วยทั้งหมดน้อยกว่า 100 cell/cu.mm<sup>3</sup>. โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 19.8 cell/cu.mm<sup>3</sup>. และไม่มีรายใดที่ได้รับยาต้านไวรัส (HAART) มาก่อน

นอกจากนี้ พบว่าผู้ป่วยทั้งหมด 21 ราย ไม่เคยมีประวัติได้รับยาต้านเชื้อราใดๆมาก่อนการติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ครั้งนี้

ผลค่าความไวของเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยาไวต่อยาด้านเชื้อรา fluconazole พบว่าค่า MIC ของเชื้อราทั้งหมดอยู่ในที่ 8 microgram/ml. โดยมีค่า MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> และค่า geometric mean ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยา Fluconazole อยู่ที่ 8 microgram/ml. เช่นกัน

ผลค่าความไวของเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยาไวต่อยาด้านเชื้อรา Amphotericin B พบว่าค่า MIC ของเชื้อราทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 1 microgram/ml. โดยมีค่า MIC<sub>50</sub> และ MIC<sub>90</sub> อยู่

ที่ 0.5 และ 1 microgram/ml. ตามลำดับ ค่า geometric mean ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนต่อ ยา Amphotericin B อยู่ที่ 0.65 microgram/ml.

ตาราง 4.4 ความถี่ของเชื้อราที่ค่า MIC ต่อยาด้านเชื้อราระดับความเข้มข้นต่างๆ

Drugs	MIC (microgram/ml.)											
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.50	1	2	4	8	16	32	64
AmB	0	0	0	0	13	8	0	0	0	0	0	0
Fluc.	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0

AmB: Amphotericin B

Fluc: Fluconazole

MIC: minimal inhibitory concentration

ตารางที่ 4.5 ค่า Minimal inhibitory concentration (MIC, microgram/ml.) ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนต่อยาด้านเชื้อรา

Drugs	MIC range (microgram/ml.)	MIC50 (microgram/ml.)	MIC90 (microgram/ml.)	Geometric mean (microgram/ml.)
AmB	0.5-1	0.5	1	0.65
Fluc.	8	8	8	8

AmB: Amphotericin B

Fluc: Fluconazole

MIC: minimal inhibitory concentration



ตารางที่ 4.6 รายละเอียดของการติดเชื้อของผู้ป่วยและผลการรักษา

Sex	Age (y)	Underlying disease	CD4 (%) (cell/mm.3)	Medication	Blood culture	CSF culture	Serum CRAG	CSF CRAG	MIC of AmB (mcg./ml.)	MIC of Fluc. (mcg./ml.)	Repeated culture	Outcome
1.Male	34	HIV infection	9 (1%)		positive	Positive	1:128	1:128	0.5	8	No growth after 2 weeks	Survive at 10 weeks
2.Male	67	HT			positive	No data	No data	No data	1	8	No growth after 2 weeks	Survive at 10 weeks
3.Male	26	HIV infection	12 (2%)		positive	Positive	1:128	1:128	0.5	8	Positive at 2 and 4, negative at 6 weeks	Survive at 10 weeks
4.Male	45	HIV infection	No data		negative	Positive	1:16	1:2	0.5	8	No repeat	Survive at 10 weeks
5.Female	49	HIV infection	8 (1%)		positive	Positive	1:128	1:128	1	8	No growth after 1 week	Survive at 10 weeks
6.Female	47	HIV infection	64 (8%)		negative	Positive	1:8	1:4	0.5	8	No repeat	Survive at 10 weeks
7.Female	28	HIV infection	11 (1%)		positive	Positive	No data	1:4096	1	8	No growth after 2 weeks	Survive at 10 weeks
8.Female	22	Active SLE		Prednisolone 60 mg./day	positive	No data	1:4	No data	0.5	8	No growth after 1 weeks	Death ( <i>A. baumannii</i> septicemia)
9.Female	37	HIV infection, ?PCP	5 (1%)		positive	No data	1:8	No data	0.5	8	No growth after 1 week	Survive at 10 weeks

Sex	Age (y)	Underlying disease	CD4 (%) (cell/mm.3)	Medication	Blood culture	CSF culture	Serum CRAG	CSF CRAG	MIC of AmB. (mcg./ml.)	MIC of Fluc. (mcg./ml.)	Repeated culture	Outcome
10.Male	42	HIV infection	4 (2%)		positive	Positive	Positive	positive	0.5	8	No repeat	Survive at 10 weeks
11.Female	74	Autoimmune hepatitis		Prednisolone 45 mg./day, MMF	negative	Positive	1:512	1:4096	0.5	8	No growth after 2 weeks	Death ( <i>A. baumannii</i> septicemia)
12.Female	33	Active SLE		Prednisolone 30 mg./day	negative	Positive	1:256	1:512	0.5	8	No growth after 1 week	Survive at 10 weeks
13.Female	59	HIV infection	58 (7%)		negative	Positive	1:128	1:128	1	8	No growth after 1 week	Survive at 10 weeks
14.Male	76	Hepatitis C virus related cirrhosis			positive	Positive	1:128	1:128	1	8	No growth after 2 weeks	Death (ventilator-associated pneumonia)
15.Female	34	HIV infection	No data		positive	Positive	1:2048	1:2048	0.5	8	No repeat	Death
16.Male	44	HIV infection	13 (1%)		negative	Positive	1:64	1:128	1	8	No repeat	Survive at 10 weeks
17.Male	92	Diabetes mellitus, MDS			positive	No data	No data	No data	0.5	8	No repeat	Death
18.Male	46	HIV infection	13 (1%)		positive	Positive	1:2048	1:2048	1	8	No growth after 1 week	Death ( <i>K. pneumoniae</i> septicemia)

ex	Age (y)	Underlying disease	CD4 (%) (cell/mm.3)	Medication	Blood culture	CSF culture	Serum CRAG	CSF CRAG	MIC of AmB (mcg./ml.)	MIC of Fluc. (mcg./ml.)	Repeated culture	Outcome
19.Male	30	HIV infection, Hepatitis B infection, CML	45 (1%)	Hydroxyurea	positive	No data	1:512	No data	0.5	8	No repeat	Death
20.Female	28	HIV infection, Disseminated TB	9 (1%)		positive	Positive	1:2048	1:1024	0.5	8	No growth after 2 weeks	Survive at 10 weeks
21.Male	28	HIV infection	7 (1%)		positive	Positive	No data	1:1024	1	8	No growth after 2 weeks	Survive at 10 weeks

CSF: Cerebrospinal fluid, CRAG: Cryptococcal antigen, AmB.: Amphotericin B, Fluc.: Fluconazole, mcg.: microgram, HIV: Human immunodeficiency virus, HT: Hypertension, SLE: Systemic lupus erythematosus, PCP: Pneumocystis pneumonia, MDS: Myelodysplastic syndrome, CML: Chronic myeloid leukemia, TB: Tuberculosis, *A. baumannii*: *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*

จากข้อมูลการศึกษาพบว่ามีผู้ป่วยรายใดที่ติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่มีค่า MIC ต่อยา fluconazole มากกว่าหรือเท่ากับ 16 microgram/ml. จัดว่าเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทั้งหมด susceptible ต่อยา fluconazole โดยไม่มีเชื้อที่ susceptible-dose dependent หรือ resistant ต่อยา fluconazole นอกจากนี้ ในส่วนของยา Amphotericin B พบว่า ไม่มีเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ตัวใดที่มีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 2 microgram/ml. จัดว่าไม่มีเชื้อที่ต่อยา Amphotericin B

การเสียชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีทั้งสิ้น 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 ในจำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมดพบว่าเป็นผู้ป่วยติดเชื้อ HIV 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.5 นอกจากนั้นเป็นผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวอื่น 4 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วย autoimmune disease 2 ราย (ร้อยละ 28.7) ผู้ป่วย cirrhosis 1 ราย (ร้อยละ 14.4) และผู้ป่วยเบาหวานที่มีไขกระดูกฝ่อ (myelodysplastic syndrome) 1 ราย (ร้อยละ 14.4)

เมื่อทำการแยกระหว่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV และไม่ติดเชื้อ HIV พบว่า อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย HIV อยู่ที่ร้อยละ 20 (เสียชีวิต 3 รายจาก 15 ราย) ขณะที่อัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อ HIV อยู่ที่ร้อยละ 66.6 (เสียชีวิต 4 รายจาก 6 ราย)

การเสียชีวิตของผู้ป่วยทั้ง 7 รายมีรายละเอียดดังนี้ คือ ผู้ป่วยรายที่ 8 ได้รับการวินิจฉัยเป็น systemic lupus erythematosus ก่อนเข้ารับการรักษาครั้งนี้มีปัญหา autoimmune hemolytic anemia, lupus nephritis มีอาการปวดศีรษะและชักร่วมด้วย ได้รับยา prednisolone ขนาด 60 mg ต่อวัน เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลครั้ง นี้ด้วยเรื่อง bowel perforation ได้รับการผ่าตัด การเพาะเชื้อจากเลือดในวันแรกรับตรวจพบ *Cryptococcus neoformans* โดยไม่มีการเจาะหลัง ผู้ป่วยได้รับยา amphotericin B รวมทั้งสิ้น 7 วัน โดยที่การเพาะเชื้อจากเลือด ในวันที่ 7 ไม่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* แล้ว ระหว่างนอนโรงพยาบาลหลังการผ่าตัดวันที่ 10 มีปอดติดเชื้อแทรกซ้อน การเพาะเชื้อจากเลือดซ้ำพบ *Acinetobacter baumannii* ก่อนที่ผู้ป่วยจะเสียชีวิต

ผู้ป่วยรายที่ 11 ได้รับการวินิจฉัยเป็น autoimmune hepatitis ได้รับยา prednisolone ขนาด 45 mg ต่อวัน ร่วมกับยา mycophenolate mofetil ขนาด 500 mg ต่อวัน เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยเรื่องไข้และปวดศีรษะ 3 สัปดาห์ พบการติดเชื้อ Cryptococcal meningitis ความดันเปิดในการเจาะหลังได้เท่ากับ 18 cm.H<sub>2</sub>O ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยา Amphotericin B เป็นเวลา 14 วัน ไม่มีอาการไข้และปวดศีรษะ การเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังที่ 2 สัปดาห์ไม่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ผู้ป่วยได้รับการเปลี่ยนยาเป็น fluconazole

รับประทาน ระหว่างการนอนโรงพยาบาลมีอาการไข้และหอบเหนื่อย ได้รับการใส่ท่อช่วยหายใจและวินิจฉัย เป็นปอดติดเชื้อ ผลการเพาะเชื้อจากเลือดพบ *Acinetobacter baumannii* และผู้ป่วยเสียชีวิต 33 วันหลังการนอน โรงพยาบาล

ผู้ป่วยรายที่ 14 มีโรคประจำตัวคือตับแข็งจากไวรัสตับอักเสบบี ได้รับการวินิจฉัย Cryptococcal meningitis ร่วมกับ cryptococcaemia หลังมีอาการไข้ สับสนและซึมลง 3 สัปดาห์ ความดันเปิดในการเจาะ หลังได้เท่ากับ 9 cm.H<sub>2</sub>O ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยา Amphotericin B 2 สัปดาห์ การเจาะหลังซ้ำไม่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* แล้ว ไม่มีไข้แต่ยังมีอาการซึม ระหว่างนอนโรงพยาบาลมีไข้ขึ้นอีกครั้ง เหนื่อย ระดับ ออกซิเจนในเลือดและความดันโลหิตต่ำ ได้รับการวินิจฉัยเป็น ventilator-associated pneumonia และเสียชีวิต

ผู้ป่วยรายที่ 15 มีอาการไข้ ปวดศีรษะเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต่อมามีอาการซึมและชักเกร็ง ได้รับการ วินิจฉัยเป็น HIV infection และ cryptococcal meningitis การเอกซเรย์คอมพิวเตอร์สมองพบว่ามีภาวะสมองบวม ทั่วๆ โดยไม่มี hydrocephalus แรกเริ่มไม่มี brainstem sign ไม่ได้ทำการเจาะหลังและผู้ป่วยเสียชีวิตหลังได้รับยา Amphotericin B 1 วัน

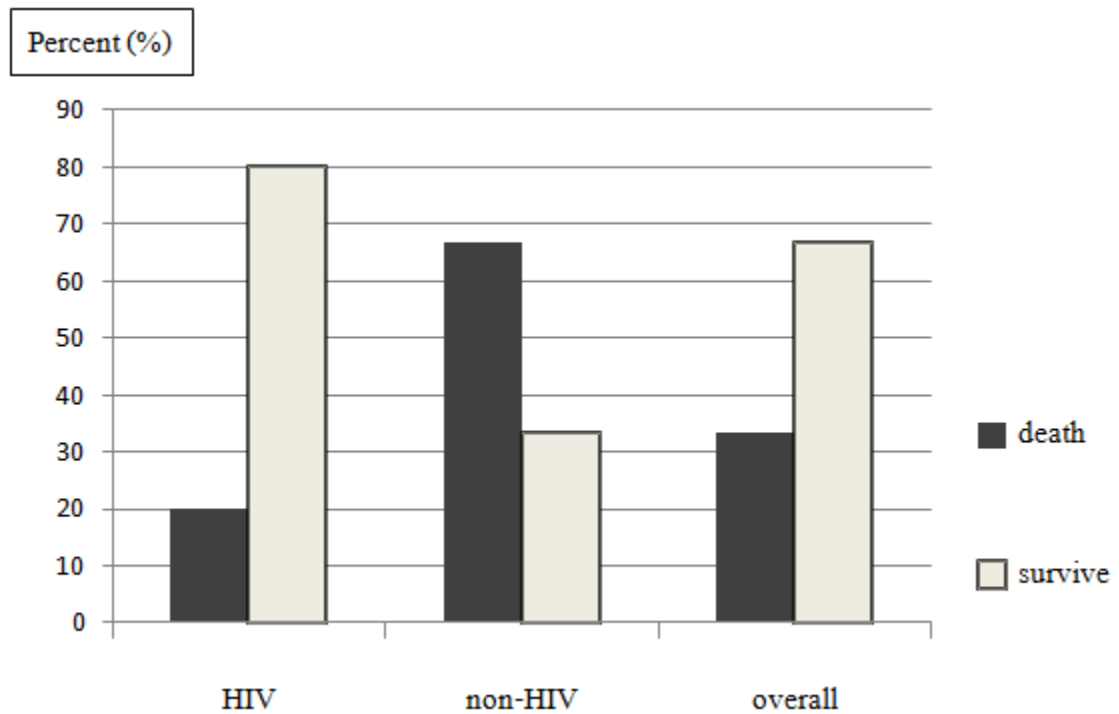
ผู้ป่วยรายที่ 17 มีโรคประจำตัวเป็น โรคเบาหวานและ myelodysplastic syndrome มีอาการไข้และซึมลง 3 สัปดาห์ก่อนมาโรงพยาบาล มีไตวายแทรกซ้อนที่ต้องอาศัยการฟอกเลือดอย่างต่อเนื่อง ตรวจพบ *Cryptococcus neoformans* จากการเพาะเชื้อในเลือด ความดันเปิดในการเจาะหลังได้เท่ากับ 5 cm.H<sub>2</sub>O ผู้ป่วย เสียชีวิต 1 วันหลังได้รับการวินิจฉัย

ผู้ป่วยรายที่ 18 มีอาการปวดศีรษะ 7 วัน มีอาการตามัว หูอื้อ ตรวจพบ Papilledema, sensorineural hearing loss และมีความผิดปกติของ cranial nerves หลายเส้น ตรวจพบ HIV infection, cryptococcal meningitis และ *Klebsiella pneumoniae* จากการเพาะเชื้อในเลือด หลังการรักษาผู้ป่วยมีความดันในสมองสูงตลอด ความดัน เปิดในการเจาะหลังได้มากกว่า 60 cm.H<sub>2</sub>O ได้รับการใส่ VP shunt ในวันที่ 4 หลังการรักษา ผู้ป่วยได้รับยารวม Amphotericin B 21 วัน ยังมีไข้สูง มีอาการตามัว หูอื้อเพิ่มขึ้น ซึมลง ไม่มี brainstem sign และเสียชีวิต

ผู้ป่วยรายที่ 19 ตรวจพบ HIV infection 8 ปี และ chronic myeloid leukemia 4 ปี ไม่ได้ได้รับการรักษา ประจำ รับประทานยา hydroxyurea เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยเรื่องไข้ 4 เดือน ตรวจพบ *Cryptococcal*

*neoformans* จากการเพาะเชื้อในเลือด ไม่ได้ทำการเจาะหลัง หลังให้การรักษาด้วยยา Amphotericin B 1 วัน ผู้ป่วยปฏิเสธการรักษาในโรงพยาบาลเพื่อกลับบ้าน

ภาพที่ 4.2 การเสียชีวิตของผู้ป่วยจากเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* เปรียบเทียบระหว่างผู้ติดเชื้อ HIV infection และผู้ไม่ติดเชื้อ HIV infection



## บทที่ 5

### อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลังเพื่อดูค่าความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุด (Minimal inhibitory concentration, MIC) ของยา amphotericin B และ Fluconazole ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ โดยนำเชื้อราที่เพาะเชื้อขึ้นจากเลือดหรือน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่ติดเชื้อระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความไวของเชื้อราต่อผลการรักษาที่ 10 สัปดาห์ โดยการศึกษานี้ทำทั้งในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง รวมถึงผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV infection ด้วย

จากข้อมูลเรื่องอายุของผู้ป่วย จะเห็นได้ว่าอายุของผู้ที่ติดเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* อยู่ในวัยทำงานเป็นหลัก โดยมีผู้ป่วย 15 รายจาก 21 ราย (ร้อยละ 71.4) มีอายุระหว่าง 26 ถึง 50 ปี ผู้ป่วยส่วนมากคือ ร้อยละ 85.6 มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือรับประทานยากดภูมิคุ้มกันชัดเจนก่อนการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans*

งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยพบว่าค่า MIC ของเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยา fluconazole มีค่าเท่ากับ 8 microgram/ml. ทั้ง 21 เชื้อ ซึ่งถือได้ว่าเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนอยู่ในช่วง susceptible ต่อยา fluconazole ส่วนค่า MIC ของเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยา Amphotericin B มีค่าต่ำกว่า 2 microgram/ml. ทั้ง 21 เชื้อ สรุปได้ว่าเชื้อคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนในการศึกษานี้ไม่มีการดื้อต่อยา Amphotericin B

ในส่วนของความไวของเชื้อราคริปโตคอกคัส นิโอฟอร์แมนต่อยา fluconazole นั้น การศึกษานี้พบว่าไม่มีการดื้อต่อยา fluconazole เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งผลการศึกษานี้เหมือนกับการศึกษาในประเทศไทยปี ค.ศ. 1997 ที่ไม่พบการดื้อต่อยา fluconazole [3] แต่แตกต่างจากการศึกษาในประเทศไทยในปี ค.ศ. 2003 ที่พบค่า MIC ของเชื้อต่อยา fluconazole มากกว่าเท่ากับ 16 microgram/ml. อยู่ที่ร้อยละ 32.5 และ 33.3 เมื่อศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับและไม่ได้รับ fluconazole prophylaxis ตามลำดับ (25) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลเกี่ยวกับ

ความไวต่อยาต้านเชื้อรา fluconazole ในประเทศไทยยังมีความหลากหลายอยู่มากเช่นเดียวกับข้อมูลค่า MIC ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ต่อยา fluconazole ในต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างตามแต่ละสถานที่และปี การศึกษา เนื่องจากการศึกษานี้ไม่พบเชื้อที่คือต่อยา fluconazole และไม่มีผู้ป่วยรายใดที่ได้รับยา fluconazole ก่อนการติดเชื้อครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงไม่สามารถแสดงปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการคือต่อยา fluconazole ได้ ส่วนข้อมูลของ MIC ต่อยา Amphotericin B ในการศึกษานี้เป็นเช่นเดียวกับการศึกษาส่วนมาก คือไม่มีการคือต่อยา ยกเว้น การศึกษาในสเปนและบราซิลที่มีการคือต่อยาร้อยละ 3.3 – 5.3 (9, 24)

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเสียชีวิตที่ 10 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 33.3 เนื่องจากการศึกษานี้ไม่พบเชื้อราคริปโตคอคคัส นิโอฟอร์แมนที่คือต่อยาต้านเชื้อรา Fluconazole และ Amphotericin B จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า การคือต่อยาต้านเชื้อรามีความสัมพันธ์หรือส่งผลกับอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยหรือไม่ นอกจากนี้ ในกลุ่มผู้ป่วยที่เสียชีวิตนั้น พบว่า 5 รายมีค่า MIC ต่อยา Amphotericin B เท่ากับ 0.5 microgram/ml. ขณะที่ 2 รายมีค่า MIC ต่อยา Amphotericin B เท่ากับ 1 microgram/ml. การศึกษานี้จึงไม่พบความสัมพันธ์ ระหว่างค่า MIC ที่สูงกับการเสียชีวิตของผู้ป่วย

อย่างไรก็ตาม การเสียชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อคริปโตคอคคัส นิโอฟอร์แมนนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับค่า MIC ต่อยาต้านเชื้อราเพียงอย่างเดียว หากยังขึ้นอยู่กับโรคร่วม ภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ชนิดและระยะเวลาของยาที่ได้รับ ภาวะแทรกซ้อนและ โดยเฉพาะการจัดการความดันในสมองในผู้ป่วยที่มีเยื่อหุ้มสมองอักเสบและมีการเพิ่มขึ้นของความดันในสมอง (1, 4) เมื่อพิจารณาถึงสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยแต่ละรายพบว่า ในผู้ป่วยรายที่ 8 และผู้ป่วยรายที่ 11 แม้ว่าจะได้รับยากดภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง แต่ผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา Amphotericin B แล้ว เนื่องจากผู้ป่วยทั้งสองรายมีอาการดีขึ้น โดยหลังการรักษา 1 สัปดาห์ในผู้ป่วยรายที่ 8 การเพาะเชื้อจากเลือดซ้ำไม่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และหลังการรักษา 2 สัปดาห์ในผู้ป่วยรายที่ 11 การเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังไม่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* อีกทั้งระดับความดันเปิดในสมองของผู้ป่วยรายที่สองสูงไม่มากตั้งแต่แรก ดังนั้นสาเหตุการเสียชีวิตในผู้ป่วยทั้งสองรายนี้น่าจะมาจากการติดเชื้อแทรกซ้อนในเลือดและที่ปอดด้วยเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

ในผู้ป่วยรายที่ 14 พบว่าผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา Amphotericin B แล้วเช่นเดียวกับสองรายแรก ระดับความดันเปิดในสมองไม่สูง และการเพาะเชื้อซ้ำที่ 2 สัปดาห์ไม่พบเชื้อ *Cryptococcus*



*neoformans* ในน้ำไขสันหลัง แต่มีไขกลับเป็นซ้ำโดยมีแหล่งการติดเชื้อเป็น ventilator-associated pneumonia ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักทำให้ผู้ป่วยรายนี้เสียชีวิต

ผู้ป่วยรายที่ 15 และ 17 นั้นเสียชีวิตในเวลา 1 วันหลังจากที่ได้รับการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* โดยในรายที่ 15 นั้นมีอาการซึมมากและชักเกร็ง อีกทั้งยังไม่มี brainstem sign ตั้งแต่แรกเริ่ม โดยที่ไม่มี hydrocephalus จากการเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ตรวจพบการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทั้งในเลือดและน้ำไขสันหลัง โดยมีระดับ Cryptococcal antigen ที่สูง 1:2048 ทั้งสองที่ ซึ่งเห็นได้ว่าผู้ป่วยรายนี้มีระดับความรุนแรงของโรคมามากตั้งแต่แรก ปัจจัยหลักในการเสียชีวิตน่าจะเป็นจากความรุนแรงของการติดเชื้อเอง ขณะที่ผู้ป่วยรายที่ 17 นั้นพบว่าเป็นผู้ป่วยสูงอายุมาก มีโรคประจำตัวและภาวะแทรกซ้อนหลายชนิดรวมถึงไตวายก่อนตรวจพบการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ในเลือด ซึ่งปัจจัยหลักในการเสียชีวิตของผู้ป่วยรายนี้น่าจะมาจากตัวผู้ป่วยและภาวะแทรกซ้อนอื่นมากกว่าที่จะเป็นจากการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* เอง ซึ่งผู้ป่วยทั้งสองรายนี้ ทางญาติได้ตัดสินใจหยุดการรักษาหลังได้รับการวินิจฉัยและรักษา 1 วัน

กรณีผู้ป่วยรายที่ 18 นั้น ผู้ป่วยมาโรงพยาบาลด้วยอาการของความดันในสมองที่สูง คือ อาการตามัว มี Papilledema และ sensorineural hearing loss ซึ่งยืนยันด้วยการเจาะหลังพบระดับความดันเปิดมากกว่า 60 cm.H<sub>2</sub>O ซึ่งแม้จะได้ให้การรักษาด้วยยา Amphotericin B ทำการเจาะหลังเพื่อลดความดันในสมอง รวมถึงผ่าตัดใส่ VP shunt แล้วนั้น ผู้ป่วยยังคงมีตามัวและระดับการได้ยินลดลง มีอาการซึมมากขึ้นจนกระทั่งไม่มี brainstem sign และเสียชีวิต ซึ่งในผู้ป่วยรายนี้ ปัจจัยหลักที่ทำให้เสียชีวิตน่าจะมาจากความดันในสมองที่สูงมากเป็นหลัก แม้ว่าผู้ป่วยรายนี้จะมีการติดเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ในเลือดร่วมด้วยก็ตาม ส่วนปัจจัยด้านเชื้อ *Cryptococcus neoformans* นั้นพบว่าผลการเพาะเชื้อราซ้ำจากน้ำไขสันหลังที่ 1 สัปดาห์ไม่พบเชื้อแล้ว

ผู้ป่วยรายที่ 19 นั้นเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV มานานและมีโรคร่วม คือ chronic myeloid leukemia แต่ไม่สมัครใจรับการรักษา เมื่อตรวจพบการติดเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ในเลือดนั้นผู้ป่วยไม่มีอาการและอาการแสดงของเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ผู้ป่วยได้ปฏิเสธการรักษาหลังได้รับยา Amphotericin B 1 วัน ดังนั้นสาเหตุการเสียชีวิตในผู้ป่วยรายนี้เกิดจากปัจจัยด้านตัวผู้ป่วยเองเป็นหลักที่ปฏิเสธการรักษา

สรุปข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่าเชื้อราคริปโตคอคคัส นิโอฟอร์แมนที่เก็บรวบรวมจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 พบว่ายังมีความไวต่อยาต้านเชื้อรา Fluconazole และ

Amphotericin B ทั้งหมด การศึกษานี้ไม่สามารถแสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ที่สูงหรือการคือต่อยาต้านเชื้อราที่อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ เนื่องจากไม่มีเชื้อราที่คือต่อยา การศึกษานี้มีข้อจำกัด คือ จำนวนเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนที่ยังมีชีวิตหลังการ subculture เพื่อทำการตรวจ broth microdilution ทดสอบความไวต่อยาด้านเชื้อราที่มีจำนวนน้อย อาจส่งผลให้ตรวจไม่พบเชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนที่คือต่อยาด้านเชื้อราได้ ขณะเดียวกันการทดสอบความไวและการอ่านผลความไวต่อยาด้านเชื้อราเป็นการทำด้วยมนุษย์และอ่านผลด้วยตาเปล่า อาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ อย่างไรก็ตามปัจจัยด้านการอ่านผลความไวนั้น ทางผู้วิจัยได้ใช้วิธีการอ่านผลด้วยเจ้าหน้าที่ 2 คนและแพทย์ 1 คน โดยแยกจากกันแล้วเพื่อควบคุมความคลาดเคลื่อนของการอ่านผล ในประเด็นผลของการรักษาคือ อัตราการเสียชีวิตที่ 10 สัปดาห์นั้น มีข้อจำกัด คือ ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้นอกจากการคือต่อยาด้านเชื้อรา เช่น การจัดการความดันในสมองในผู้ป่วยรายที่มีความดันในสมองสูง ช่วงเวลาของการเริ่มยาต้านไวรัสในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV เพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน การรักษาภาวะภูมิคุ้มกันต่ำจากสาเหตุอื่นๆ เช่น ยาสเตียรอยด์ การควบคุมการติดเชื้อและภาวะแทรกซ้อนอื่นระหว่างรับการรักษาโรงพยาบาล เช่น ventilator-associated pneumonia หรือภาวะไตวาย เป็นต้น เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลัง ทำให้ไม่สามารถควบคุมปัจจัยเหล่านี้ได้

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อศึกษาความไวต่อยาด้านเชื้อราของเชื้อคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนในอนาคตได้ ประเทศไทยยังต้องการข้อมูลเกี่ยวกับความไวต่อยาด้านเชื้อราและผลต่อการรักษาอีกมาก เพื่อเก็บรวบรวมเป็นฐานข้อมูลของประเทศ และวิเคราะห์ข้อมูลหาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเสียชีวิตเพื่อนำไปสู่การรักษาที่ได้ผลดีที่สุดต่อผู้ป่วย โดยเฉพาะการศึกษาที่มีจำนวนเชื้อราเข้าทดสอบมากกว่านี้และเป็นการศึกษาชนิดไปข้างหน้าเพื่อที่จะสามารถควบคุมปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลกระทบต่อผลการรักษาและการเสียชีวิตได้

## รายการอ้างอิง

- [1] Tunkel AR. Approach to the patient with central nervous system infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009. p. 1183-8.
- [2] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009;23(4):525-30.
- [3] Poonwan N, Mikami Y, Poosuwan S, Boon-Long J, Mekha N, Kusum M, et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from clinical specimens in Thailand and their susceptibility to various antifungal agents. *Eur J Epidemiol* 1997;13(3): 335-40.
- [4] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50(3):291-322.
- [5] Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O, et al. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS* 2004;18(3):555-62.
- [6] Rex JH, Stevens DA. Systemic antifungal agents. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009. p. 549-63.
- [7] Clinical and laboratory standards institute (CLSI) (2008a) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: third edition, M27-A3. Wayne, PA: CLSI.

- [8] Aller AI, Martin-Mazuelos EM, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(6):1544-8.
- [9] Guinea J, Hagen F, Pelaez T, Boekhout T, Tahoune H, Torres-Narbona M, et al. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. *Med Mycol* 2010;48(7):942-8.
- [10] Abdel-Salam H. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Egypt to seven antifungal drugs. *Mycoses* 2005;48(5):327-32.
- [11] Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Rate of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(6):1144-7.
- [12] Cejudo MTG, Gallego AG, Lacasa EC, Aller AI, Romero A, Garcia JP, et al. Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and Voriconazole: a comparison with the M27-A3. *Med Mycol* 2010;48(5):710-9.
- [13] Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2163-7.
- [14] Arechavala AI, Ochiuzzi ME, Borgnia MD, Santiso GM. Fluconazole and Amphotericin B susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: results of minimal inhibitory concentrations against 265 isolates from HIV-positive patients before and after two or more months of antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol* 2009;26(3):194-7.

- [15] Watanatraibhob P. Antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* and *Candida* spp. Isolates using Etest and Disk diffusion method. Unpublished thesis (M.Sc.), Mahidol university, 2004.
- [16] Dias ALT, Matsumoto FE, Melhem MSC, da Silva EG, Auler ME, de Siqueira AM, et al. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 12):1693–9.
- [17] Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(2):563–5.
- [18] Archibald LK, Tuohy MJ, Wilson DA, Nwanyanwu O, Kazembe PN, Tansuphasawadikul S, et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans*. *Emerg Infect Dis* 2004;10(1):143-5.
- [19] Souza LKH, Souza Jr. AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas LB, et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses* 2010;53(1): 62–7.
- [20] Yang YL, Cheng MF, Wang CW, Wang AH, Cheng WT, Lo HJ. The distribution of species and susceptibility of anphotericin B and fluconazole of yeast pathogens isolates from sterile sites in Taiwan, *Med Mycol* 2010;48(2):328–34.
- [21] Borghi E, Iatta R, Sciota R, Biassoni C, Cuna T, Montagna MT, et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. *J Clin Microbiol* 2010;48(9): 3153–7.

- [22] Thompson III GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(1):309-11.
- [23] Mdodo R, Moser SA, Jaoko W, Baddley J, Pappas P, Kempf M, et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycoses* 2010;54(5): e438–42.
- [24] Ochiuzzi ME, Santiso GM, Arechavala AI. Correlation of Etest and Neo-Sensitabs diffusion assays on Mueller-Hinton-methylene blue agar with broth microdilution reference method (CLSI-M27-A2) for testing susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B and fluconazole. *Med Mycol* 2010;48(6):893-6.
- [25] Pfaller MA, Castanheira M, Messer S, Moet GJ, Jones R. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY antimicrobial surveillance program (2009). *Diag Microbiol Infect Dis* 2011;69(1): 45–50.
- [26] Da Silva PR, de Souza Rabelo RA. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41(2):158-62.
- [27] Manosuthi W, Sungkanuparph S, Thongyen S, Chumpathat N, Eampokalap B, Thawomwan U, et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates and clinical outcomes of Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients with/without fluconazole prophylaxis. *J Med Assoc Thai* 2006;89(6):795-802.
- [28] Chindamporn A. (Personal communication, December 1, 2011)

- [29] Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and Voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71(3):252–9.
- [30] Sungkanuparph S, Sathapatayavongs B, Prachartam R. In vitro susceptibility pattern of *Cryptococcus neoformans*: Is there any correlation with clinical response? *J Infect Dis Antimicrobial Agents* 1999;16(3):121-7.
- [31] Larsen RA, Bauer M, Brouwer AE, Sanchez A, Thomas AM, Rajanuwong A, et al. In vitro- clinical correlations for amphotericin B susceptibility in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(1):343-5.
- [32] Larsen RA, Bauer M, Pitisuttithum P, Sanchez A, Tansuphaswadikul S, Wuthiekanun V, et al. Correlation of susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B with clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(12):5624-30.
- [33] Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(7):2464-70.

ภาคผนวก



## แบบฟอร์มการบันทึกข้อมูลผู้ป่วย

Number \_\_\_\_\_

Date (Positive culture) \_\_\_\_\_

### 1. Specimen

- Blood
- CSF
- Other \_\_\_\_\_

### 2. Underlying disease

- No
- HIV infection
- Immunosuppression
- Other \_\_\_\_\_

### 3. Current medication

- No
- Antiretroviral drugs \_\_\_\_\_
- Immunosuppressive agents \_\_\_\_\_
- Other \_\_\_\_\_

### 4. Previous antifungal drugs

- No
- Amphotericin B, duration \_\_\_\_\_ days, off \_\_\_\_\_ days
- Fluconazole, duration \_\_\_\_\_ days, off \_\_\_\_\_ days
- Other, duration \_\_\_\_\_ days, off \_\_\_\_\_ days

**5. Serum Cryptococcus antigen**

- Negative
- Positive, titer \_\_\_\_\_

**6. CSF Cryptococcus antigen**

- Negative
- Positive, titer \_\_\_\_\_

**7. Treatment**

- Amphotericin B \_\_\_\_\_ days
- Fluconazole \_\_\_\_\_ days
- Other \_\_\_\_\_ days

**8. MIC Amphotericin B \_\_\_\_\_ micrograms/ml.**

**9. MIC fluconazole \_\_\_\_\_ micrograms/ml.**

**10. Culture outcome**

- Positive culture at 2 weeks
- Negative culture at 2 weeks

**11. Survival outcome**

- Survive at 10 weeks
- Death within 10 weeks
- Death after 10 weeks

## การเตรียมสารละลายยาสำหรับทดสอบความไว

1. จัดเตรียมผงยามาตรฐานของ Amphotericin B และ Fluconazole
2. คำนวณน้ำหนักของผงยาที่ต้องใช้เพื่อเตรียมยาตามความเข้มข้นมาตรฐาน ตามสูตร

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \cdot \text{Concentration } (\mu\text{g/mL})}{\text{Assay Potency } (\mu\text{g/mg})}$$

3. คิดปริมาณผงยาเพื่อจากที่คำนวณได้ แล้วคำนวณกลับเป็นปริมาตรสารละลายที่ต้องใช้ ตามสูตร

$$\text{Vol. (mL)} = \frac{\text{Weight (mg)} \cdot \text{Assay Potency } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentration } (\mu\text{g/mL})}$$

4. เตรียมสารละลายยาด้านเชื้อราที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 1280 microgram/ml. หรือ 10 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องใช้ในการทดสอบ
5. เก็บสารละลายยาแบบปราศจากเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส
6. สารละลายยาที่ถูกนำมาใช้แล้วให้ทิ้งเมื่อสิ้นสุดการใช้งานในแต่ละวัน

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ใช้ผงอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ RPMI 1640 10.4 gram ที่มี glutamine และ phenol red โดยไม่มี bicarbonate
2. ใส่สาร 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid 34.53 gram เป็น buffers
3. ละลายผง RPMI 1640 และ 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid ลงใน distilled H<sub>2</sub>O 900 ml.
4. ระหว่างคนสารละลาย วัดค่า pH และเติมสาร sodium hydroxide เพื่อให้ได้ค่า pH 7.0 +/- 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส
5. เติมน้ำจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร
6. เก็บอย่างปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

## การเตรียมเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน

1. นำเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนออกมาจากตู้เก็บเชื้อ
2. Subculture เชื้อลงใน Sabouraud dextrose agar
3. นำเข้า incubate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
4. ตรวจสอบความ purity และ viability ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน
5. ทำการตรวจ urease test เพื่อยืนยันเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน
6. ทำการตรวจ L-DOPA test เพื่อยืนยันเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมน
7. เลือกเชื้อราจำนวน 5 colonies ที่ขนาดประมาณ 1 mm. ของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนอายุ 48 ชั่วโมง ละลายลงในสารละลาย 8.5 g/L NaCl ปราศจากเชื้อ
8. ตรวจสอบความขุ่นของเชื้อในสารละลายให้ได้ระดับ 0.5 McFarland เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ  $1-5 \times 10^6$  cells per mL.
9. เติบเชื้อราให้ได้  $1-5 \times 10^3$  CFU/ml. ก่อนนำไปทดสอบความไวของเชื้อราต่อยาด้านเชื้อราด้วยวิธี broth microdilution

## การเตรียมเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาด้านเชื้อรา

1. เตรียม multiwall microdilution plates (96 U-shaped wells)
2. เตรียมสารละลายยาลงใน RPMI 1640 medium ด้วยอัตราส่วน 1:5 ให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของยาสองเท่าของระดับยาที่ต้องการทดสอบจริง
3. ใส่สารละลายยาพร้อม RPMI 1640 ปริมาณ 100 microlitres ลงในแถว 1 ถึง 10 ด้วย multichannel pipette
4. ใส่เชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนในสารละลาย NaCl ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 100 microlitre ลงในแถว 1 ถึง 10 ที่มีสารละลายยาพร้อม RPMI 1640 อยู่แล้ว
5. ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายสูงสุดเป็น 64 microgram/ml. ที่แถว 1 และระดับความเข้มข้นต่ำสุดเป็น 0.03 microgram/ml. ที่แถวที่ 10
6. ใส่ sterile drug-free medium ปริมาณ 100 microlitre ลงในช่อง 11
7. ใส่เชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนปริมาณ 100 microlitre ลงในช่อง 11 เป็น growth control wells
8. ใส่ sterile drug-free medium 100 microlitre ลงในช่อง 12 เป็นการทดสอบ sterility control

## การทดสอบความไวของเชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนต่อยาต้านเชื้อรา

1. นำ multiwell microdilution plates ที่ใส่เชื้อราคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนพร้อมอาหารเลี้ยงเชื้อและยาแล้ว เข้า incubate ในตู้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
2. นำ multiwell microdilution plates ออกมาอ่านผลความไวต่อยาต้านเชื้อราที่ 72 ชั่วโมง
3. สังเกตการมีหรือไม่มี visible growth ด้วย reading mirror
4. ให้คะแนน magnitude of reduction เปรียบเทียบกับแถว growth control drug-free well
  - ระดับ 0 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อใส
  - ระดับ 1 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นเล็กน้อย
  - ระดับ 2 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นประมาณร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเติบโต
  - ระดับ 3 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยลดลงไม่ถึงร้อยละ 50
  - ระดับ 4 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อเจริญเติบโต
5. หากมีการเกาะเป็น clumping ของตะกอน ให้ใช้ pipette ใน mixing techniques
6. MIC ของเชื้อต่อยา amphotericin B คือ ระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ได้คะแนน magnitude of reduction เป็น 0
7. MIC ของเชื้อต่อยา fluconazole คือ ระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ได้คะแนน magnitude of reduction เป็น 2



## การควบคุมคุณภาพ

1. ทดสอบความไวของเชื้อรามาตรฐาน *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ต่อยา Amphotericin B พบว่าค่า MIC เท่ากับ 1 microgram/ml. ซึ่งอยู่ในช่วง 0.5-4.0 microgram/ml. ตามมาตรฐาน
2. ทดสอบความไวของเชื้อรามาตรฐาน *Candida albicans* ATCC 90028 ต่อยา Amphotericin B พบว่าค่า MIC เท่ากับ 1 microgram/ml. ซึ่งอยู่ในช่วง 0.5-2.0 microgram/ml. ตามมาตรฐาน
3. การทดสอบความไวของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ต่อยาด้านเชื้อรา Amphotericin B และยา Fluconazole ถูกทำซ้ำสองครั้งเพื่อยืนยันผลการทดสอบความไว
4. การอ่านผลค่า magnitude of reduction ถูกอ่าน โดยนักเทคนิคการแพทย์ 2 คนและแพทย์ 1 คน โดยไม่เปิดเผยผลต่อกัน เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบ

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พญ.นนทลี ทองสง

วัน เดือน ปี เกิด 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2525 จังหวัดกรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นักศึกษาคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2543-2549
แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์	2549-2550
แพทย์ใช้ทุนอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์	2550-2553
แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคติดเชื้อ รพ.จุฬาลงกรณ์	2553-ปัจจุบัน

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต สงขลานครินทร์	2549
ประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูง วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลานครินทร์	2553
วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์	2553

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

- สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย
- สมาชิกแพทยสภา
- สมาชิกสมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย