



การศึกษาระยะเวลาของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1.25% 2.5% 5% และ 10%
กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคิตีบัคทีเรียแอคเน่ ในหลอดทดลอง

EFFICACY OF 1.25% 2.5% 5% AND 10% BENZOYL PEROXIDE
ON TIME KILLING PROFILE OF CUTIBACTERIUM ACNES INHIBITION IN VITRO

ปณณันท์ บุญญา

การศึกษาระยะเวลาของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1.25% 2.5% 5% และ 10%
กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโควิดแบบที่เรียมแอนด์ในหลอดทดลอง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFICACY OF 1.25% 2.5% 5% AND 10% BENZOYL PEROXIDE
ON TIME KILLING PROFILE OF CUTIBACTERIUM ACNES INHIBITION IN VITRO



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Dermatology)

Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาระยะเวลาของเบนโซิลเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1.25% 2.5% 5% และ 10%
กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคิติแบคทีเรียแอมเน ในหลอดทดลอง

ของ

ปณณันท์ บุญญา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภักดิ์)

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุวิภากร
โอภาสวงศ์)

ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ แพทย์หญิงสาลีณี ไรจน์ศิริกุล)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดม
เพทายกุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาระยะเวลาของเบนโซิลเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1.25% 2.5% 5% และ 10%
ผู้วิจัย	กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคิตีบคทีเรียมแอกเน่ ในหลอดทดลอง
ปริญญา	ปริญญานันท์ บุญญา
ปีการศึกษา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. มาลัย ทวีโชติภัทร์
	อาจารย์ แพทย์หญิง สาลินี โรจนหิรัญสกุล

สิวเป็นโรคทางผิวหนังที่พบได้บ่อยและส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์และสภาพจิตใจของคนไข้ การรักษาหลักของสิวอักเสบคือ Benzoyl peroxide (BP) วิธีการใช้คือทาทั้งใบหน้าและเย็นแต่เนื่องจากผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย ได้แก่ แห้ง แดง ลอก ทำให้มีการแนะนำให้ทา 5-15 นาทีแล้วล้างออก และมี BP ความเข้มข้น 2.5%-10% โดยผลข้างเคียงของยาสัมพันธ์กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทายา กลไกสำคัญในการรักษาสิวของ BP คือฆ่าเชื้อ คิตีบคทีเรียมแอกเน่ (*C. acnes*) แต่ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ BP กับระยะเวลาที่สัมผัสเชื้อ *C. acnes* ที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% กับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* จำนวน 70 isolates โดยเป็นกลุ่มเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะชนิด Erythromycin Tetracycline และหรือ Clindamycin 41 isolates และ กลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ 29 isolates ซึ่งเป็นการศึกษาเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธี agar well diffusion 2) หาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ BP ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* โดยวิธี microdilution test 3) ทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *C. acnes* ของ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% BP ต่อหน่วยเวลาประเมินที่ระยะเวลาหลังสัมผัสเชื้อ 30 วินาที 1, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที โดยวิธี plate count ผลการศึกษาพบว่า 2.5%, 5% และ 10% สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่มดื้อยาและกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน ค่ามัธยฐานของค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของ BP ในการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 937.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250) BP มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *C. acnes* ทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา ความเข้มข้นของ BP ร่วมกับฤทธิ์การฆ่าเชื้อต่อหน่วยเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) BP ความเข้มข้น 1.25% ใช้เวลา 60 นาที 2.5% ใช้เวลา 15 นาที BP ความเข้มข้น 5% และ 10% ใช้เวลาเท่ากัน 30 วินาที ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* จึงสรุปได้ว่า จากการทดสอบในห้องทดลอง BP ฆ่าเชื้อ *C. acnes* ได้ทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา ความเข้มข้นของ BP และระยะเวลาสัมผัสเชื้อมีความสำคัญต่อฤทธิ์ฆ่าเชื้อความเข้มข้นที่น้อยใช้เวลาสัมผัสเชื่อนานกว่าความเข้มข้นที่มาก สามารถใช้ BP ความเข้มข้น 5% แทน 10% อย่างไรก็ดีตามยังคงต้องอาศัยการศึกษาในคนเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ค่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ในคนต่อไป

คำสำคัญ : เบนโซิลเพอร์ออกไซด์, ฤทธิ์ฆ่าเชื้อต่อหน่วยเวลา, คิตีบคทีเรียมแอกเน่

Title	EFFICACY OF 1.25% 2.5% 5% AND 10% BENZOYL PEROXIDE ON TIME KILLING PROFILE OF CUTIBACTERIUM ACNES INHIBITION IN VITRO
Author	PUNYANUN BOONCHAYA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Associate Professor Malai Taweechoatipatr , Ph.D.
Co Advisor	Salinee Rojhirunsakool , M.D.

Acne vulgaris is a common skin disease, which has both a personal and psychological aspect. Benzoyl peroxide (BP) has been the gold standard for inflammatory acne treatment. However, it is frequently accompanied by cutaneous irritation, dryness and erythema. BP exhibits bactericidal effects against *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) and contributes to comedolytic activities. BP products have varied dosages (2.5%-10%) to address therapeutic needs, but higher concentrations create more potential side effects. However, bactericidal activity on *C. acnes* was associated with varied BP concentration and the contact times were poorly documented. The experimental, in-vitro, cross-sectional study searched for efficacy of 1.25%, 2.5%, 5%, and 10% BP on the time-killing profile of *C. acnes* inhibition against 70 isolates, including antibiotic-sensitive isolates and erythromycin, tetracycline and/or clindamycin resistance isolates. The experiment was divided into three parts: (1) the growth inhibition of BP against all isolates, determined by a minimal inhibition zone (MIZ) with an agar well diffusion method; (2) the minimal inhibition concentration (MIC) of BP against all isolates with microdilution; and (3) the time-killing profile of 1.25%, 2.5%, 5% and 10% BP against all isolates, evaluated at 30 sec, 1, 5, 10, 15, 30 and 60 minutes and assessed the bactericidal effect with the plate count method. The results showed that the growth inhibition efficacy of 2.5%, 5% and 10% BP against antibiotic sensitive-isolates had no statistically significant differences regarding antibiotic-resistant isolates. The median MIC value of BP was 937.5 µg/ml, IQR (625 - 1,250). The different concentrations and varied contact times had statistically significant differences in terms of bactericidal effects to all *C. acnes* isolates (p-value < 0.001). The bactericidal effect of BP to all isolates showed by 60 min on 1.25% BP, 15 min on 2.5% BP, 5% and 10% and both had equal bactericidal effects after thirty seconds. In conclusion, BP can inhibit *C. acnes* growth in both antibiotic-sensitive and resistant isolates. The in-vivo study suggested that the concentration of BP and contact times have an impact on beneficial BP usage, low concentration needed more times to apply than high concentration and 5% BP instead of 10%. For clinical application, the time usage of BP is at least, 60 min for 1.25%, 15 min for 2.5%, and 30 seconds for 5% BP. Nevertheless, further study on absorption of BP on follicular skin units need to be examined in this research.

Keyword : Benzoyl peroxide (BP), Time-killing profile, *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสะดวกช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่อง จากคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มาลัย ทวีโชติภัทร์ ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ พญ. สาลินี ไรจน์หิรัญสกุล รองประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ พญ. นันทิชา คมนามูล ที่ได้ให้คำปรึกษาชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัยทั้งแนะนำแนวทางอธิบายและสรุปผลการศึกษาเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. สุวิภากร โอภาสวงศ์ ประธานกรรมการสอบปากเปล่า ผู้ให้คำแนะนำและแกัดคิดอันเป็นประโยชน์จากงานวิจัย และปรับปรุงพัฒนางานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นพ. มนต์รี อุดมเพทายกุล ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่ารวมทั้งให้คำปรึกษาและช่วยเหลืออย่างมีเมตตาตามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และกรรมการบริหารหลักสูตรสาขา ตจวิทยา แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาท ความรู้ต่าง ๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการท้าววิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาว พรทิพา วิจิ้งเจริญ และนิสิตบัณฑิตศึกษารวมทั้งภาคิวิชา จุลชีวิวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการอย่างดี ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ และ บุคลากร สาขา ตจวิทยา รวมถึงบุคคลอีกหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์และศูนย์การแพทย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงคุณของบิดามารดาและครูอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้ เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ปณณันท์ บุญญา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามของการวิจัย	2
วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
กรอบแนวคิด	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. สิว (Acne vulgaris)	6
2. <i>Cutibacterium acnes</i> (C. acnes) และการเกิดสิว.....	10
3. การรักษาสิว และ Benzoyl peroxide (2)	19
4. Benzoyl peroxide (BP) และ <i>Cutibacterium acnes</i>	27
5. การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย <i>C. acnes</i> และการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งเชื้อ.....	42

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	54
รูปแบบงานวิจัย.....	54
กลุ่มเป้าหมายของงานวิจัย (target population)	54
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	54
ขั้นตอนการวิจัย.....	55
การประเมินผล.....	58
การเก็บรวบรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล (Data collection and management).....	58
แบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูล.....	58
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล.....	61
วิเคราะห์ข้อมูล Survival analysis (วิเคราะห์ระยะปลอดเหตุการณ์)	61
การวิเคราะห์เพื่อตอบคำถามวิจัย	61
ผลการวิเคราะห์เพื่อตอบคำถามวิจัย	62
จริยธรรมทางการวิจัย (Ethical Considerations)	62
ระยะเวลาการทำวิจัย.....	62
แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย.....	63
สถานที่ทำการวิจัย.....	63
งบประมาณ.....	64
บทที่ 4 ผลการวิจัย	65
ข้อมูลการทดลองทั่วไป	65
ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มเชื้อ <i>C. acnes</i>	66
ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล	67
ตอนที่ 1 ผลทดสอบประสิทธิภาพของ 2.5% BP, 5% BP และ 10% BP ในการยับยั้งการ	
เจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่าน	
ศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone (MIZ)	67

ตอนที่ 2 ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ BP ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> (MIC)	73
ตอนที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในการฆ่าเชื้อ <i>C. acnes</i> (bactericidal) ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ต่อกุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา	74
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	86
สรุปผลการวิจัย	86
ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มเชื้อ <i>C. acnes</i>	86
ตอนที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดย minimal inhibition zone (MIZ)	86
ตอนที่ 2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของ BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโต หรือ minimal inhibition concentration (MIC) ต่อ เชื้อ <i>C. acnes</i>	86
ตอนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ <i>C. acnes</i> ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ต่อหน่วยเวลา	87
อภิปรายผลการวิจัย	87
สรุปผล	90
ข้อจำกัดของการศึกษา	90
ข้อเสนอแนะ	90
บรรณานุกรม	91
ประวัติผู้เขียน	103

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ชนิดของ Benzoyl peroxide ที่ผลิตในประเทศ สหรัฐอเมริกา	22
ตาราง 2 ทบทวนวรรณกรรม Benzoyl peroxide และการรักษาสิว	29
ตาราง 3 ทบทวนวรรณกรรมความสัมพันธ์ Benzoyl peroxide และ <i>C. acnes</i>	33
ตาราง 4 ทบทวนวรรณกรรม <i>C. acnes</i> และ Measurement outcome	50
ตาราง 5 แบบฟอร์ม Baseline characteristic	58
ตาราง 6 แบบฟอร์ม MIZ	59
ตาราง 7 แบบฟอร์ม Susceptibility of <i>C. acnes</i> to Benzoyl peroxide by broth microdilution method	59
ตาราง 8 แบบฟอร์ม Time killing assay of <i>C. acnes</i> by Benzoyl peroxide	60
ตาราง 9 แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย	63
ตาราง 10 งบประมาณที่ใช้ในการวิจัย	64
ตาราง 11 ผลค่า MIZ ของ 2.5% BP, 5% BP และ 10% BP ต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา	68
ตาราง 12 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยคิดจากจำนวน isolates ที่ถูกยับยั้งได้	70
ตาราง 13 ผลการเปรียบเทียบค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา	72
ตาราง 14 เปรียบเทียบค่ามัธยฐานและค่าพิสัยควอไทล์ของค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ของ BP ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>C. acnes</i> (MIC) ของเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา	74
ตาราง 15 จำนวนและร้อยละของ isolate <i>C. acnes</i> ที่ถูกฆ่า (bactericidal) ด้วย BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ	76

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์ Cox proportional hazard regression analysis ของประสิทธิภาพใน
การฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10%..... 84



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด	5
ภาพประกอบ 2 <i>C. acnes</i> และการเกิดสิวอุดตัน (14)	11
ภาพประกอบ 3 สิวชนิดไม่อักเสบชนิด Closed comedone	13
ภาพประกอบ 4 สิวชนิดไม่อักเสบชนิด Open comedone	13
ภาพประกอบ 5 สิวชนิดอักเสบชนิด Papule	14
ภาพประกอบ 6 สิวชนิดอักเสบชนิด Nodules	14
ภาพประกอบ 7 สิวชนิดอักเสบชนิด Cyst	14
ภาพประกอบ 8 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่ใบหน้า โดย Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 6	15
ภาพประกอบ 9 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่ใบหน้า โดย Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 7 ถึง Grade 13	16
ภาพประกอบ 10 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่หลัง โดย Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 8	16
ภาพประกอบ 11 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่หน้าอก โดย Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 8	17
ภาพประกอบ 12 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวไม่อักเสบ Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 3	17
ภาพประกอบ 13 โครงสร้างสูตรเคมี Benzoyl peroxide (65)	28
ภาพประกอบ 14 โครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (66)	29
ภาพประกอบ 15 ถาด 96 หลุม (well plate)	44
ภาพประกอบ 16 Diffusion method	45
ภาพประกอบ 17 Antimicrobial gradient method	45

ภาพประกอบ 18 เทคนิคพอร์เพลต (ก) บีเบตสารละลายตัวอย่างใส่ในจานปลอดเชื้อ (ข) เทอาหาร วุ้นที่หลอมเหลวผสมกับสารละลายตัวอย่าง (ค) ลักษณะของอาหารวุ้นที่แข็งตัว และ (ง) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้น (84)	46
ภาพประกอบ 19 เทคนิคสเปรดเพลต (ก) การบีเบตสารละลายตัวอย่างลงบนผิวหน้าอาหารวุ้น (ข) การเกลี่ยสารละลายตัวอย่างด้วย spreader (84)	46
ภาพประกอบ 20 ปฏิกริยา oxidation ของ bacteria ต่อสาร resazurin ทำให้สารกลายเป็นสีชมพู	47
ภาพประกอบ 21 หลุมที่มีการเปลี่ยนแปลงของสี Resazurin	47
ภาพประกอบ 22 ขั้นตอนการวิจัย	55
ภาพประกอบ 23 Kaplan-Meier Survival Curve	60
ภาพประกอบ 24 การทดสอบ MIZ ของ BP ต่อ <i>C. acnes</i> แสดง plate วงใสการยับยั้งการ เจริญเติบโตต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> รหัส 24 ด้วย BP ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ผลการ ทดสอบ พบว่าวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบหลุมของ BP ความเข้มข้นที่ 2.5% (วงเบอร์ 4), 5% (วงเบอร์ 5) และ 10% (วงเบอร์ 6) ได้มากกว่า 4 มิลลิเมตร ดังลูกศรสีแดง แปลผลว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> รหัส 24	67
ภาพประกอบ 25 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> กลุ่มดื้อยา และไม่ดื้อยา	71
ภาพประกอบ 26 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) ของ BP ต่อเชื้อ <i>C. acnes</i> ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา	72
ภาพประกอบ 27 แสดง 96 well plate ในการทดสอบ MIC ของ BP ต่อ <i>C. acnes</i> โดยการพิจารณา ความเข้มข้นลงเรื่อย ๆ เพื่อดูว่าความเข้มข้นใดสามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยมีหลุมควบคุมซึ่งอยู่ ด้านขวาสุดของ plate 2 หลุม หลุมที่หนึ่งคือหลุมที่ไม่มีเชื้อ <i>C. acnes</i> และหลุมที่สองคือ หลุม ที่มีเชื้อ <i>C. acnes</i> แต่ไม่มี BP ซึ่งจะมีสีม่วงน้ำเงินและชมพูตามลำดับ.....	73
ภาพประกอบ 28 แสดง plate การเจริญเติบโตของ <i>C. acnes</i> ที่ระยะเวลา 1 นาที ผลทดสอบ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 5% และ 10% กับ <i>C. acnes</i> ที่ระยะเวลา 1 นาที พบว่าไม่มีการ เจริญเติบโตของเชื้อ <i>C. acnes</i> โดยเปรียบเทียบกับช่องเพาะเชื้อควบคุม (ลูกศรสีฟ้า) แปลผล	

ว่า BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ เมื่อสัมผัสเชื้อ <i>C. acnes</i> ที่เวลา 1 นาที.....	75
ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ของฤทธิ์การฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ <i>C. acnes</i> กลุ่มไม่ดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที	77
ภาพประกอบ 30 ความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ <i>C. acnes</i> กลุ่มดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ.....	79
ภาพประกอบ 31 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ <i>C. acnes</i> ชนิดดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ	81
ภาพประกอบ 32 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ <i>C. acnes</i> ชนิดดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ	83

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สิว (Acne vulgaris)

สิวเป็นโรคทางผิวหนังที่พบได้บ่อย เกิดจากการอักเสบเรื้อรังของหน่วยรูขุมขนและต่อมไขมัน มักเป็นตำแหน่งที่มีปริมาณต่อมไขมันอยู่หนาแน่น ได้แก่ หน้า หน้าอก และหลัง (1) พบมากในประชากรวัยรุ่นซึ่งมีอุบัติการณ์เป็นสิวจึงถึง 85% และ ผู้ใหญ่มีอุบัติการณ์ 21% ในสหรัฐอเมริกา (2, 3) และพบได้ 35-100% ของวัยรุ่นหลายประเทศทั่วโลก และยังเป็นโรคทางผิวหนังที่พบได้บ่อยเป็นอันดับ 8 ทั่วโลกอีกด้วย (4) ข้อมูลอุบัติการณ์ในประเทศไทยพบผู้ป่วยสิวมามากถึง 50-61%

สาเหตุการเกิดสิว (pathogenesis)

พยาธิสภาพการเกิดสิวมียหลายปัจจัย โดยปัจจัยหลักได้แก่ ผิวบริเวณรูขุมขนหนาตัวขึ้น (follicular hyperkeratinization) ซึ่งมีผลมาจาก ฮอโมนโดยเฉพาะแอนโดรเจน (androgen) การเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคสิว (microbial colonization) โดยมีเชื้อ *Cutibacterium acnes* (5) เป็นเชื้อหลักในการก่อโรค sebum production, และ complex inflammatory mechanisms เกิดเป็นการอักเสบของ pilosebaceous unit (6) และปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลร่วมด้วย เช่น พันธุกรรม สมดุลฮอโมน และ อาหาร เป็นต้น (2) สิวมีชนิด อักเสบ และไม่อักเสบ ลักษณะของสิวอักเสบได้แก่ ตุ่มนูนแดง ตุ่มหนอง เจ็บ ลักษณะของสิวไม่อักเสบได้แก่ ตุ่มนูนสีขาวหรือสีผิวหนัง และ ตุ่มที่มีจุดสีดำตรงกลาง (1)

การรักษาสิว (treatment)

การรักษาขึ้นกับระดับความรุนแรง การรักษาสิวมุ่งเน้นเพื่อรักษาสาเหตุต่าง ๆ ของการเกิดสิว ยับยั้งสารที่มีส่วนในกระบวนการอักเสบของสิว เช่น reactive oxygen species, leukotaxis, matrix-metalloproteinases, toll- like receptor 2, AP-1 เป็นต้น (2) สิวที่มีระดับรุนแรงน้อย คือยาทา ซึ่งประกอบด้วย Benzoyl Peroxide (BP), Retinoid หรือ เป็นยาทาร่วมกันระหว่าง BP และ ยาปฏิชีวนะ สิวรุนแรงระดับปานกลาง การรักษาหลักคือยาทา หรือ ยาร่วมร่วมกับ ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน สิวระดับรุนแรง การรักษา คือ ยารับประทานไอโซเตรติโนอิน (isotretinoin) หรือ ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานร่วมกับยาทาโดยยาหลักในการรักษาสิวชนิดนี้ได้แก่ Benzoyl peroxide และ Isotretinoin ซึ่งมักจะก่อให้เกิดผลข้างเคียงเช่น ระคายเคือง ผื่นแพ้

สัมผัส ผิวแห้งแดง ได้ และ ยาปฏิชีวนะชนิดทา หากทาเป็นยาเดี่ยว หรือใช้เป็นระยะเวลาสั้นก็จะเพิ่มโอกาสการการดื้อยาปฏิชีวนะได้ (7)

เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* (8) และสายพันธุ์มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดสิวโดยที่ปริมาณเชื้อไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิว

BP เป็นยารักษาหลักสำหรับสิวชนิดอักเสบ มีฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการสร้าง oxidative free radicals และเกิดปฏิกิริยา oxidative reaction กับ *C. acnes* มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) จึงมีประโยชน์ในการรักษาคนไข้สิวที่ดื้อยาปฏิชีวนะ ใช้น่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อลดการดื้อยา และสามารถใช้เป็นยาเดี่ยวในการรักษาสิว (monotherapy) ได้ (9)

นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบ และ comedolytic ซึ่ง BP มีหลายความเข้มข้นได้แก่ 1.25% 2.5% 5% และ 10% รูปแบบ เจล ครีม โฟมล้าง วิธีการทาโดยทั่วไปคือทาข้ามคืน แต่เนื่องจากผลข้างเคียงจากยาทำให้ในเวชปฏิบัติแพทย์แนะนำวิธีการใช้ยา คือ ทาทิ้งไว้ 5-15 นาทีแล้วล้างออก (10) เนื่องจากระยะเวลาการทายามีหลากหลาย และยังไม่มียหลักฐานข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับระยะเวลาการทายาที่เหมาะสมหรือระยะเวลากับความเข้มข้นของ BP ที่น้อยที่สุดที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการรักษาสิว ซึ่งระยะเวลาที่ไม่ชัดเจนนี้ส่งผลให้เกิด การรักษาสิวที่ล้มเหลว เนื่องจากคนไข้ไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงอันได้แก่ แสบ แดง คัน ยาติดเสื้อผ้า และเมื่อใช้ในระยะเวลาสั้นจะมีผลข้างเคียงได้แก่ หน้าเป็นขุย และหน้าแห้ง ได้ หรือการรักษาที่ไม่สัมฤทธิ์ผล ซึ่งอาจสัมพันธ์กับระยะเวลาการทาที่น้อยเกินไป ทั้งนี้ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ BP สัมผัสเชื้อและความเข้มข้นของ BP กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ดังนั้นหากมีข้อมูลที่แน่นอนเกี่ยวกับระยะเวลาที่ BP ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* จะทำให้ได้ข้อมูลในการใช้ยา BP อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจทดสอบความสัมพันธ์ ของ BP ความเข้มข้นต่าง ๆ กับระยะเวลาที่ยาสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* แล้วมีผลฆ่าเชื้อในหลอดทดลอง

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก (Primary research question)

ระยะเวลาที่แตกต่างกันของเบนโซิลเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% มีผลต่อการฆ่าเชื้อ คิวติแบคทีเรียมแอคเน ในหลอดทดลอง โดยวัดจากค่า การเจริญเติบโตของเชื้อ

คำถามรอง (Secondary research question)

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ คิวติแบคทีเรียแอกเน่ ของสารเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ในหลอดทดลอง โดยอ่านจากค่า MIZ (minimal inhibition zone)

2. ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ Benzoyl peroxide ในการยับยั้งเชื้อคิวติแบคทีเรียแอกเน่ โดยอ่านจากค่า MIC (minimal inhibition concentration)

3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพ ในการฆ่าเชื้อ คิวติแบคทีเรียแอกเน่ ชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา ด้วยสารเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในหลอดทดลอง โดยวัดจากการเจริญเติบโตของเชื้อ

วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% สัมผัสกับเชื้อ คิวติแบคทีเรียแอกเน่ ชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา และมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ในหลอดทดลอง

สมมติฐานของงานวิจัย

ความเข้มข้นของ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ ที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ที่สัมผัสกับเชื้อ คิวติแบคทีเรียแอกเน่ ที่ระยะเวลาต่างกัน มีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อ

ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อสิวชนิด คิวติแบคทีเรียแอกเน่ ทั้งที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาปฏิชีวนะจำนวน 70 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยสิวที่เป็นตัวแทนของประชากรในประเทศไทย จากงานวิจัยของ Laochusuwan A.(SWUEC/E-272/2559) โดยทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ที่เวลาหลังสัมผัสยา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ซึ่งทดสอบว่าที่ระยะเวลาใดสามารถฆ่าเชื้อได้โดยวิธี drop plate และแปลผลจากการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยขั้นตอนดังนี้

1. ศึกษาประสิทธิภาพบริเวณการยับยั้งเชื้อของสารเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Cutibacterium acnes* โดยวิธี agar well diffusion assay

2. ศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Cutibacterium acnes* ทั้งชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ และไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี broth microdilution test

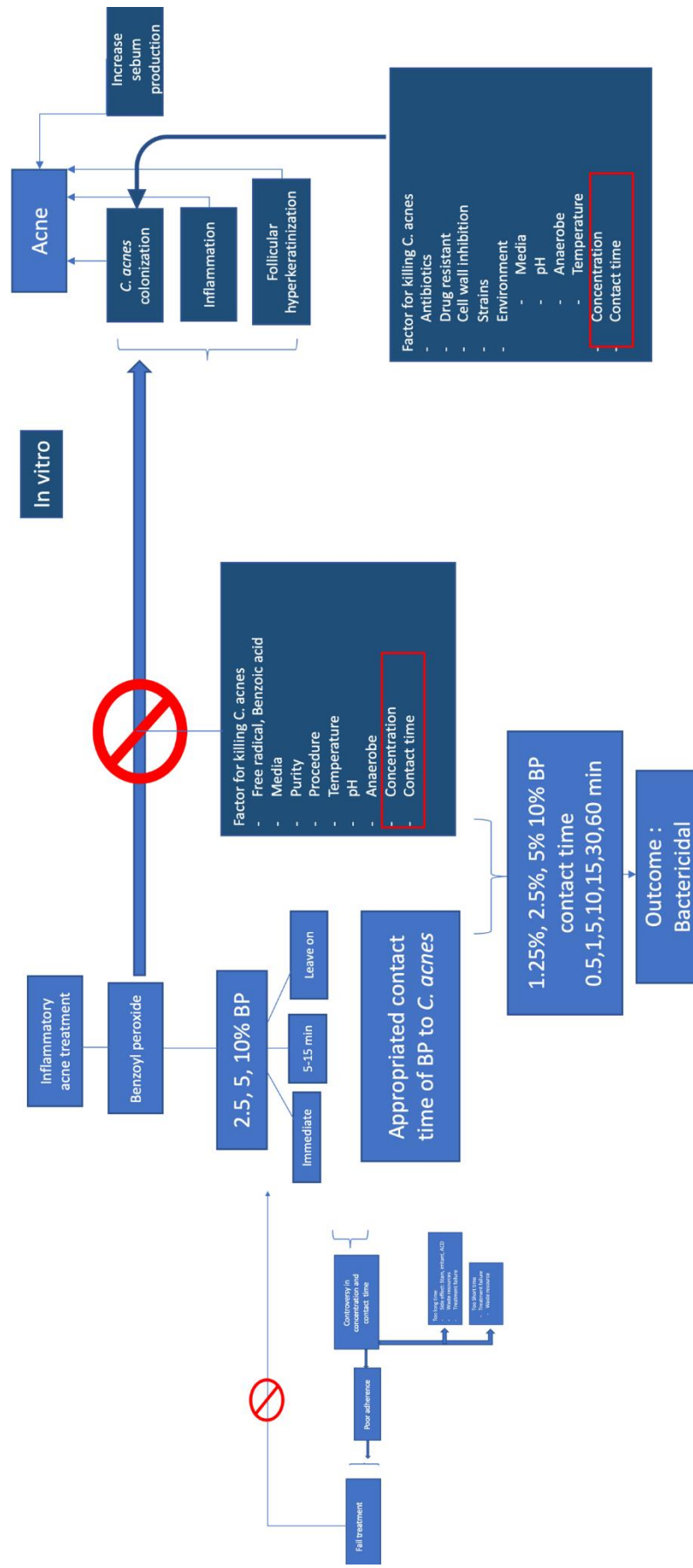
3. ศึกษาระยะเวลาที่ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% สัมผัสเชื้อ *Cutibacterium acnes* และฆ่าเชื้อโดยวัดที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที และแปลผล ระยะเวลาที่สามารถฆ่าเชื้อได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลระยะเวลาที่ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ใช้ในการฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes* ในหลอดทดลอง

2. ข้อมูลเชิงประจักษ์ของ เวลาอย่างน้อยที่สุดของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ ในการทำเพื่อลดเชื้อ *Cutibacterium acnes* ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาสิว และลดอุบัติการณ์การรักษาสิวด้วยเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ที่ล้มเหลว และลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการทายาด้วยระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมจากเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์

กรอบแนวคิด



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารรวมถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. สิว (Acne vulgaris)
2. *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) และการเกิดสิว
3. การรักษาสิว (Treatment of acne) และ Benzoyl peroxide
4. Benzoyl peroxide และ *Cutibacterium acnes*
5. การทดสอบประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรีย *C. acnes* และการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งเชื้อ

1. สิว (Acne vulgaris)

เป็นการอักเสบของหน่วยรูขุมขน มักเกิดบริเวณที่มี หน่วยรูขุมขน (pilosebaceous gland) หนาแน่น ได้แก่ หน้า หน้าอก หลัง (11) ลักษณะอาการแบบไม่อักเสบ ได้แก่ ตุ่มนูนสีขาวหรือ ตุ่มหัวดำ และลักษณะสิวกอักเสบ ได้แก่ ตุ่มนูนแดง ตุ่มหนอง หรือ ก้อนนูน ซึ่งหลังจากการหายของสิวกก็จะเป็นแผลเป็นตามมาได้ แม้ว่าสิวเป็นโรคที่ไม่ร้ายแรงแต่ส่งผลกระทบต่อรูปลักษณ์ภายนอก และผลกระทบต่อจิตใจความมั่นใจในตนเอง การเข้าสังคม ของคนไข้และยังมีวิจัยที่ชี้ให้เห็นความสัมพันธ์ของการเป็นสิวกกับปัญหาของการตงงานอีกด้วย ดังนั้นในแต่ละปีจึงมีการจ่ายเงินจำนวนมากเพื่อรักษาสิวนั่นเอง (4)

ระบาดวิทยา

สิวเป็นโรคทางผิวหนังที่พบได้บ่อยอันดับ 8 ของโลก พบได้ทุกช่วงอายุโดยมีฮอร์โมนเป็นปัจจัยกระตุ้นสำคัญโดยเฉพาะฮอร์โมนเพศชาย ดังนั้นจึงพบการเป็นสิวกได้มากที่สุดในช่วงวัยรุ่น และผู้ชายมากกว่าผู้หญิง (4) พบในคนผิวขาวมากกว่าผิวสี (12)

สาเหตุปัจจัยและพยาธิกำเนิด (13)

1. Follicular hyperkeratinisation

ผิวหนังบริเวณรูขุมขนส่วน infundibulum หนาตัวขึ้น และมีการยึดติดระหว่างเซลล์ผิวหนังมากขึ้น ทำให้เกิดการอุดตันบริเวณ ostium เมื่อมีการอุดตันก็จะมีสารสะสมของ sebum, keratin และ แบคทีเรีย หลัง proinflammatory cytokine เกิดเป็น comedone โดยปัจจัยสำคัญที่

กระตุ้นการหนาตัวของผิวหนังบริเวณนี้ ได้แก่ *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) ที่กระตุ้นการหลั่ง IL-1 α , DHT (Dihydrotestosterone), และ Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-2 (14)

2. Sebum production (15)

การทำงานของต่อมไขมันที่มากขึ้น ปริมาณ sebum ที่สูงทำให้สภาวะของหน่วย รุขุมขนเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *C. acnes* และ follicular corneocytes sebum ที่ สร้างจากต่อมไขมัน มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ triglycerides และ lipoperoxide ซึ่ง *C. acnes* จะกระตุ้นให้ triglyceride กลายเป็น free fatty acids ซึ่งเป็นไขมันที่ช่วยการเจริญเติบโตของ *C. acnes* ร่วมกันแล้วกับสภาวะ seborrhea จาก sebum จะกระตุ้นให้เกิด microcomedone และพัฒนาเกิดเป็นสิวนิดอักเสบและไม่อักเสบต่อไป

ส่วน lipoperoxide ก็กระตุ้น peroxisome proliferative-activated receptor (PPAR) ที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ ปัจจัยกระตุ้นการสร้าง sebum ได้แก่ ฮอโมน androgen, ฮอโมน Corticotropin-releasing ซึ่งถูกกระตุ้นโดย stress, 5- α Reductase ซึ่งเป็น enzyme ที่เปลี่ยน testosterone เป็น DHT ส่วน estrogen เป็นฮอโมนที่มีฤทธิ์ ลดการสร้างของ sebum (14)

3. Inflammation in acne

กระบวนการอักเสบของสิวนั้นเกิดขึ้นทั้งใน สิวที่มีลักษณะอาการชนิด ไม่อักเสบ และชนิดอักเสบ เมื่อ microcomedone มีการแตก ภายใน 24 ชั่วโมงจะเริ่มเกิดกระบวนการ อักเสบโดย CD4+ CD8+ lymphocyte มารวมตัวรอบ รุขุมขน และหลังจากนั้น 1-2 วันจะมีเซลล์ neutrophil บริเวณรอยโรค แต่กระบวนการอักเสบนั้นไม่ได้เกิดตามหลัง สิวชนิดไม่อักเสบเท่านั้น จากการศึกษาของ Do et al โดยการศึกษาติดตามคนไข้สิว 25 คนทุก 2 สัปดาห์ เพื่อติดตาม การเปลี่ยนแปลงของรอยโรคสิว จำนวน 3,099 รอยโรค 28% ของ inflammatory lesion ไม่มี non-inflammatory lesion มาก่อน จากการศึกษาของ Norris และ Cunliffe โดยการตัดชิ้นเนื้อบริเวณ ที่เป็นสิวที่มีการดำเนินโรคภายใน 6-72 ชั่วโมง พบ lymphocyte perivascular infiltrate และ polymorphonuclear leukocyte ซึ่งบ่งบอกถึง inflammatory process ในชั้นเนื้อของสิวนิด ไม่อักเสบ จึงสรุปได้ว่า inflammatory process เกิดขึ้นในระยะเริ่มต้นและท้ายของเกิดสิว ซึ่ง สอดคล้องกับยารักษาหลายชนิดที่มีฤทธิ์ anti-inflammation และสามารถรักษาสิวชนิดไม่อักเสบ และอักเสบได้ เช่น Dapsone (14) มีฤทธิ์ยับยั้ง IL-8, neutrophil recruitment และ topical retinoid มีฤทธิ์ยับยั้ง TLR2 และ IL-10

4. *Cutibacterium acnes* and immune system (14, 16)

C. acnes เป็นแบคทีเรียชนิด anaerobic แกรมบวกที่อาศัยประจำถิ่นที่ต่อมไขมัน ทำหน้าที่กำจัดและป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญเติบโตและเกิดการอักเสบหรือติดเชื้อตามมา แต่ในทางกลับกัน หาก *C. acnes* มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น หรือ เสียสมดุลก็จะเกิดการอักเสบและสิว ได้ *C. acnes* ชอบสภาพแวดล้อมที่มีความมัน ซึ่งความมันก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดสิว โดยพบว่าผิวหนังของคนไข้สิว มีปริมาณ *C. acnes* มากกว่า ผิวหนังของ healthy skin ถึง 100 เท่า โดย *C. acnes* สายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการเกิดสิวได้แก่ IA1, IC, Phylotype IB-1, IB-2, IB-3, Phylotype IA-1, IA-2 ribotype 1, 4, 5 subgroup *C. acnes* ก่อให้เกิดสิ้วผ่านกระบวนการกระตุ้นการอักเสบทั้งผ่าน innate immunity และ adaptive immunity กระตุ้น proliferative ของ follicular keratinocyte และ การสร้าง sebum โดย *C. acnes* ที่สัมพันธ์กับการเกิดสิ้วจะกระตุ้นการสร้าง sebum กระตุ้น adaptive immunity ผ่าน T helper 1 (Th1) และ Th17 *C. acnes* ผ่าน activation of toll-like receptor บน ผิวเซลล์ของ inflammatory cell (TLR-2) (17) ทำให้เกิด inflammatory process โดยกระตุ้น IL-12, IL-8, β -defensin-2 ซึ่งเป็น antimicrobial peptides ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ *C. acnes* ยังกระตุ้นให้เกิด delay-type hypersensitivity เพิ่มการสร้าง lipase, hyaluronidase, chemostatic factors และ protease ซึ่ง protease จะกระตุ้น keratinocyte ให้หลั่ง protease-activates receptor 2 (PAR-2) ทำให้เกิดการหลั่ง proinflammatory cytokine ต่าง ๆ เช่น IL- α , IL-8, TNF- α , MMP และ IL37 เป็นต้น งานวิจัยของ Trivedi และคณะ ศึกษาเกี่ยวกับ gene expression ที่มีผลต่อการแสดงของ β -defensin-2 พบว่า บริเวณที่มีสิ้วอักเสบ มีปริมาณของ gene expression มากถึง 33 เท่าเทียบกับ บริเวณที่ไม่มีสิ้ว และ ผิวหนังของคนที่ไม่มียโรค ส่วน *C. acne* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดสิ้วก็จะกระตุ้นการหลั่ง IL-10 ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเกิด inflammatory response แต่ทั้งนี้ ปริมาณ *C. acnes* ไม่ได้สัมพันธ์กับความรุนแรงของการอักเสบของสิ้ว เห็นได้ว่าภาวะสมดุลของสิ่งมีชีวิตบนผิวหนัง (Skin microbiota) มีความสำคัญกับการเกิดกระบวนการอักเสบ โรคผิวหนังอักเสบรวมถึงสิ้ว (18) การลดปริมาณ *C. acnes* อาจทำให้อาการสิ้วดีขึ้นแต่ไม่ใช่หลักการรักษาหลัก การรักษาสิ้วมุ่งเน้นเพื่อลดการอักเสบ (19)

5. The cutaneous microbiome

ผิวหนังและ appendage มีสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลและเป็นเกราะป้องกัน ส่งเสริมการทำงานของ innate immunity (cutaneous microbiome) โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะรักษาสมดุลซึ่งกันและกัน เช่น *C. acnes* ทำหน้าที่รักษาสมดุล pH ของต่อมไขมันโดยสร้าง

triglycerides และ สร้าง propionic acid ยับยั้งการโตของ *S. aureus* และ *S. pyogenes* ในขณะเดียวกัน *Staphylococcus epidermidis* ก็ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. acnes* ยับยั้งการกระตุ้นของ *C. acnes* ให้ keratinocyte หลั่ง IL-6, TNF- α ดังนั้นหากเชื้อประจำถิ่นหากมีความเสียสมดุล (dysbiosis) เชื้อประจำถิ่นเองก็จะก่อให้เกิดโรคได้นอกจาก *C. acnes* เช่น *Malassezia furfur* (seborrheic dermatitis) และ demodex (rosacea) เป็นต้น เมื่อเกิด dysbiosis จะกระตุ้น TLR2, MMP, IL-8 MMP 9 เกิด inflammation (18)

6. Oxidative stress and acne

Oxidative stress เกิดจากความไม่สมดุลของ prooxidant และ antioxidant ปัจจัยที่กระตุ้นการเกิด oxidative stress บนผิวมีทั้ง exogenous เช่น อาหาร มลภาวะ เครื่องสำอาง physiological aerobic metabolism และ pathological inflammatory process เป็นต้น endogenous factor เช่น อายุ พันธุกรรม เป็นต้น oxidative stress มีความสัมพันธ์กับโรคทางผิวหนังหลายชนิด เช่น Atopic dermatitis, Seborrheic dermatitis, Rosacea, Chronic venous ulcer, และ Acne คนไข้สิว เมื่อ sebaceous gland สร้าง sebum ร่วมกับการสะสมของสารต่าง ๆ bacteria และ keratin เกิดการทำลายของ follicular wall ทำให้เกิดการหลั่ง reactive oxygen species (ROS) กระตุ้นให้เกิด lipid peroxidation product เป็น Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่บ่งบอกถึง oxidative stress เกิด inflammatory process และ comedogenic ตามมา นอกจากนี้ *C. acnes* ที่กระตุ้น chemotactic factor และ neutrophil accumulation สารเหล่านี้กระตุ้นให้ keratinocyte ปล่อย ROS โดยปกติร่างกายจะมี antioxidant system ทั้ง enzymatic antioxidant และ non-enzymatic antioxidant เพื่อรักษาสมดุลไม่ให้เกิดการอักเสบ ป้องกันกระบวนการ lipid peroxidation บนผิวเซลล์ ที่ก่อให้เกิดสิว โดย enzymatic antioxidant ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) non-enzymatic antioxidant ได้แก่ ascorbic acid, glutathione (GSH), ubiquinol, uric acid, vitamin A, vitamin E, melanin, carotenoid, lutein, zeaxanthin, sulfhydryl, flavonoid, co-enzyme Q10 เป็นต้น บนผิวหนังจะมีความเข้มข้นของ antioxidant มากที่สุดบริเวณ epidermis จากการศึกษาของ Ozer Arican et al พบว่าในคนไข้สิwtทั้งชนิดอักเสบและไม่อักเสบ มีปริมาณสารในเม็ดเลือดแดงที่บ่งบอก Oxidative stress มากขึ้น และ antioxidative enzyme ในเม็ดเลือดแดงที่ลดลงเทียบกับ control group อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาของ Basak PY พบว่าในคนไข้สิwtมีการทำงานของ GPX และ SOD ในเม็ดเลือดขาวลดลง และมี TBARS และ MDA ใน serum เพิ่มขึ้น

การศึกษาของ Ozturk P พบว่า ปริมาณ Adenosine deaminase (ADA) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของ lymphocyte และ T cell activity จึงเป็น marker ที่บ่งบอก infectious disease และ MDA เพิ่มขึ้นชัดเจนในรอยโรคผิวหนังและสัมพันธ์กับความรุนแรงของผิวหนังอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า vitamin E และ Zinc ใน serum มีปริมาณลดลง และสัมพันธ์กับความรุนแรงของผิวหนังจึงมีการศึกษามากมายในการใช้ anti-oxidant เช่น vitamin C, zinc, nicotinamide ในรูปแบบกินและทาใช้ในการรักษาผิวหนัง (20)

2. *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) และการเกิดสิว

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) ชื่อเดิม *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) จัดอยู่ใน Actinobacteria phylum อาศัยหนาแน่นในรูขุมขน ที่มีความมัน (lipid-rich sebaceous follicle) บนผิวหนัง โดยมีปริมาณในผิวหนังประมาณ <2% *C. acnes* ทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น ป้องกันเชื้อก่อโรค โดย *C. acnes* มีคุณสมบัติ ย่อยสลาย triglycerides ใน sebum ให้เป็น propionic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) ซึ่งมีคุณสมบัติปรับความเป็นกรด ด่าง (pH) จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *C. acnes* ในเนื้อเยื่อของประชากรที่เป็นสิว และประชากรผิวสุขภาพดี พบว่าปริมาณของ *C. acnes* ไม่ได้สัมพันธ์กับการเกิดสิว แต่เป็นสายพันธุ์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดสิว การศึกษาของ Kwon และคณะ โดยวิธีการ วิเคราะห์ทาง metagenomic พบว่า *C. acnes* division phylotype IA1 มีความสัมพันธ์กับการเกิดสิว ในขณะที่สายพันธุ์ II สัมพันธ์กับผิวสุขภาพดี เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มี deletion ของ lipase activity ส่วน gene phylotype III และ phylotype IB สัมพันธ์กับการติดเชื้อฉวยโอกาสของเนื้อเยื่อชั้นลึก ในรอยโรคที่เป็นตุ่มหนอง ปริมาณเชื้อ proteobacteria ลดลง แต่ ปริมาณ *Staphylococcus* และ *Cutibacterium spp.* เพิ่มขึ้นตามลำดับ BP ที่มีฤทธิ์ต้าน *C. acnes* จึงมีความสำคัญในการสร้างสมดุลของ microbiome บนผิวหนัง (21)

C. acnes และการเกิดสิวอักเสบ

C. acnes ออกฤทธิ์กระตุ้น การอักเสบ ที่ keratinocyte และ sebaceous gland ผ่าน Protease, Lipases, Chemotactic factors ซึ่งกระตุ้น ROS ทำให้เกิดการอักเสบ และ *C. acnes* กระตุ้น innate immunity ผ่าน toll-like receptor (TLR) antimicrobial peptide (AMP), Protease-activated receptors (PAR) และ matrix metalloproteinase (MMP) โดยสารต่าง ๆ ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ ดังนี้

คนไข้สิวจะพบปริมาณ CD4+ T cell และ macrophage มากขึ้นบริเวณ follicle เกิดจาก *C. acnes* กระตุ้น cellular immunity ผ่านทาง HLA-DR, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin

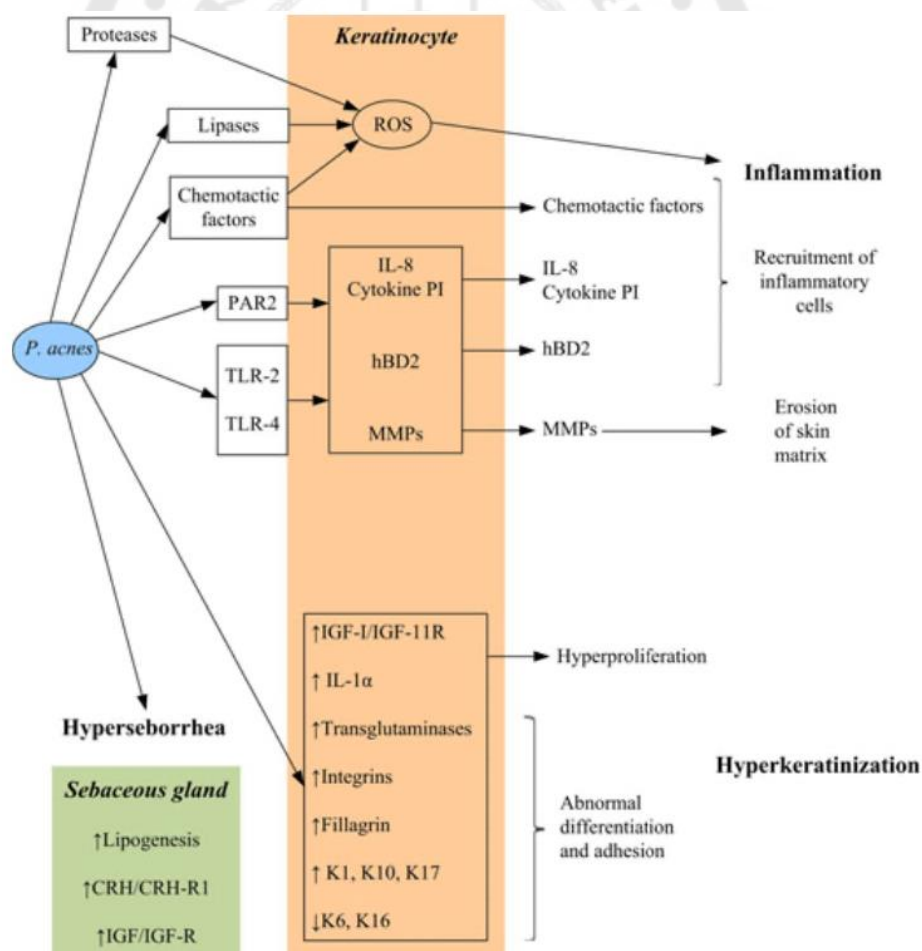
โปรตีนจาก *C. acnes* กระตุ้นให้ keratinocyte และ macrophage แสดง TLR-2 และ TLR-4 ซึ่งจะทำให้ keratinocyte หลั่ง proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α) ส่งผลต่อการทำงานของ neutrophils เกิด recruitment inflammatory cell

MMP กระตุ้นให้ dermal fibroblast หลั่ง proMMP-2 ผ่าน TNF α ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการ rupture ของ follicle และ เกิดการกระจายของ inflammation ไปถึงชั้น dermis

C. acnes กระตุ้น complement และ humoral immunity โดยพบว่าสามารถตรวจพบ anti- *C. acnes* IgG levels สูงขึ้นในคนไข้สิว

C. acnes และการเกิดสิวอุดตัน

C. acnes กระตุ้นให้ keratinocyte หลั่ง IL-1 (Interleukin 1), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) และ IGF-1R ซึ่งทำให้เกิด proliferation ของ epidermal keratinocyte (14, 22)



ภาพประกอบ 2 *C. acnes* และการเกิดสิวอุดตัน (14)

Benzoyl peroxide (BP) และการลดกระบวนการอักเสบ

ปริมาณ Ki-67, integrin α_2 , α_3 , α_6 , innate immune (TLR-2, β -defensin4, IL-8) ซึ่งเป็นสิ่งบ่งบอก inflammation process ที่จะพบบริเวณที่เป็นสิว จากการศึกษาของ Tomas Z. และคณะพบว่า ยาทา BP ร่วมกับ adapalene ออกฤทธิ์ down regulation การแสดงออกของ TLR2 จาก keratinocyte ลดปริมาณ inflammatory cytokine อย่างมีนัยสำคัญโดยวัดจากชิ้นเนื้อบริเวณสิว โดยวิธี immunohistochemistry (23, 24)

สาเหตุการเกิดสิวจากภายใน

เชื้อชาติและพันธุกรรม

อุบัติการณ์การเกิดสิวจะเพิ่มขึ้นในคนไข้ที่มีประวัติบิดามารดาเป็นสิว โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ไขมันโลหิตสูง และหากบิดามารดาเป็นสิวนิรันดร์แรงก็จะเพิ่มโอกาสการเป็นสิวนิรันดร์แรงของคนไข้อีกด้วย คนผิวขาวและคนผิวมัน มีอุบัติการณ์เกิดสิวมากกว่าคนผิวสีและผิวแห้ง

ฮอร์โมน

ฮอร์โมนเพศมีผลต่อสิวทำให้ พบอุบัติการณ์การเกิดสิวได้มากช่วงวัยรุ่น เพศชาย และเด็กที่มีความสูงในเปอร์เซ็นต์ไทล์ 33-100 มากกว่า เด็กที่มีความสูง น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 33 คนไข้ที่มีภาวะขนดกจากอิทธิพลของฮอร์โมน และในทางกลับกันอุบัติการณ์การเกิดสิวงก็จะลดลงในสตรีหมดประจำเดือน

สาเหตุการเกิดสิวยานอก

โรคประจำตัว ผู้ป่วยที่มีภาวะ เครียดความผิดปกติทางจิตวิทยา อาหารและยาการใช้ยาที่มีส่วนประกอบของฮอร์โมนเพศ หรือกระตุ้นกล่อมเนื้อ จะสัมพันธ์กับการเกิดสิว แต่การกินยาคุมกำเนิดจะลดอุบัติการณ์การเกิดสิว การบริโภคผลิตภัณฑ์และส่วนประกอบจากนม การดื่มนมมากกว่า 2 แก้วต่อวัน กินไอศกรีม มากกว่า 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ขนம்ப้างขาวมากกว่า 350 กรัมต่อวัน กินอาหารที่มีไขมันมากกว่า 100 กรัม 2-4 ครั้งต่อสัปดาห์ อาหารทะเล น้ำผลไม้ ดื่มน้ำอัดลมทุกวัน กินน้ำตาลมากกว่า 100 กรัมต่อวันสัมพันธ์กับอุบัติการณ์การเกิดสิว การกิน 99% ดาร์กช็อกโกแลต 4 สัปดาห์ สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิว โดยอธิบายความสัมพันธ์ว่า ใน cocoa butter มี oleic acid ซึ่งเป็นกรดที่มีผลต่อการหนาตัวของผิวหนัง (keratinization) กระตุ้นให้เกิดสิวดูตัน (25) แต่การบริโภคปลา มากกว่า 100 กรัม 2-4 ครั้งต่อสัปดาห์ กินผักและผลไม้ 250 กรัมอย่างน้อย 2-3 ครั้งต่อวัน การกินอาหารเมดิเตอร์เรเนียน อุบัติการณ์การเกิดสิวน้อยกว่าคนที่ไม่กิน และอาหารสำหรับลดความอ้วนเช่น ขนம்ப้างโฮลวีท ไข่ สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิวน้อยกว่าการไม่กิน ค่า BMI ยังไม่แน่ชัดสำหรับความสัมพันธ์ของ Overweight, normal BMI เทียบกับ under weight มี

หลายงานวิจัยสรุปว่า โรคอ้วนและ BMI ที่มากขึ้นสัมพันธ์กับการเกิดสิวโดยอธิบายจากกลุ่มคนเหล่านี้มักจะมี glycaemic load และ androgen hormone ที่สูง ซึ่งสัมพันธ์กับ sebum production และกระตุ้นให้เกิดสิว สภาพความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมของผิวหนังมีความสำคัญต่อการป้องกันผิวจากการอักเสบและ ติดเชื้อ เชื้อ *C. acnes* เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะ pH 6.0-7.0 ดังนั้น การใช้สารเคมี เครื่องสำอาง สารทำความสะอาด ยาปฏิชีวนะชนิดทา และ บนผิวหนัง สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิว (26) ส่วนการสูบบุหรี่ การใช้กัญชา สารเสพติด ช่วงเวลาการนอนหลับที่น้อย การโดนแสงแดด สภาพอากาศที่มีความร้อนชื้น ความถี่ของการล้างหน้าไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิว

การศึกษาและสถานะทางเศรษฐกิจและสังคม มีการศึกษาจำนวนปีที่เรียนหนังสือ สถานะทางเศรษฐกิจและสังคม พบว่าไม่ได้ส่งผลต่อการเกิดสิวชัดเจน แต่คนที่ทำงานในสำนักงาน อาคาร (office worker) มีโอกาสการเกิดสิวน้อยกว่าคนว่างงาน (4)

อาการและอาการแสดง

ลักษณะทางคลินิกแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ สิวชนิดไม่อักเสบ และสิวชนิดอักเสบ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สิวชนิดไม่อักเสบ คือ สิวที่เกิดจากการอุดตันของรูขุมขนมี 2 ชนิด ได้แก่

- Closed comedone ลักษณะตุ่มเล็กสีขาวเห็นชัดเมื่อตริ้งผิวหนังหรือคลำ (3)



ภาพประกอบ 3 สิวชนิดไม่อักเสบชนิด Closed comedone

- Open comedone ลักษณะตุ่มเล็กมีรูเปิดและมีก้อนสีดำอุดอยู่ (3)



ภาพประกอบ 4 สิวชนิดไม่อักเสบชนิด Open comedone

ลักษณะที่สังเกตเห็นได้แก่

- Papule ตุ่มสีแดงขนาดเล็ก (27)



ภาพประกอบ 5 ลักษณะที่สังเกตเห็น Papule

- Pustule ตุ่มหนองชนิดตื้นและลึก
- Nodules ก้อนสีแดงภายในมีหนองปนเลือด ภายในอาจมีหลายหัว (27)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะที่สังเกตเห็น Nodules

- Cyst ก้อนนูนแดง ภายในมีหนองปนเลือด (3)



ภาพประกอบ 7 ลักษณะที่สังเกตเห็น Cyst

การจัดระดับความรุนแรงของสิว ตามเกณฑ์ของลีดส์ (Leeds revised acne grading system) (28)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุดโดยใช้หลักเกณฑ์การถ่ายภาพมากกว่าการเปรียบเทียบเชิงคุณภาพ เดิมได้มีการคิดค้นเทคนิคนี้ 1984 และมีการปรับปรุงใหม่ 1998 โดยแบ่งเป็น ความรุนแรง 0-12 โดย 0 คือไม่มีสิว 12 คือรุนแรงที่สุด โดยแบ่งกลุ่มย่อยอีก 7 กลุ่ม ความรุนแรง 0-2 ห่างกัน 0.25

The Photo-numeric scale

- สิวเล็กน้อย (mild acne) มีสิวนิดไม่อักเสบ เป็นส่วนใหญ่ หรือสิวกักเสบชนิด papules หรือ pustules ไม่เกิน 10 จุด
- สิวปานกลาง (moderate acne) มีสิวกักเสบชนิด papule และ pustule ขนาดเล็กจำนวนมากกว่า 10 จุด และ/หรือ มี nodule น้อยกว่า 5 จุด
- สิวรุนแรง (severe) มีสิวกักเสบชนิด papule และ pustule มากมาย มี nodule หรือ cyst เป็นจำนวนมาก



ภาพประกอบ 8 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่ใบหน้า โดย Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 6



ภาพประกอบ 9 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่ใบหน้า โดย Leeds revised grading scale ที่
ระดับ Grade 7 ถึง Grade 13

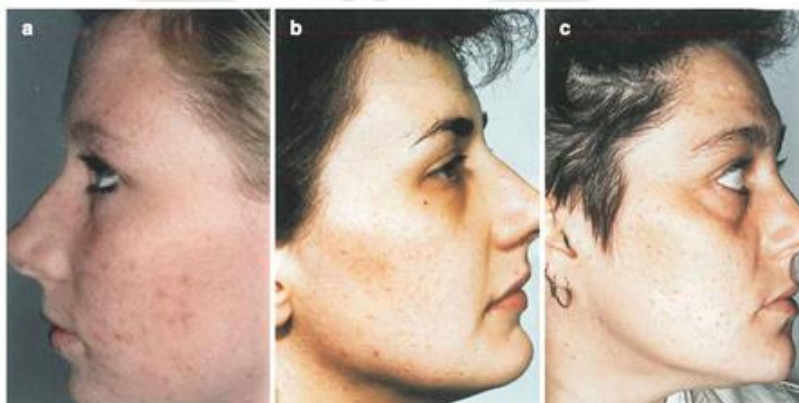


ภาพประกอบ 10 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่หลัง โดย Leeds revised grading scale ที่
ระดับ Grade 1 ถึง Grade 8



ภาพประกอบ 11 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวที่หน้าอก โดย Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 8

โดยความรุนแรงของสิวนี้ไม่ได้รวมถึงสิวที่กระจายตัวไม่สม่ำเสมอในตำแหน่งอื่น ๆ เช่น จมูก คาง บริเวณไฝ และคาง ที่มีสิวแบบไม่สม่ำเสมอ และมีความรุนแรงมาก เช่น nodulocystic ก็ไม่จำเป็นต้องจัดให้อยู่ในกลุ่มนี้ คนไข้ส่วนใหญ่จะมีสิวอักเสบมากกว่า สิวไม่อักเสบ ดังนั้น Leeds grading จึงไม่นำ สิวไม่อักเสบมาเป็นเกณฑ์ในการวัดความรุนแรง แต่สิวไม่อักเสบก็สามารถวัด Grade 1-3



ภาพประกอบ 12 ระดับความรุนแรงของการเป็นสิวไม่อักเสบ Leeds revised grading scale ที่ระดับ Grade 1 ถึง Grade 3

การพยากรณ์โรค

สิวสัมพันธ์กับฮอร์โมนเพศจึงพบมากในผู้หญิงอายุ 14-17 ปี และผู้ชายในช่วง 16-19 ปี และมักจะหายไปในช่วงอายุ 20-25 ปี เนื่องจากมีฮอร์โมนเพศลดลง 15% ของผู้ป่วยสิว เป็นสิวนิรันดร์แรง (1)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ตรวจทางห้องปฏิบัติการกรณีที่แยกโรคอื่นตามลักษณะอาการที่ตรวจได้ต่อไปนี้

- มีอาการ Hyperandrogenism เช่น ผู้หญิงขนคดบริเวณที่ขนฮอร์โมนเพศชายประจำเดือนผิดปกติ เสียงห้าว ศีรษะล้านแบบผู้ชาย
- รูขุมขนอักเสบจาก สาเหตุอื่น เช่น gram negative folliculitis, pityrosporum folliculitis โดย ทำ pus smear และย้อมพิเศษ

การวินิจฉัยโรค

วินิจฉัยโรคโดยลักษณะอาการทางคลินิกโดยจะตรวจเพิ่มเติมเพื่อ แยกโรคที่สงสัยอื่น ๆ

1. Microbiologic testing

แม้ว่า *C. acnes* จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดสิวแต่การลดจำนวน *C. acnes* เพียงอย่างเดียวก็อาจจะไม่ใช่วิธีในการรักษาสิวโดยทั่วไปจึงไม่มีการตรวจหาเชื้อ *C. acnes* เพื่อวินิจฉัยโรค แต่จะนำตุ่มหนองไปตรวจหาแยกโรคเมื่อนึกถึงกลุ่ม Gram-negative folliculitis ซึ่งคนไข้กลุ่มนี้มักมีประวัติกินยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน

2. Endocrinology testing

Androgen เป็นฮอร์โมนเพศที่สำคัญต่อการเกิดสิว ดังนั้น คนไข้ที่มีอาการที่บ่งบอกถึงภาวะ Hyperandrogen ร่วมด้วย ในเด็กก่อนวัยเจริญพันธุ์ อาการที่แสดงภาวะ Hyperandrogen ได้แก่ มีกลิ่นตัว มีขนบริเวณอวัยวะเพศหรือรักแร้ หรือ การเจริญของอวัยวะเพศที่เร็วกว่ากำหนด ในหญิงวัยกลางคนอาการที่แสดงภาวะ Hyperandrogen ได้แก่ หัวล้านจากฮอร์โมนเพศชาย ประจำเดือนไม่สม่ำเสมอ ขนคด infertile สิวที่ลำตัว clitoromegaly และถุงน้ำในรังไข่ หากมีลักษณะอาการดังกล่าวพิจารณาตรวจฮอร์โมนคนไข้เพิ่มเติม การตรวจคัดกรองทั่วไปประกอบด้วย Testosterone, Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), Androstenedione, Luteinizing hormone, และ Follicle-stimulating hormone

โรคผิวหนังที่คล้ายสิว ได้แก่

- Folliculitis เช่น pityrosporum folliculitis, gram negative folliculitis, eosinophilic folliculitis, pustular folliculitis (Ofuji's disease)
- Acne rosacea
- Acneiform drug eruption

3. การรักษาสิว และ Benzoyl peroxide (2)

การรักษาเฉพาะที่ (topical treatment)

1. Benzoyl peroxide (BP) (3, 29-32)

BP จัดเป็นสารกลุ่ม chlorhydroxyquinoline ประกอบด้วย white crystal agglomerates มาจาก coal tar ละลายในสารละลาย organic เช่น chloroform และไมละลายในน้ำ ชอบความเป็นไขมัน (lipophilic) ทำให้สามารถซึมผ่านผิวหนังและรูขุมขนได้ดี มีใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1929 ใช้ในการรักษา แผลไหม้ แผลอักเสบจากเส้นเลือดอุดตัน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *C. acnes* โดยเปลี่ยนจาก benzoyl peroxide เป็น benzoic acid และ hydrogen peroxide ซึ่งปล่อย oxygen free radicals ทำลายผนังเซลล์ โดย benzoic acid จะโดนทำลายผ่านไต (ทดสอบโดยเมื่อทา BP ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จะพบ benzoic acid ในปัสสาวะ) ความเข้มข้นที่มากขึ้นจะทำให้ยาอยู่ที่ stratum corneum มาก hydration ก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่าน (33)

BP รักษาสิวผ่านกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. acnes* มีคุณสมบัติเป็น nonselective bactericidal (34) ลดการอักเสบ เป็น comedolytic และ ลดปริมาณ free fatty acid จาก sebum (35) จากการศึกษาของ Cove และ Holland ถึง BP กับอัตราการรอดของสิ่งมีชีวิตบนผิวหนัง พบว่า BP มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium capitis*, *P. avidum*, *P. granulomatus*, *Staphylococcus epidermis*, *S. hominis* รวมถึง *C. acnes* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยา BP มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ และยังไม่มีรายงานการดื้อยาของ BP ต่อแบคทีเรีย มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ comedolytic และ lipophilic ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของยาให้ซึมผ่านสู่ชั้น stratum corneum (36)

BP มีผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสบู่ล้าง โฟม ครีม เจล ทาทิ้งไว้และล้างออก หรือทาทิ้งไว้ BP เป็นยาทาเดี่ยวยาหลักที่ใช้ในการรักษาสิวอักเสบ (gold standard) นอกจากยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีกว่ายาทา isotretinoin

จากการศึกษาของ Kawashima และคณะพบว่า ประสิทธิภาพของ 3% BP ในการรักษาสิวนั้นสามารถลดปริมาณสิวทั้งหมดได้มากกว่า vehicle อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 12 สัปดาห์ (37)

จากการศึกษาของ Hughes และคณะ ในการเปรียบเทียบ ยาทา BP, isotretinoin gel และ vehicle ในการรักษาคนไข้สิวความรุนแรงน้อยถึงกลาง พบว่า BP มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนสิวอักเสบได้ดีกว่า isotretinoin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (38)

จากงานวิจัยของ Ellis และคณะพบว่า 5% BP และ 1% clindamycin มีประสิทธิภาพในการรักษาสิว และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ได้ดีกว่า 1% clindamycin อย่างมีนัยสำคัญ (39) อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *C. acnes* มากขึ้นโดยการดื้อยาอาจจะคงอยู่แม้หยุดการใช้ยาทาปฏิชีวนะแล้ว ประสิทธิภาพในการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะลดลง ทำให้ความสำคัญของการรักษาสิวด้วยยาปฏิชีวนะลดลง

และการศึกษาของ Kazuaki O. และคณะ ทดสอบระยะเวลาที่ BP ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. acnes* ชนิดที่ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ clindamycin และ nadifloxacin จากตัวอย่างคนไข้ที่เป็นสิวจำนวน 44 คน พบว่า ในเวลา 1 ชั่วโมง BP ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 2 เท่าของ MIC สามารถลดปริมาณเชื้อ *C. acnes* ได้ 3 log และ 5 log ตามลำดับ (40) ผลข้างเคียงของ BP ที่พบบ่อยได้แก่ การระคายเคือง ผิวแห้ง แดง ลอก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของยา (41) ผื่นแพ้สัมผัส ติดเชื้อผื่น จากการศึกษพบว่า BP ความเข้มข้น 10% ก่อให้เกิดผลข้างเคียงมากกว่า 2.5% BP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีรายงานการใช้ BP ในคนไข้สิวจำนวน 445 คนพบว่า เกิดอาการแดงลอก 24.1% ใน 2 เดือนแรก และผลข้างเคียงลดลงเหลือ 6.1% หลังจากใช้ยาไป 6 เดือน ผลข้างเคียงดังกล่าวจะลดลง เมื่อใช้ยาระยะเวลาที่นานขึ้น มีกรณีศึกษาของผู้ป่วย อายุ 26 ปีที่ใช้ 10% BP และเกิดบวมหลังบวม (angioedema) (42, 43) คนไข้สิวจำนวนมากล้มเหลวจากการรักษาเนื่องจากไม่สามารถปฏิบัติตามการทายาที่กำหนดได้ เนื่องจากระยะเวลาการทาที่นาน แดง ลอก และไม่สะดวกในการทายา ความเข้มข้นที่มากขึ้น จะเพิ่มการระคายเคืองที่มากขึ้น BP จะติดเชื้อผื่นได้ ดังนั้น ควรเว้นบริเวณ หน้าอก หลัง หรือ การทาชามคีน การใช้ BP ความเข้มข้นต่ำ (2.5-5%) จะลดการระคายเคืองได้ (26, 33)

จากการศึกษาของ Otto และคณะ ศึกษาปริมาณ *C. acnes* หลังจากทา 2.5% BP วันละ 2 ครั้ง โดยประเมินจาก porphyrin fluorescence และ *C. acnes* culture พบว่าจากคนไข้ 10 คน หลังทา 2.5% BP 2 สัปดาห์ ทำให้ค่า *C. acnes* ลดลงจาก 6.083 เป็น 4.108 log/cm² และ follicular porphyrin fluorescence Grade 5.30 เป็น 2.30 โดยมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ 2.5% กับ vehicle พบว่าสามารถลด สิวชนิดอักเสบ และ investigator's global response rating อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างของประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับ 5% และ 10% BP และ 2.5% มีผลข้างเคียงระคายเคืองน้อยกว่า 10% BP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (41) เนื่องจากผลข้างเคียงต่อผิวหนังของยาทา BP จึงมีการผลิต BP ในรูปแบบต่าง ๆ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ BP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และรูปแบบการใช้งาน เวลาที่ยาสัมผัสกับผิว เพื่อลดผลข้างเคียงและทำให้การรักษามีประสิทธิผลมากขึ้น จาก

การศึกษาของ Jaoa P. และคณะ ทดสอบผลข้างเคียงและการระคายเคืองของผิว ระหว่าง 4%, 10% BP face wash และ 10% foaming wash ในคนไข้ผิวหนังระดับน้อยถึงปานกลางโดยให้ใช้ โดย นวดผลิตภัณฑ์ปริมาณไม่เกิด 2 กรัมต่อครั้ง วันละ 2 ครั้งเช้าและเย็น ลงบนผิวหนังที่เปียก 1-2 นาที แล้วล้างออก ประเมินผลข้างเคียง แห้ง แดง แสบ คัน ผื่นลอก และ การระคายเคือง อักเสบ ของเยื่อบุตา วันที่ 21 พบว่า ผลข้างเคียง ไม่แตกต่างกัน

มีการศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ BP สัมผัส ผิวหนังที่ส่งผลต่อปริมาณ *C. acnes* ที่ลดลง เพื่อหาระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่ BP จะเกิดประสิทธิผล และลดผลข้างเคียง จาก BP มากที่สุด BP งานวิจัยของ James J. Leyden และคณะ ศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี เปรียบเทียบ 9.8% emollient foam ทาบริเวณหลังระยะเวลา 2 นาทีวันละครั้ง นาน 2 สัปดาห์ และวัดปริมาณ *C. acnes* พบว่า จำนวนเชื้อลดลง 0.91 log ใน 1 สัปดาห์ และปริมาณลดลง 98.3% ใน 2 สัปดาห์ ตามลำดับ (44)

จากการศึกษาของ Leyden และคณะ เปรียบเทียบ 5.3% emollient foam BP วันละ 2 ครั้ง ระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นหยุดการใช้ยา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น ใช้ 8% BP wash 2 สัปดาห์ ในคนไข้ที่มี *C. acnes* colony counts 10,000 colonies/cm² พบว่า หลังจากใช้ 5.3% BP *C. acnes* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 1.9 log และ 2.1 log ที่สัปดาห์ 1 และ 2 ตามลำดับ และ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า *C. acnes* หลังจากใช้ 8% BP wash 1 และ 2 สัปดาห์ (45)

จากการศึกษาของ Bojar และคณะ ทดสอบประสิทธิภาพ 5% topical BP gel พบว่าสามารถลดปริมาณ *C. acnes* บริเวณผิวและรูขุมขนหลังใช้ยาทา 48 ชั่วโมง และลด acne severity ที่ 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (45) จากการศึกษา Shalita และคณะ ใช้ BP cleansing ที่มีส่วนผสม glycerin และ zinc lactate ล้าง 20 วินาที มีประสิทธิภาพลดปริมาณ *C. acnes* ใช้คู่กับ 0.1% tretinoin microsphere gel มีประสิทธิภาพในการลดสิวกักเสบได้ดีกว่าเมื่อ เปรียบเทียบกับ 0.1% tretinoin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและไม่เพิ่มผลข้างการระคายเคือง (46)

ตาราง 1 ชนิดของ Benzoyl peroxide ที่ผลิตในประเทศ สหรัฐอเมริกา

Formulation	Concentration
Cream	10%
	5%
	2.5%
Foam	5.2%
	5.3%
	5.5%
	9.8%
Gel	2.5%
	2.75%
	4%
	5%
	5.5%
	6.5%
	7%
Kit	10%
	Wash 2.5% and lotion 3.7%
	Wash 2.5% and lotion 10%
	Wash 4% and bar soap 5%
Liquid	Wash 8% and bar soap 5%
	2.5%
	5%
	5.25%
	6%
	7%
	10%

ตาราง 1 (ต่อ)

Formulation	Concentration
Lotion	3%
	5%
	8%
	10%
Cloths	6%

2. Topical antibiotic (47)

ยาปฏิชีวนะชนิดทาที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฆ่าเชื้อ โดยจะได้ผลมากที่สุดเมื่อทาควบคู่กับ Benzoyl peroxide เนื่องจากจะเพิ่มโอกาสการดื้อยา (48)

2.1 Clindamycin ยาปฏิชีวนะชนิดทาที่นิยมมากที่สุด มีรูปแบบ 1% clindamycin แต่ไม่แนะนำให้ใช้เป็นยาเดี่ยวเนื่องจากจะเพิ่มโอกาสการดื้อยา มีรายงานการใช้ยาทา topical clindamycin 358 คน 8 สัปดาห์พบคนไข้ 1 คนมีภาวะท้องเสียจากยา และจากการศึกษาคนไข้สาว 32 คน ทายา 1% clindamycin คนไข้ 21% ตรวจพบ *C. difficile* ในอุจจาระ จึงมีข้อห้ามในคนไข้ที่มีประวัติ regional enteritis, ulcerative colitis, และ pseudomembranous colitis

2.2 Erythromycin จัดอยู่ในกลุ่ม macrolide ผลข้างเคียงได้แก่ แสบ ผิวแห้ง คัน จัดเป็น pregnancy category B และแม่จะมีอัตราการดูดซึมสู่กระแสเลือดน้อยแต่ต้องระมัดระวังการใช้ในคนไข้ที่มีประวัติเป็น pseudomembranous colitis

ปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาลดลงเนื่องจากโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยา และมีการรักษาตัวเลือกอื่นที่ประสิทธิภาพดีกว่า (48) จากการเก็บ ข้อมูลคนไข้สาว ในปี 2008-2016 จากแพทย์ผิวหนังในสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะในคนไข้สาวลดลงถึง 36% และระยะเวลาการให้ยาปฏิชีวนะเฉลี่ยลดลงจาก 345 วันในปี 2004 เป็น 126 วันในปี 2016 มีการใช้ spironolactone ในการรักษาคนไข้ผู้หญิงที่เป็นสิวมากขึ้น 391% ส่วนอัตราการรักษาด้วย Oral Retinoid และ oral contraceptive ไม่แตกต่างกันชัดเจน (48)

3. Topical retinoid (27, 49)

เป็นยารักษาหลักสำหรับรอยโรค comedone เนื่องจากมีฤทธิ์หลักคือ comedolytic และ anti-inflammation และมีคุณสมบัติป้องกันการเกิดสิวใหม่ใช้ต่อเนื่องหลังจากหยุดยาเกินแล้ว โดย topical retinoid ที่ FDA approved สำหรับสิว ได้แก่ Tretinoin, Adapalene และ Tazarotene โดย Tretinoin มีประสิทธิภาพที่ดีและสามารถลดผิวที่เสื่อมตามวัยได้ หากทามากกว่า 6 เดือน แต่ข้อเสียคือเป็น photo-unstable คือจะเสื่อมสภาพเมื่อโดนแสงจึงต้องทาตอนเย็นและ จะถูก oxidized และไม่ออกฤทธิ์เมื่อทาพร้อมกับ Benzoyl peroxide (BP) จึงต้องทาคนละเวลาหากใช้ร่วมกับ BP

Adapalene เป็น photostable และผลข้างเคียงน้อยกว่า tretinoin ทำให้เหมาะกับคนไข้ที่มีผิวแพ้ง่าย และเพิ่มโอกาสการใช้ยาในระยะยาว และความสม่ำเสมอในการทายา (compliance) ของคนไข้ จากการศึกษาพบว่า 0.1% Adapalene gel ก่อให้เกิดการระคายเคืองน้อยกว่า 0.025% tretinoin gel หลังจากทา 12 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทายาจะใช้ปริมาณเท่าเมล็ดถั่วเขียวทาทั่วหน้าเว้นรอบตา จมูก และปาก ผลข้างเคียงที่พบบ่อยคือ ผิวแห้ง แดง ลอก ผิวตึง ไหม้ ระคายเคือง โดยอาการสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถลดการเกิดผลข้างเคียงโดย ลดปริมาณ ความถี่ในการทายา ไม่ทาบนผิวที่เปื่อยเพื่อลดการดูดซึมของยา โดย tretinoin และ Adapalene เป็น pregnancy category C ส่วน Tazarotene เป็น category X ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการใช้ในหญิงวัยเจริญพันธุ์ Topical retinoid สัมพันธ์กับ photosensitivity จึงแนะนำให้คนไข้ทาครีมกันแดดร่วมเพื่อลดผิวไหม้จากแสงแดด

Adapalene ลดการตอบสนองของ cytokine ที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบจาก *C. acnes* (50) จึงทำให้การใช้ยาสูตรผสมของ BP และ adapalene มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการศึกษาพบว่า 0.1% Adapalene/2.5% BP ประสิทธิภาพในการรักษาสิวความรุนแรงระดับปานกลาง ลดจำนวนสิวนิดอักเสบ และชนิดไม่อักเสบ ดีกว่ายาเดี่ยว ทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลข้างเคียง ความแห้งจากการทา ADA/BP พบได้ 21.2% ในขณะที่ 0.1% Adapalene และ 2.5% Benzoyl peroxide พบได้ 14.1% และ 8.4% ตามลำดับ

Clindamycin มีฤทธิ์เพิ่มการสร้าง free radical จาก BP (51) ยาสูตรผสม 5% Benzoyl peroxide/1% clindamycin gel มีประสิทธิภาพลดสิวนิดอักเสบและลดจำนวนสิวมืดออกฤทธิ์ได้เร็วเทียบกับ 0.1% Adapalene อย่างมีนัยสำคัญ

4. Azelaic acid

Azelaic acid 20% มีฤทธิ์ยับยั้ง bicarbonic acid ทำให้ไม่เกิด hyperkeratization, มีฤทธิ์ comedolytic และ anti-inflammation เหมาะกับ ผิวแพ้ง่าย หรือ Fitzpatrick skin type IV เนื่องจากมีฤทธิ์ lightening และลดสีผิวที่ไม่สม่ำเสมอ เป็นยารักษาสิว category B จึงเป็นตัวเลือกสำหรับหญิงตั้งครรภ์ 38% ของคนไข้มีผลข้างเคียง sensory symptoms ได้แก่ ปวด คัน ผิวไหม้ ส่วนผิวแห้ง แดง ลอก ซึ่งจากการศึกษาอาการนี้ยังคงอยู่ได้นาน 3.6% ของคนไข้ที่ใช้ยา นอกจากนี้ยังพบอาการ ผิวหนังสีจางลง มีขนขึ้น (hypertrichosis) ได้

5. Salicylic acid (52)

มีฤทธิ์ comedolytic มีความเข้มข้น 0.5-2%

การรักษาโดยยารับประทาน

1. Oral antibiotics (53)

มีข้อบ่งชี้สำหรับสิวความรุนแรงปานกลางและ รุนแรง โดยมีฤทธิ์ anti-inflammation และ สมดุล *C. acnes* โดยจะรับประทานควบคู่กับยาทา เพื่อลดโอกาสการดื้อยาของ เชื้อ *C. acnes*

1.1 Tetracycline ได้แก่ minocycline และ doxycycline มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและลดการอักเสบ จึงเป็น ยาหลักสำหรับยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานในการรักษาสิว ในสหรัฐอเมริกา (2) และ sarecycline ได้รับอนุญาต จาก FDA ในการรักษาสิवरดับความรุนแรงปานกลางถึงรุนแรงในคนไข้สิวยาวมากกว่า 9 ปี ยากลุ่ม tetracycline ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือ ระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ คลื่นไส้ หลดอาหารอักเสบ โดยพบได้ 0.54-51.7% นอกจากนี้ยังพบอาการ ท้องเสีย กรดในกระเพาะหลังผดผื่น ผลข้างเคียงของผิวหนังเกิดอาการ คัน ผิวไวต่อแสง พบได้ 0.42%-30.5% โดย พบมากที่สุด (19) เทียบกับยาอื่นในกลุ่มเดียวกัน Minocycline มีผลข้างเคียง อาการระบบ vestibular ได้แก่ วิงเวียน (dizziness) บ้านหมุน (vertigo) มีผิวหนังเปลี่ยนสีเป็นสี เทา และเกิดอาการเหมือนโรคแพ้ภูมิตัวเอง ได้แก่ ไข้ ตับอักเสบ ปอดอักเสบ ปฏิกริยาภูมิไวเกิน (serum sickness)

1.2 Erythromycin เป็นยาปฏิชีวนะทางเลือกในการรักษาสิวกกรณีที่ แพ้ยากลุ่ม tetracycline หรือ ใช้ในคนท้อง เนื่องจาก erythromycin ยับยั้ง cytochrome P450 จึงเกิดอันตรกิริยาของยา กับยาได้หลายชนิด เช่น ยา กันชัก และยาด้านไวรัส HIV จึงต้องระมัดระวังในการใช้ยา ยา erythromycin เป็นข้อห้ามสำหรับหญิงให้นมบุตรเนื่องจากทำให้เกิด pyloric stenosis ในทารก ยาปฏิชีวนะ ชนิดกินและทาใช้ในการรักษาสิแพรหลายโดยเฉพาะ Erythromycin และ clindamycin เนื่องจากผลข้างเคียงที่น้อย ระยะเวลาที่รักษาสิวประมาณ 3-6 เดือน จากข้อมูลของ

community for European Economic Area ที่รวบรวมในปี 2007-2011 พบว่าทั้ง 29 ประเทศในยุโรป รายงานข้อมูลขนาดยาที่ใช้ต่อวันที่มากขึ้น แสดงให้เห็นถึงอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้น (54) จากข้อมูลปี 2000-2010 จาก The lancet infectious disease พบว่า 71 ประเทศทั่วโลก มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น 35% และเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา (55)

จากการศึกษาของ N.M.T.Luk และคณะรวบรวม *C. acnes* 86 สายพันธุ์ จากคนไข้สิว 111 คน ใน Hong Kong พบว่า 54.8% เป็นสายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะ (56) จึงไม่แนะนำการรักษาสิวด้วยยาเดี่ยวที่เป็นยาปฏิชีวนะรับประทานหรือ ยาทา หากมีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในระยะยาว แนะนำให้เพิ่ม BP ด้วย ยารักษาหลักที่แนะนำในคนไข้สิวล้วนใหญ่คือ ยาทา tretinoin ร่วมกับ BP (11)

1.3 Clindamycin

2. Isotretinoin (49, 57)

มีผลลดขนาดของต่อมไขมัน ผลข้างเคียงพบได้บ่อยที่สุด ได้แก่ เยื่อปากและตาแห้ง ปากแห้งแตก ตาแห้ง ติดเชื้อเยื่อตาได้ง่าย ก่อให้เกิดความพิการของบุตรในครรภ์ (teratogenic) ได้แก่ ระบบสมอง หัวใจ และหลอดเลือด ระบบประสาท และไทมัส เจริญเติบโตผิดปกติ เกิดภาวะความดันในโพรงกะโหลกสูง (pseudotumor cerebri) เมื่อกินคู่กับยาบางชนิด เช่น tetracycline ผลข้างเคียงอื่น ๆ ได้แก่ ผอมร่วง (telogen effluvium) ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ตับอักเสบ มีค่าไขมันเลวสูงขึ้น และไขมันดีต่ำลง ตับอ่อนอักเสบ

3. Hormonal therapy

มีข้อบ่งชี้เมื่อ การรักษาไม่ได้ผล หรือ ไม่สามารถใช้ isotretinoin ได้ หรือ เป็นสิวลที่มีภาวะฮอร์โมนเพศผิดปกติ เนื่องจาก androgen มีผลต่อการทำงานของต่อมไขมัน

3.1 Ovarian androgen blocker ยาคุมยากุมกำเนิด (oral contraceptive pills) ที่มีตัวยา i) ethinylestradiol/cyproterone acetate และ ii) ethinylestradiol/drospirenone ซึ่งปรับสมดุลฮอร์โมนที่เปลี่ยนแปลง จากการศึกษารายงานว่า 63% ของผู้หญิง 25% ของช่วงก่อนมีประจำเดือนจะมีจำนวนสิวเพิ่มขึ้น ผลข้างเคียง ได้แก่ ประจำเดือนไม่สม่ำเสมอ คลื่นไส้ อาเจียน

ยาคุมกำเนิดชนิดผสมที่ FDA approved สำหรับผู้หญิงวัยมีประจำเดือนอายุมากกว่า 15 ปี มี 4 ชนิด ได้แก่ 1. ethinyl estradiol and norgestimate 2. ethinyl estradiol, norethindrone acetate, and ferrous fumarate 3. Ethinyl estradiol and drospirenone 4. Ethinyl estradiol, drospirenone, and levomefolate ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดขนาดและการทำงานของต่อมไขมัน ทำให้ลดการอักเสบและปริมาณสิวลอุดตันและสิวลอักเสบ (58, 59)

3.2 Spironolactone เป็น androgen receptor blocker รักษาสิวและภาวะขนดก (hirsutism) ผลข้างเคียง ได้แก่ ประจำเดือนไม่สม่ำเสมอ เจ็บเต้านม โพแทสเซียมในเลือดสูง ความดันต่ำ ในหญิงตั้งครรภ์ อาจก่อให้เกิดบุตรเพศชายมีลักษณะ รูเปิดท่อปัสสาวะต่ำกว่าปกติ (hypospadias)

การรักษาทางเลือก

1. Light therapy และ photodynamic therapy

1.1 Intense pulse light (IPL), pulse dye lasers (PDL), potassium titanyl phosphate (KTP) lasers, และ broad-spectrum continuous wave visible light (blue and red) เป็นการรักษาเสริม โดยหลักการคือ การทำลาย *C. acnes* และเส้นเลือดที่เลี้ยงต่อมไขมัน ผลข้างเคียงได้แก่ บวม แดง ปวด ตุ่มน้ำพอง

1.2 Photodynamic therapy ได้แก่ aminolevulinic acid (ALA), methylaminolevulinic acid (MAL) ผลข้างเคียง เช่น ผื่นแดง ไข้ ลอก ผื่นหงส์เข้ม ผื่นสิ่ว โดยผลข้างเคียงสัมพันธ์กับระยะเวลาสัมผัสแสง oral ALA ก่อให้เกิดอาการ คลื่นไส้ อาเจียน herpes simplex reactivation, acneiform pustular eruption ได้

2. Emerging medication ยาทาร่วมชนิดอื่น ๆ เนื่องจากยังมีข้อมูลไม่เพียงพอขอประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับยารักษาหลัก ได้แก่ Topical dapson, Taurine bromine, Sodium sulfacetamide, Resveratrol และ chemical peeling (60)

4. Benzoyl peroxide (BP) และ *Cutibacterium acnes*

BP มีฤทธิ์เป็น bactericidal เมื่อทาบนผิวแล้วจะเปลี่ยนเป็น benzoic acid และ metabolized โดย cysteine กลายเป็น active free radical oxygen species และเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (oxidation) กับโปรตีนของแบคทีเรีย

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือสารอิเล็กตรอนอิสระ (unpaired electron) โดยจะพบอนุมูลอิสระได้จากกระบวนการ metabolism ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน และปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่กระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระมีผลต่อเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่ ทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ได้แก่ โครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) พันธะโควาเลนต์ (covalent) โปรตีน และไขมัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเยื่อหุ้มเซลล์ (61)

อนุมูลอิสระแรงสูงที่สำคัญของร่างกาย ได้แก่

อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) เป็นอนุมูลอิสระที่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมี Fe_2^+ หรือ Cu_2^+ ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^\cdot$) ในร่างกาย O_2^- จะ

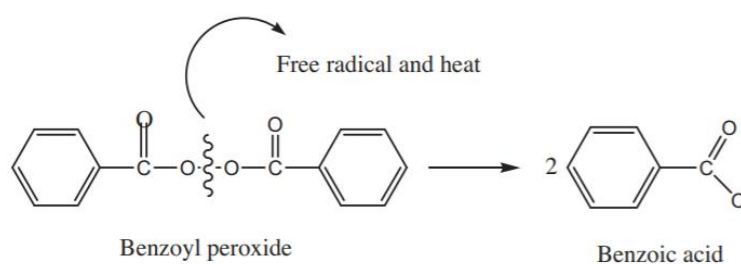
เกิดปฏิกิริยา dismutation กับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เกิดเป็น สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์สารตั้งต้นทำให้เกิด OH (62)

อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^\cdot$) ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ที่มีความว่องไวสูงสุด ทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตทันที โดยอนุมูลอิสระนี้สร้างขึ้นจาก H_2O_2 ทำปฏิกิริยา Fenton กับโลหะ Fe^{2+} ได้เป็น ไฮดรอกซิล และ ไฮดรอกไซด์ไอออน

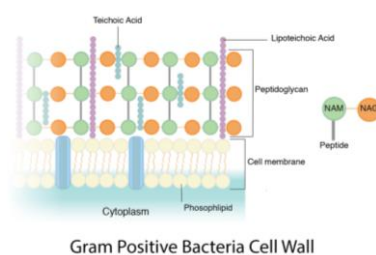
อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($NO^\cdot$) อนุมูลอิสระขนาดเล็ก สามารถรวมตัวกับโลหะทรานสิชันหรือโปรตีนที่มีโลหะชนิดนี้ $NO^\cdot$ สามารถจับกับฮีโมโกลบินได้เร็วกว่าออกซิเจนและขัดขวางกระบวนการขนส่งออกซิเจน

อนุมูลอิสระ CCl_3

จากการศึกษาของ Nacht และคณะ ในหลอดทดลองถึงการดูดซึมของ Benzoyl peroxide พบว่า 4.5% ของ ปริมาณ BP ที่ทาบนผิวหนัง จะอยู่ในชั้นผิวหนัง เมื่อวัดที่ 8 ชม. หลังทายา โดย อัตราการ penetrate ของยา เท่ากับ $5.1 \mu g/cm^2$ สาร benzoic acid จะถูกดูดซึม และ 95% ของยาจะถูกขับออกทางไต (63) จากการศึกษาของ Sergio Nacht และคณะ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ 5% BP lotion และ 3% colloidal hexachlorophene ในการลดปริมาณ *C. acnes* บนผิวของอาสาสมัครที่มีผิวลักษณะที่เหมาะสมต่อการเกิดสิว โดยทายาทั้ง 2 ชนิดบริเวณหน้าด้านซ้ายและขวา เข้าเย็น และประเมินปริมาณ *C. acnes* ที่สัปดาห์ที่ 4 พบว่า BP สามารถลดปริมาณ *C. acne* บนผิวประเมินโดย Williamson and Kligman methods และลดปริมาณ *C. acnes* ในรูขุมขน ประเมินโดย follicular fluorescence อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (64)



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างสูตรเคมี Benzoyl peroxide (65)



Gram Positive Bacteria Cell Wall

ภาพประกอบ 14 โครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (66)

ปฏิกิริยา oxidative stress ประกอบด้วย macromolecular damage และ ปฏิกิริยา ควบคุมการทำงานของ redox circuits โดย macromolecular damage มี free radicals เป็น ปัจจัยหลักในการเกิดปฏิกิริยา ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย polyunsaturated fatty acids จะเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation กับ free radicals

ทบทวนวรรณกรรม Benzoyl peroxide และการรักษาสิว แสดงดังตารางต่อไปนี้

ตาราง 2 ทบทวนวรรณกรรม Benzoyl peroxide และการรักษาสิว

Author/ Journal	Title	Method	Outcome	Result
Del Rosso, J. Q. (2009)/The Journal of clinical and aesthetic dermatology (67)	A 6% Benzoyl Peroxide Foaming Cloth Cleanser Used in the Treatment of Acne Vulgaris	Apply 5 minute of Benzoyl peroxide (BP) foaming cloth vs 6% BP cleanser vs 4% BP wash	Question convenience, use attributes, cosmetic attributes	BP foaming cloth cleanser improve patient's compliance and satisfaction

ตาราง 2 (ตข)

Author/ Journal	Title	Method	Outcome	Result
Alan R. Shalita et al (2003)/ Cutis. (46)	Compared Efficacy and Safety of Tretinoin 0.1% Microsphere Gel Alone and in Combination with Benzoyl Peroxide 6% Cleanser for the Treatment of Acne Vulgaris	BP 6% cleanser in morning + 0.1% tretinoin in the evening vs 0.1% tretinoin in the evening	lesion count, Severity of acne, Severity of localized skin irritated At baseline, 2, 6, 12 weeks	Inflammation lesion count - Combine therapy significant reduction at week 6 - Monotherapy significant reduction at week 12 Investigators' evaluation of severity acne - Combination therapy significant superior in week 12 Irritation -Combination therapy no increase in local irritation than monotherapy
Joshua A. et al. (2013)/ Journal of Drug in Dermato-logy (68)	Efficacy and Safety of Tretinoin 0.025%/Clindamycin Phosphate 1.2% Gel in combination with Benzoyl peroxide 6% Cleansing cloths for treatment of facial Acne vulgaris	-40 patients with mild, moderate, and severe acne vulgaris -BP 6% cleansing cloth in evening 30 sec without scrubbing and 0.5 g T/CP gel vs soap-free cleanser and T/CP gel	-Global assessment score and cutaneous tolerability at 0, 2, 4, 8, and 12 weeks	-68.4% of treatment group treatment success at week 12 -No significant difference in two group. -Majority of both arms reported none to mild for all tolerability parameters

ตาราง 2 (ตข)

Author/ Journal	Title	Method	Outcome	Result
Hughes, B., Norris J., Cunliffe, W. A. (1992)/ Clinical and experi- mental dermato- logy (38)	A double-blind evaluation of topical isotretinoin 0.05%, Benzoyl peroxide gel 5% and placebo in patients with acne	Topical isotretinoin Vs 5% BP gel (leave- on) Vs Placebo Apply entire face Morning and night for 12 weeks	Acne grading Lesion count	- BP significant reduce acne count than other groups at 4 weeks - BP significantly improve at 5% level to isotretinoin at 8 weeks - BP significant reduce inflammatory lesion than other groups
Otto H. Mills JR. et al. (1986)/ Internat- ional journal of dermato- logy (41)	Comparing 2.5%, 5%, and 10% BP on Inflammatory Acne Vulgaris	153 moderate-severe acne vulgaris Subjects for 8 weeks 2.5%, 5%, 10% BP gel and vehicle Twice daily <i>C. acnes</i> colonies cultures - Dilutions in 0.5% buffered Triton X-100 plate on brain heart agar with 0.1 % Tween 80 incubate for 7 days <i>C. acnes</i> on quantitative <i>C. acnes</i> count - Degree of follicular fluorescence of porphyria	- Inflammatory lesions - Global assessment of improvement - Density of <i>C. acnes</i> -Severity of side effect	- 2.5% BP is statistically improvement in global rating and no statistic difference of erythema compare to vehicle - No significance difference in efficacy and adverse effects between 2.5 and 5% BP - No significance difference in efficacy between 2.5% and 10% BP - Statistically significant difference in frequency and severity of burning, erythema, and peeling

ตาราง 2 (ต่อ)

Author/ Journal	Title	Method	Outcome	Result
		- Ratio of free fatty acid to triglyceride		- 2.5% BP gel reduce anaerobe population 97% for 1 week and 99% by 2 weeks
Sklar, J. L., et al/ Journal of dermatolo gical treatment (1996)/ Journal of dermato- logical treatment (69)	Evaluation of Triaz 10% Gel and Benzamycin in acne vulgaris. Journal of dermatological treatment	- Method: BP gel Vs BP-erythromycin vs placebo Moderate-severe acne Outcome1, 2 week and 1,2,3 months	- Total lesion - Side effects	- Result: BP gel comparable to BP- erythromycin and significantly reduce total lesions compare to baseline at all point of times - Side effect: BP, BP- erythromycin produced mild erythema, scaling, tight ness, burning, stinging, itching or tingling at first week BP-erythromycin persist for 3 months significantly higher than others
Andrew F. Alexis et al (2017)/ Aesthetic Dermato- logy (70)	Treatment of Moderate-to- severe Acne Vulgaris in a Hispanic Population: A Post-hoc Analysis of the Efficacy and	-498 patients with moderate-to-severe facial acne, older than 12 years -apply clindamycin phosphate 1.2%/BP 3.75% gel or vehicle 12 week	-Severity of acne vulgaris (Evaluator Global Severity Score) -Inflammatory and inflammatory	-Clindamycin phosphate 1.2%/BP 3.75% gel sig improve inflammatory and noninflammatory lesions compare with vehicles at week 12 -No sig in 2-grade improvement by EGSS between clindamycin

ตาราง 2 (ต่อ)

Author/ Journal	Title	Method	Outcome	Result
	Tolerability of Clindamycin 1.2%/ Benzoyl Peroxide 3.75% Gel		lesions count -Safety and tolerability	phosphate 1.2%/BP 3.75% gel and vehicles -Rare side effects, severe itching 1.4%

ทบทวนวรรณกรรมความสัมพันธ์ Benzoyl peroxide และ *C. acnes* มีรายละเอียด
ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตาราง 3 ทบทวนวรรณกรรมความสัมพันธ์ Benzoyl peroxide และ *C. acnes*

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Okamoto K. et al. (2016)/ Journal of Infection and Chemo- therapy (40)	In vitro antimicrobial activity of Benzoyl peroxide against <i>Propionibacterium acnes</i> assessed by a novel susceptibility testing method	Time killing assay Media: GAM broth with 0.1(v/v) % glycerol and 2(v/v) % Tween 80 BP incubated 35 °C BP dissolve in DMSO 2- fold to conc to 1250 ug/ml - NDX and CLDM dissolve in sterile water to concentration 0.06-128 ug/ml	- MIC, MBC - <i>C. acnes</i> colonies at 0,1, 2 hours	- MIC and MBC of BP against all isolated 128 or 256 ug/ml - CLDM-NS: MIC $\geq$ 8 ug/ml - Effect of BP on variable count of <i>C. acnes</i> from 6.76 log are 3.42 and <1.6 log at 1 and 2 hours

ตาราง 3 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
		- 44 isolated <i>C. acnes</i> (clindamucin nonsusceptible, nadifloxacin nonsusceptible or both susceptible) - MIC of BP, NDFX, and CLMD broth microdilution testing to clinical and standard institution - MBC - Time-killing assay Bacterial suspension of <i>C. acnes</i> and BPO at 1 and 2 times the MIC		
Leyden, J., Del, J. R. (2012)/ Journal of drugs in dermato- logy (44)	The Effect of BP 9.8% Emollient Foam on Reduction of <i>C. acnes</i> on the Back Using a Short Contact Therapy Approach	2 weeks, once daily BP 9.8% emollient foam massaging for 20 sec remain on skin 2 minutes Compare BP 5.3% leave-on emollient foam	- <i>C. acnes</i> colonies culture - Adverse effect	- <i>C. acnes</i> count reduces 98.3% after 2 weeks - No scaling, dryness, erythema, itching, or sting in 9.8% BP - No statistic significantly between 9.8% BP emollient 2 minutes contact time and 5.3% leave-on BP for in reduce <i>C. acnes</i> colonies

ตาราง 3 (ตข)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Leyden, J., et al (2008)/ Cutis (71)	Antibiotic- Resistant <i>C. acnes</i> Suppressed by a BP Cleanser 6%	BP cleanser 6% wash 20 sec daily Participants: ATB- resistant <i>C. acnes</i> (Erythromycin, Tetracycline, Doxycycline, clindamycin) Culture: Modified e Kligman scrub technique	- Mean log <i>C. acnes</i> At baseline, week 1,2,3	Significant reductions in total <i>C. acnes</i> counts and counts of resistant strain 1 log after 1 week, 1.5 log and after 2 weeks and 2 log after 3 weeks (<0.0001)
J. H. Cove, K. T. Holland, /Journal of Applied Bacterio- logy (2008)/ Journal of Applied Bacterio- logy (72)	The effect of BP on cutaneous micro- organisms in vitro	5% (w/w) Benzoyl peroxide lotion - Final concentration 0, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (w/v) - mix of 5.0 ml of 3.9 ml of phosphate- buffered saline (PBS) at pH 6.0, 0.1 ml of microorganisms 10^8 cells/ml and 1.0 ml of Topex acne lotion or control base diluted in PBS at pH 6.0 - maintained at 30°C and 0.1ml samples taken immediately after mixing and at suitable times after.	- Survival curves for skin microorganis ms	- concentration 10^{-1} too concentrated and no killing - 10^{-2} (w/v) BP for <i>C. acnes</i> and <i>S. capitis</i> - X_s shoulder 59 min - Decimal reduction time 12.5 min - $\log_{10}$ extrapolation number (target that have a lethal effect)= 4.412 -No subpopulations of cells resistant to Benzoyl peroxide in cultured tested

ตาราง 3 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
		- 10X serial dilutions plated on Reinforced Clostridial Medium for <i>P. acnes</i> at 37°C for 7 d anaerobically in 90% H:10% Co ₂ - At 20,40,60,80 and 120 min		
R. A. Bojar et al. (1995)/ British Journal of Dermato- logy (73)	The short-term treatment of acne vulgaris with BP: effects on the surface and follicular cutaneous microflora	- 5% (w/v) Benzoyl peroxide in an aqueous gel applied daily entire face Asses days 2, 4, 9,14 and 28 of surface and follicular microbial populations - 12 volunteers with mild acne and follicular <i>P. acnes</i> $\geq$ 3.5 log 10 colony forming units/cm ² of skin - Measurement: method of Williamson and Kligman. counts for propionibacteria by plating 10-fold serial dilution	- <i>C. acnes</i> colonies - Inflammatory lesions count	- Result: Mean skin surface and follicular <i>C. acnes</i> significantly reduce after 2 days significant reduction in acne lesion count after 5 days - Inflammatory lesion reduce in days 4 - Reductions of $\geq \log 1$ พบ 6 คน and $\geq 2\log 10$ CFU/cm ²

ตาราง 3 (ตข)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Adele S. et al/ (2015) Dove Press Journal (26)	An innovative approach to the topical treatment of acne	- Apply 5% BP twice a day vs Farmaka Acne Cream (FAC) - 32 mild or moderate acnes subjects - Apply twice daily 4 weeks - follicular biopsy and <i>C. acnes</i> culture after contact 3, 6,12 and 24 hours, stripping 5X5 cm at baseline and end of periods - morphometric analysis of sebum and photographic evaluation	- Growth of <i>C. acnes</i> (log) - Improve in inflammatory and noninflammat ory lesions - Sebum production - Product's efficacy, tolerability, and cosmetic acceptability	- 5% BP: <i>C. acnes</i> log reduction at contact time 3 and 6 hours are 2.83 and >3.87 log - FAC reduce itching, erythema, and scaling. Significant improve in symptoms and severity improved in 38% - 90% of subjects judged tolerability as good or very good
Nacht, S. et al./ (1983) Archives of dermato- logy (64)	Comparative activity of BP and hexachlorophen e: in vivo studies against <i>C. acnes</i> in humans	- Method; Lotion 5% BP vs colloidal suspension 3% hexachlorophene Twice daily morning and evening 4 weeks	- Measurement: Density of <i>C. acnes</i> scrub- detergent sampling method if Williamson and Kligman - Follicular Fluorescence on the	- result: BP reduce <i>C. acnes</i> in skin surface scrub >90% in one week, 98% in 2 weeks - Hexachlorophene decrease <i>C. acnes</i> 50% after 4 weeks - BP reduce statistically significant at 1% level after 2 weeks and 0.1% level after 4 weeks

ตาราง 3 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
			forehead and cheeks weekly on wood's light and grade on scale 0-5	
Gans, E. H., Kligman A. (2002)/ Journal of dermato- logical treatment (74)	Comparative efficacy of clindamycin and Benzoyl peroxide for in vivo suppression of <i>Propionibacterium acnes</i> . Journal of dermatological treatment	- Method: - 6% BP special gel vs 1% clindamycin phosphate lotion Twice daily 14 days - Measurement: Follicular porphyrin fluorescence under wood's lamp assessed degree of yellow-orange 0-3 scale - <i>C. acnes</i> count: detergent-scrub method of Williamson and Kligman, sampling.	- Follicular porphyrin fluorescence - <i>C. acnes</i> count	- BP reduce <i>C. acnes</i> statistically significant at day 3 and significantly greater than 1% clindamycin at day 3,7,14 - BP reduce significantly reduce Fluorescence greater than 1% clindamycin at day 7 and 14

ตาราง 3 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Mark A. T. Blaskovich et al/ (2019)/ Scientific nature research / (75)	In vitro Antimicrobial Activity of Acne Drugs Against Skin-Associated Bacteria	-Method <i>C. acnes</i> 5 x 10 ⁵ CFU/mL Standard anaerobic MIC assay incubated at 37 °C for 48 hr Media : Brain Heart Infusion (BHI) with 1% cysteine	MIC: determine by no visible growth by eye	MIC ต่ำ BP = 1024-2048
E.A.EADY et al/ British Journal of Dermatology (1994) (76)	Effects of BP and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients	Bacterial strain: - N = 40 strains 10 ⁵ C.F.U -10 antibiotic-sensitive and 10 erythromycin-resistant strain of <i>Propionibacterium spp.</i> - 10 erythromycin-sensitive and 10 erythromycin-resistant strains of <i>Staphylococcus epidermidis</i> Antimicrobial agents: - Erythromycin powder, -BP 5% w/w solution in a base consisting	MIC: by eye -Drug interactions: Checkerboard titration	- MIC of BP/ Erythromycin: Erythromycin sensitive and resistant to <i>propionibacteria</i> = 64-128/ 0.06-0.125 and 512-2048 -MIC of BP/ Erythromycin: Erythromycin-sensitive staphylococci, MS-resistant and MLS-resistant staphylococci = 512/ 0.25-0.5, >2048 and 256-512 -MIC of combination BP/Erythromycin: Erythromycin, MS-resistant and MLS-resistant staphylococci/ Erythromycin -resistant <i>propionibacteria</i> = 512 bp 307 ery/ 64 bp 38.4 ery

ตาราง 3 (ตอ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
		of purified water, carbomer 940, 14% alcohol, sodium hydroxide, dioctylsodium sulphosuccinate and fragrance Media: Brain-heart infusion agar		
Teruaki Nakatsuji et al/ The society for investiga- tive Dermato- logy/ (2009) (77)	Antimicrobial Property of Lauric Acid Against <i>Propionibacterium acnes</i>	Method - <i>C. acnes</i> (from American Type Culture Collection, Manassas, VA) 1 x 10 ⁶ -Lauric acid (sigma) Media: Brucella broth agar with 5% (v/v) sheep blood, vitamin K, and hemin BP with final concentration 5% DMSO	MIC MBC	MIC (μ g/ml) of BP/ Lauric acid to <i>P. acnes</i> = 62.5/ 3.9 <i>S. aureus</i> = 15.6/ 0.97 <i>S epidermidis</i> = >100/ 3.9

ตาราง 3 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Jason E. Hsu et al. (2020)/ Interna- tional Orthopae- dics (78)	Randomized controlled trial of chlorhexidine wash versus BP soap for home surgical preparation: neither is effective in removing Cutibacterium from the skin of shoulder arthroplasty patients	-Swab shoulder's skin surface night prior surgery and immediate after skin incision (n= 50) - <i>C. acnes</i> positive -10% BP soap - 4% CHG	-Swab and The <i>Cutibacterium</i> load	-Neither CHG nor BP were effective in eliminating <i>C. acnes</i> from the skin surface or the incise dermal edge in patients having shoulder arthroplasty

การรักษาสิวตามสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย (20)

การรักษามาตรฐาน (First line treatment)

สิวเล็กน้อย

เลือกยาเฉพาะที่ตัวใดตัวหนึ่งก็ได้ที่เป็นหลักฐานระดับ 1 คำแนะนำระดับ A หรือ อาจใช้ยาทาเฉพาะที่ร่วมกันหลายตัวเพื่อเพิ่มผลการรักษา ได้แก่

- Benzoyl peroxide 2.5 % - 5 % (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)
- Topical retinoid 0.01 % - 0.1 % (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)
- Clindamycin 1 % solution (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)
- Erythromycin 2 % - 4 % solution หรือ gel (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำ

ระดับ A)

- Salicylic acid (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ A)
- Azelaic acid (หลักฐานระดับ 1, คำแนะนำระดับ C)

- Sulfur, resorcinol (หลักฐานระดับ 2, คำแนะนำระดับ C) ทั้งนี้หากใช้ยาฆ่าเชื้อ Erythromycin หรือ clindamycin อย่างเดียว จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา

สิวปานกลาง

ใช้ยาทาเช่นเดียวกับสิวชนิดเล็กน้อย ร่วมกับยารับประทานคือ Tetracycline ในกรณีแพ้ยากลุ่ม tetracycline ให้ใช้ Erythromycin

สิवरุนแรง

การรักษาหลักคือ ยารับประทาน isotretinoin เริ่มขนาด 0.5-1 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักกิโลกรัมต่อวัน ร่วมกับยาทา หรือการรักษาเสริมอื่น ๆ เช่น การกดสิว (comedone extraction), การฉีดสเตียรอยด์บริเวณสิวอักเสบ (intralesional steroid) และการรักษาด้วยแสงและเลเซอร์ (laser therapy and light therapy)

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *C. acnes* และการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ในห้องทดลองประกอบด้วย

1. Minimal inhibition zone (MIZ)
2. Minimal inhibition concentration (MIC)
3. Minimal bactericidal concentration (MBC)

นิยามของ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) (79-81)

1. Minimal inhibition zone (MIZ)

โซนใสที่บ่งบอกความสามารถของของยา ปฏิชีวนะหรือยาสารทดสอบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาหรือสารทดสอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ หน่วยที่ใช้ได้แก่ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร โดยค่า MIC สามารถนำไปเปรียบเทียบดูความไวของเชื้อที่ทดสอบต่อยาต้านแบคทีเรีย ซึ่งนิยมใช้วิธี broth dilution test

3. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

ความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.99% หน่วยที่ใช้ได้แก่ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร

Media, Sterilisation and disinfection (82) Preparation of culture media and Pouring a plate

เตรียม sterilization อุปกรณ์ โดย autoclave หรือ pressure cooker เตรียม Media หรืออาหารเลี้ยงเชื้อใช้ประมาณ $15\text{--}20\text{ cm}^3$ ต่อ petri dish เท Agar ที่ละลายแล้วจาก water bath โดยวิธี sterilization ลงบน dish จากนั้นปล่อยให้แข็งตัว และกำจัดฟองบน agar ออก ควรใช้ Agar เร็วที่สุดเมื่อใช้ได้ แต่จะต้องเก็บไว้ตมปิดด้วยพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหยออก

Storage of media

ควรเก็บ media ไว้ ห่างจากแสงแดดปิดด้วย สำลี หรือ ฝาพลาสติก เพื่อป้องกันการระเหยเมื่อต้องการจะใช้อีกให้ละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Culture

Streak plate

ใช้ loop ในการ streak plate จุ่มลงใน สารละลาย bacteria และ streak ลงบน plate โดย streak โดยทั่วและ ทำ 4 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำมุม 90°

Spread plate

ใช้สำหรับนับจำนวน เช่น colony counts ใช้สารละลายที่จะเพาะเชื้อ ประมาณ 0.1 cm^3 โดยการ dilution แบบที่เรียกว่าได้ แบคทีเรียสุดท้ายที่ 30-100 colonies เพื่อสามารถอ่านแปลผลได้

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (81, 83)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย คือการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์ชนิดจำเพาะของยาหรือสารทดสอบ วิธีที่ใช้แพร่หลายได้แก่ broth microdilution หรือ automated instrument method ส่วนวิธีที่เป็น manual ราคาประหยัด ได้แก่ disk diffusion และ gradient diffusion method โดยผลลัพธ์ที่ได้จะเป็น เชิงปริมาณ เช่น minimal inhibitory concentration และเชิงคุณภาพ ได้แก่ categories susceptible, intermediate และ resistance โดยวิธีที่ทดสอบการยับยั้งเชื้อได้แก่

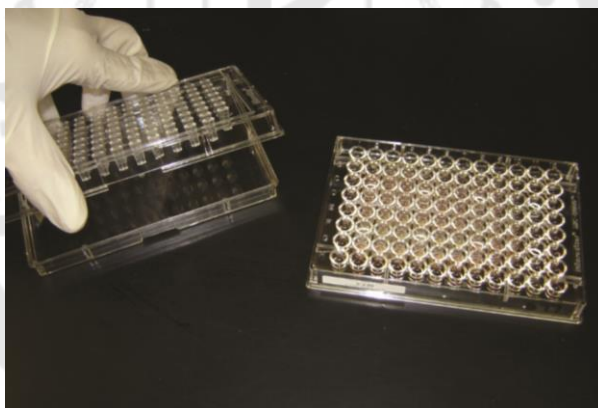
1. Broth dilution test

เป็นวิธีการทดสอบหาความเข้มข้นของยาหรือสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) โดยวิธีการทำคือ เจือจางยาหรือสารทดสอบทีละ

2 เท่า (two-folded serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยมีเชื้อแบคทีเรียปริมาณ $1-5 \times 10^5$ CFU/ml บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส หากยาหรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก็จะไม่เกิดการเจริญเติบโตของเชื้อ หากเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้จะพบเป็นสีขุ่น โดยจะประเมินค่า MIC จากหลุมความเข้มข้นสุดท้ายที่ใส เพื่อเพิ่มความแม่นยำ จะประเมินหลุมที่มีความเข้มข้น มากกว่าและน้อยกว่าค่า MIC 1 หลุม รวมทั้งสิ้นเป็นข้อมูล 3 ค่า

2. Microdilution

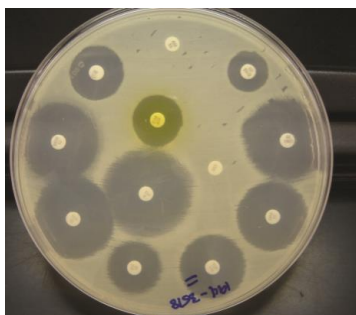
ทำได้โดยเจือจางยาหรือสารทดสอบลงในของเหลวที่เป็นอาหารใน ถาด 96 หลุม (well plate) สามารถใส่สารทดสอบหรือยาได้ 8 ชนิด และอย่างละ 8 ความเข้มข้น ทำโดยเจือจางสารทดสอบ ในแต่ละ well ให้ได้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 8 ความเข้มข้น จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 5×10^5 CFU/ml แปลผลค่า MIC วิธีนี้สามารถหาค่า MIC โดยสามารถแปลผลได้ด้วยวิธี manual หรือ automated ข้อดีคือ สามารถอ่านได้หลายค่าพร้อมกัน และสามารถแปลผลด้วยวิธี automated ได้ ข้อเสีย คือมีข้อจำกัดของจำนวนชนิดของยาหรือสารทดสอบ



ภาพประกอบ 15 ถาด 96 หลุม (well plate)

3. Diffusion method

การทดสอบหาบริเวณที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยยาหรือสารทดสอบ โดยให้ยาหรือสารทดสอบค่อย ๆ กระจายตัวลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจำนวนที่เหมาะสมอยู่ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบภาชนะบรรจุยาที่ได้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาหรือสารทดสอบ วิธีนี้ทำได้ง่าย รวดเร็ว แปลผลง่าย ราคาไม่แพง แต่ไม่สามารถบอกค่า MIC และ MBC ได้



ภาพประกอบ 16 Diffusion method

4. Antimicrobial gradient method

เป็นการวัดความไวของของแบคทีเรียต่อยาเชิงปริมาณ วิธีการคือ นำแผ่นพลาสติกที่เคลือบผงยาวางไว้บนวุ้นที่มีแบคทีเรียปริมาณที่เหมาะสมอยู่ โดยความเข้มข้นของผงยาแต่ละจุดของบริเวณที่ทดสอบแตกต่างกัน เมื่อเกิดวงใสซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทำให้สามารถอ่านค่า MIC และอัตราส่วนการยับยั้งแบคทีเรียของความเข้มข้นของยาระดับต่าง ๆ ได้ สามารถแปลผล MIC



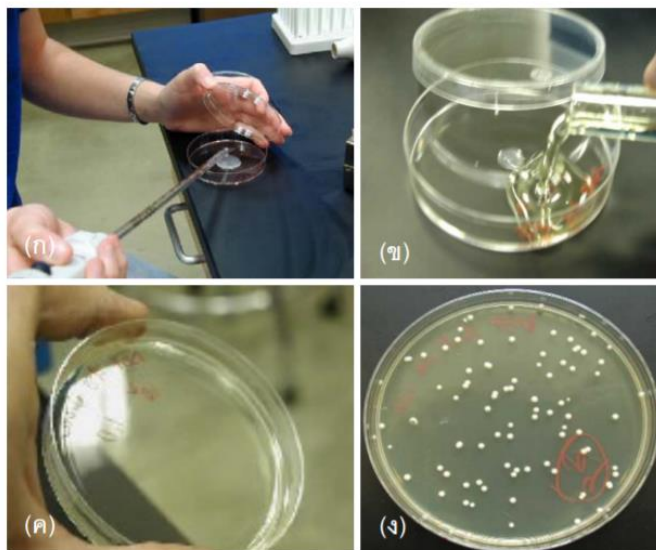
ภาพประกอบ 17 Antimicrobial gradient method

5. Automated instrument systems

เครื่องมือมาตรฐานที่สามารถบอกความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างอัตโนมัติ รวดเร็ว ตั้งแต่ 3.5-16 ชั่วโมง และอ่านได้ถึง 40-96 หลุม

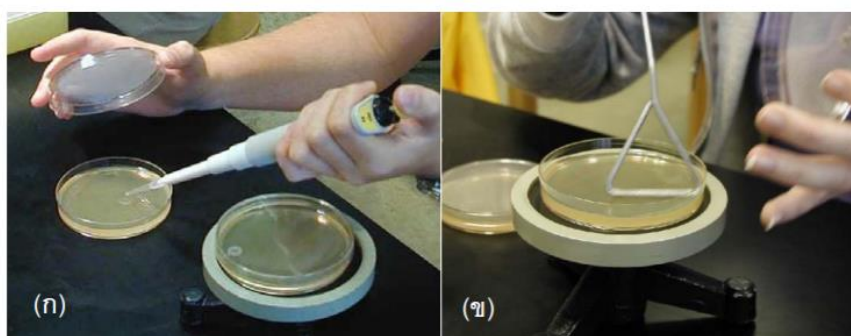
การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด มีวิธีดังนี้

1. Pour plate วิธีนี้ใช้ในการนับจุลินทรีย์ในอาหาร โดยเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถอ่านค่าได้ และนำไป plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่ม ในอุณหภูมิ เวลาที่เหมาะสม และอ่านค่ารายงานผลเป็น จำนวนจุลินทรีย์ หน่วยเป็น colony forming unit (CFU)/ g



ภาพประกอบ 18 เทคนิคพอร์เพลต (ก) ปิเปตสารละลายตัวอย่างลงในจานปลอดเชื้อ
(ข) เทอาหารวุ้นที่หลอมเหลวผสมกับสารละลายตัวอย่าง (ค) ลักษณะของอาหารวุ้นที่แข็งตัว และ
(ง) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้น (84)

2. Spread plate เจือจางเชื้อที่ต้องการให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ นำมาเกลี่ย (spread) บนผิวหน้าอาหารวุ้นที่แข็งแล้ว โดยใช้ spreader



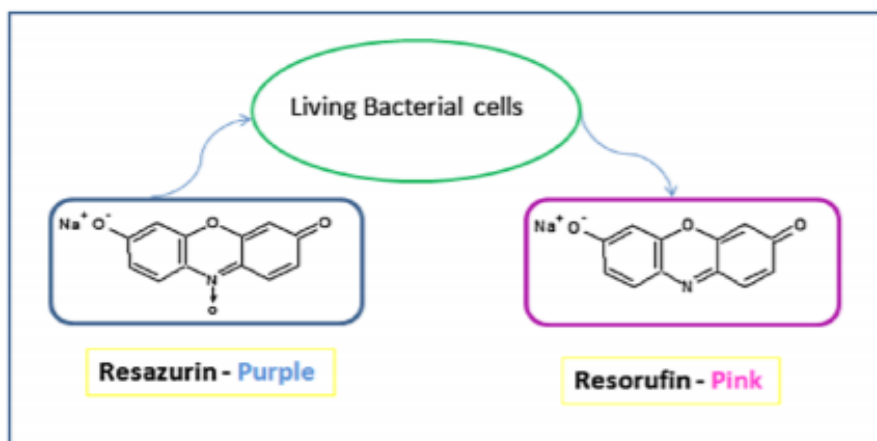
ภาพประกอบ 19 เทคนิคสเปรดเพลต (ก) การปิเปตสารละลายตัวอย่างลงบนผิวหน้าอาหารวุ้น
(ข) การเกลี่ยสารละลายตัวอย่างด้วย spreader (84)

3. Drop plate ทำโดย เจือจางจุลินทรีย์ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ใช้ปิเปตดูดจุลินทรีย์แต่ละความเข้มข้น 0.02 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุความเข้มข้นที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ และทิ้งไว้ 20-30 นาที จนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง วิธีนี้จุลินทรีย์จะเจริญเป็น

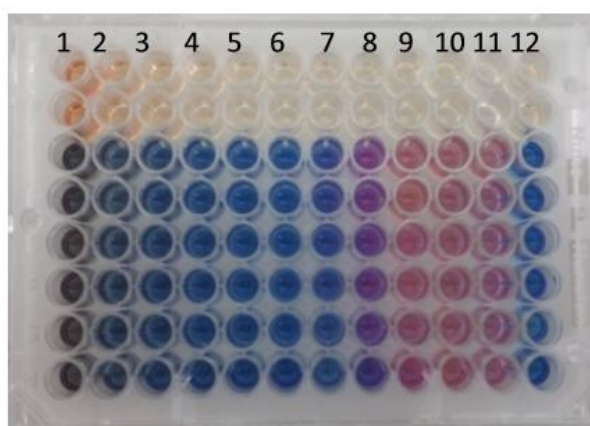
โคโลนีเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น และเหมาะกับจำนวนโคโลนีที่น้อยกว่า 50 โคโลนี ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับงานวิจัยนี้เนื่องจากต้องการหาช่วงเวลาและความเข้มข้นที่ BP ยับยั้งเชื้อได้ โดยจะเลือก plate ที่ไม่มีการเจริญเติบโตของโคโลนี

Resazurin

เนื่องจาก MIC เป็นวิธีการหาความเข้มข้นของยาหรือสารที่น้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อ และเป็นวิธีมาตรฐานตาม Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI) โดยเทคนิคที่นิยมใช้คือ microdilution and agar dilution methods ซึ่ง สามารถบ่งบอกทั้งข้อมูลทางคุณภาพและปริมาณแต่จะต้องมีการอ่านค่าโดยตาเปล่าซึ่งทำให้ขาดความแม่นยำ Resazurin เป็นสารที่มีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยา reduction กับแบคทีเรียและทำให้ Resazurin เปลี่ยนสีจากสีม่วง เป็นสีชมพู นำมาใช้ร่วมกับวิธี MIC



ภาพประกอบ 20 ปฏิกิริยา oxidation ของ bacteria ต่อสาร resazurin ทำให้สารกลายเป็นสีชมพู



ภาพประกอบ 21 หลุมที่มีการเปลี่ยนแปลงของสี Resazurin

จากรูปแสดงให้เห็น หลุมที่มีการเปลี่ยนแปลงของสี Resazurin คือหลุมที่มีเชื้อเจริญเติบโตอยู่ และหลุมความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของ resazurin จะ แปลผลเป็น ค่า MIC (85)

ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* โดยใช้ BP โดยกระบวนการ free radicals หากเติมสาร resazurin ที่มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา oxidation ก็จะทำให้เกิดการแปลผลที่ผิดได้

สาร NaOH (Sodium hydroxide) มีฤทธิ์เป็น base ที่รุนแรง ละลายในน้ำ สามารถทำปฏิกิริยา oxidation กับ free radicals ของ BP และสามารถยับยั้งการทำงานของ Benzoyl peroxide ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (86) ในการทดสอบ time killing assay ผู้วิจัยจึงใช้ NaOH เพื่อหยุดการทำงานของ BP ที่เวลา 30 วินาที, 1, 5, 10, 15, 30, และ 60 นาที หลังจากนั้นเติมสาร Resazurin เพื่อประเมินความสามารถในการฆ่าเชื้อของ BP ณ เวลาดังกล่าว

ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของการทดสอบความไวของยาหรือสารทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรีย (87, 88)

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (growth media)

คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย ความเป็นกรด ด่าง (pH) ประจุบวก ซึ่งประกอบด้วย ความเข้มข้นของ แคลเซียม (Ca^{2+}) และ แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เนื่องจาก ความเป็นประจุบวกที่จะมีผลกับการผ่านของยาเข้าผนังเซลล์ เมื่อภาวะความเป็นบวกที่ต่ำเกินไป จะทำให้เชื้อไวต่อยาเกินความเป็นจริง อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการทดสอบยา ได้แก่ Muller Hinton Broth, Brain heart infusion broth หรือ Brucella broth นอกจากนี้ความหนาของวุ้น (agar) มีผลต่อการแปลผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดย ยาหรือ สารทดสอบ ความหนามาตรฐานของวุ้น ประมาณ 4 มม. หากความหนาบางหรือหนาเกินไปเมื่อทดสอบสารโดยวิธี agar diffusion จะทำให้ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวงกว้างหรือ แคบเกินไป ตามลำดับ ทำให้แปลผลผิดพลาด

2. อุณหภูมิ และ บรรยากาศ (temperature and atmosphere)

อุณหภูมิและ บรรยากาศที่เหมาะสมกล่าวคือ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อนั้น ๆ บ่มในบรรยากาศที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เนื่องจากบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำ (H_2O) เมื่อน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์รวมกันเกิดปฏิกิริยาเป็นกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. ปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ควรมีปริมาณที่เหมาะสมเพื่อสามารถอ่านประสิทธิภาพการต้านยาหรือดื้อยาที่ชัดเจน หากปริมาณเชื้อมากหรือน้อยเกินไปจะก่อให้เกิด ผลการไวต่อของเชื้อแบคทีเรียต่อยาที่ไวเกินจริงหรือ น้อยกว่าความเป็นจริง

4. ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (incubation time)

แต่ละเชื้อมีระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เหมาะสมแตกต่างกัน โดยทั่วไประยะเวลาบ่มเชื้อประมาณ 16-20 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. acnes* ใช้ระยะเวลาบ่มเชื้อ 3-7 วัน (89-91)

สาเหตุของความคลาดเคลื่อนในการทดสอบ (88)

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด รุ่น ของแต่ละบริษัท ที่ผลิต ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ความผิดพลาด หรือรายละเอียดที่ครบถ้วนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ความเหมาะสมของวิธีการเลี้ยงเชื้อ และวิธีการใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตที่เหมาะสมกับเชื้อนั้น ๆ เช่น Diffusion method เหมาะสำหรับเชื้อที่โตเร็วและมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ในแต่ละ bath

3. ส่วนประกอบของระบบการทดสอบ ได้แก่ สภาวะแวดล้อมการเก็บยา

4. ปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ (inoculum) หากใช้ปริมาณเชื้อที่มากเกินไป หรือน้อยเกินไปจะทำให้การอ่านค่าแปลผลในการยับยั้งเชื้อของยาหรือสารทดสอบดื้อต่อยาเกินจริง หรือแสดงความไวต่อยาเกินจริง

5. อุณหภูมิ (temperature) และ บรรยากาศ (atmosphere) การบ่มเชื้อที่ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านแบคทีเรีย ควรทำในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบและบ่มในบรรยากาศที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะรวมกับน้ำบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) ทำให้เกิดความเป็นกรดซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

6. ระยะเวลาการบ่ม (incubation period) ซึ่งแตกต่างกันแต่ละเชื้อ โดยทั่วไปควรบ่มเชื้อเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง นอกเหนือจากเชื้อที่เจริญช้าอาจใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมง โดย *C. acnes* ใช้เวลา 3-7 วัน

7. ขั้นตอนการทดสอบไม่ถูกต้อง เช่น การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ (inoculum preparation) กระบวนการปราศจากเชื้อ (sterilization) การอ่านค่าและการแปลผล เป็นต้น

ทบทวนวรรณกรรม *C. acnes* และ Measurement outcome

ตาราง 4 ทบทวนวรรณกรรม *C. acnes* และ Measurement outcome

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Pilanthana Lertsatitthan akorn et al (2010) / Journal of Essential oil Research (92)	Effect of citronella Oil on Time Killing Profile, Leakage and Morphological Change of <i>Propioni-bacterium acnes</i>	- <i>C. acnes</i> DMST14916 culture on Tryptic casein soy agar incubated in thioglycolate broth 37 °C for 72 hr. Oil dilutes with 1% w/v Tween 80 and add bacteria to conc 10^6 CFU/mL - Lethal effect: 0.1 ml of <i>C. acnes</i> added to 0.9 ml oil to 10^7 CFU/mL then transferred 0.1 ml to 0.9 ml of NSS at 0,1,3 and 6 h at 37 °C then serial dilute in NSS and counting by pour plate method - leakage of intracellular material and electron microscope	- MIC, MBC - Time- log survivors curves	- citronellal and citronellol no bactericidal effect - MBCs of geraniol 1.56 mL/mL, citronella oil 0.625 mL/mL - concentrations of citronella oil (50 and 100 ml/mL) took 30 min to reach 1-log reduction and 3.5 h to reach 3-log reduction. - Support the same result of intercellular leakage and morphological changes of <i>P. acnes</i> in lethal curves

ตาราง 4 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Kamei et al (2009) / The Journal of antibiotics, 62(5), 259-263. (93)	The novel anti- <i>Propionibacterium acnes</i> compound, Sargafuran, found in the marine brown alga <i>Sargassum macrocarpum</i>	- <i>C. acnes</i> culture on RCA plate washed twice with sterile 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6). The absorbance was adjusted to 0.1 at 660 nm. The bacterial cell suspension (5 ml each) was aliquoted in sterile test tubes and exposed to Sargafuran at various concentrations or to ol. Untreated bacterial suspensions were used as negative controls. The concentration of MeOH (the solvent of Sargafuran) in each tube was less than 0.1% (v/v). The test tubes were incubated at 37°C under anaerobic conditions. The absorbance at 660 nm was measured at 0, 0.15, 0.5, 0.45, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 h after incubation	- Time-killing curve experiment - Bacteriolytic assay - Antibacterial Test - MIC	- MIC =15 mg/ml - Sargafuran killed <i>P. acnes</i> strain tested within 4h

ตาราง 4 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
Eady et al. (1996)/ British Journal of dermatology (94)	The effects of acne treatment with a combination of BP and erythromycin on skin carriage of erythromycin resistance propionibacteria	Method - Apply twice daily entire face -6, 12 weeks - Measurement: 1. Williamson and Kligman: <i>C. acnes</i> were obtained by plating serial 10-fold dilutions of the wash fluid on to Reinforced Clostridial agar (Oxoid. Basing-stoke. Hants. U.K.) containing 2/ig/ml furazolidone (Sigma Chemical Co., Poole. Dorset. U.K.) to inhibit the growth of staphylococci. Erythromycin-resistant <i>C. acnes</i> onto the same medium containing 0-5 ug/ml erythromycin (Sigma). Plates growth after 7 days' incubation at 34 C anaerobic cabinet. 2. Total and erythromycin-resistant staphylococci were also monitored in study I by plating serial	- Acne counts - Acne grading	- Result: 5%BP/3% erythromycin มีประสิทธิภาพลด <i>C. acnes</i> > 3log ₁₀ c.f.u และ ลด <i>C. acnes</i> ที่ดื้อยา erythromycin โดยมี ประสิทธิภาพมากกว่า erythromycin ชนิดทา ที่ 6 และ 12 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ - Acne grading: Combination significantly reduce acne grading, inflammation and non-inflammation after 6, 12 weeks

ตาราง 4 (ต่อ)

Ref/ Journal	Title	Method	Outcome measurement	Result
		dilutions of wash fluid on to heated blood agar. without selection, and on to isoSensitest agar (Oxoid) containing 5/ig/ml erythromycin.		



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (experimental, cross-sectional study)

กลุ่มเป้าหมายของงานวิจัย (target population)

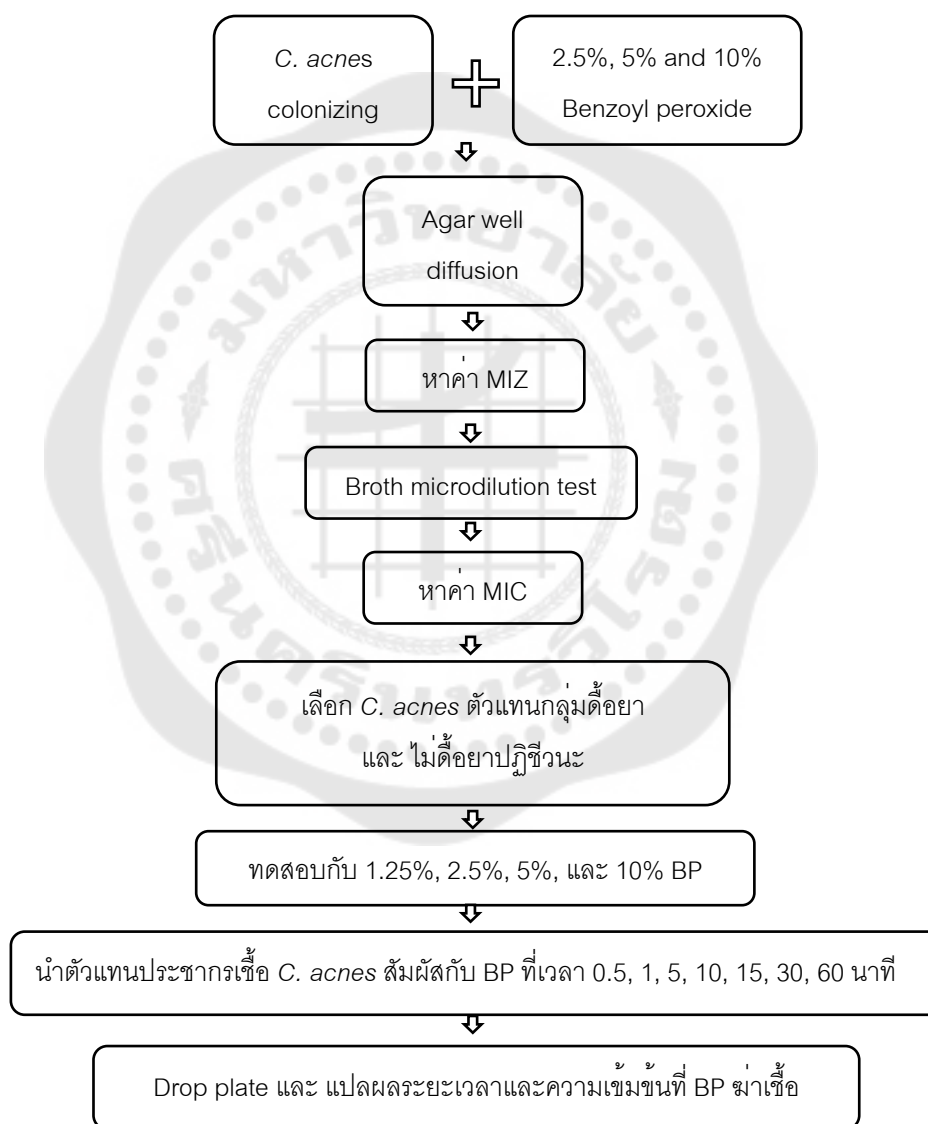
ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อ *Cutibacterium acnes* ที่แยกได้จากอาสาสมัครจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A. เป็นงานวิจัยที่ศึกษารูปแบบการไวของเชื้อ *C. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะ โดยงานวิจัยนี้ได้มีการเก็บเชื้อ *C. acnes* จากคนไข้สิวที่มารักษาที่ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย เป็นคนไข้กลุ่มตัวอย่างจำนวน 95 คน กลุ่มแบ่งเป็นกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ และกลุ่มเชื้อที่ดื้อ Tetracycline, clindamycin และ erythromycin

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารและสารเคมี
 - 1.1 Brain heart infusion agar และ Brain heart infusion broth
 - 1.2 Horse serum
 - 1.3 McFarland standard solution
 - 1.4 เชื้อ *C. acnes*
 - 1.5 Benzoyl peroxide (BP)
 - 1.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 - 1.7 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water)
2. อุปกรณ์ได้แก่
 - 2.1 ปากคีบ (forceps)
 - 2.2 หลอดทดลอง (test tubes)
 - 2.3 ขวดปริมาตร (flask)
 - 2.4 Magnetic bars
 - 2.5 Magnetics hot plate stirrer

- 2.6 เครื่องอบฆ่าเชื้อ
- 2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิน้ำ
- 2.8 ตู้พ่นอากาศบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ (laminar flow)
- 2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.10 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)

ขั้นตอนการวิจัย



ภาพประกอบ 22 ขั้นตอนการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัย มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การเตรียมเชื้อ *C. acnes*

ผู้วิจัยได้นำเชื้อ *C. acnes* ที่เก็บจากอาสาสมัครจากงานวิจัย Laochusuwan A. ทำการทดสอบต่อ ซึ่ง *C. acnes* นั้นเก็บที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80 °C โดยเก็บไว้ใน BHI broth และ 20% glycerol เพื่อรักษาคุณภาพของเชื้อ *C. acnes* ซึ่งการเก็บเชื้อ *C. acnes* นั้นเก็บแยกหลอดตามรหัสของอาสาสมัครซึ่งมีการเขียนรหัสลายลักษณะอักษร อย่างชัดเจนที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อนำเชื้อ *C. acnes* มาใช้ผู้วิจัยจะนำเชื้อบางส่วนจากหลอดเก็บเชื้อมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มี 10% horse serum หลังจากนั้นบ่มเพาะเชื้อจนเชื้อเจริญเติบโตเป็น colony ที่ต้องการเสร็จสมบูรณ์ นำ colony นั้นมาใช้ทดสอบต่อไป

2. เตรียม Benzoyl peroxide material รหัส 801641 ผสมโดย 25% DMSO หลังจากนั้นนำ BP ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25%, 2.5%, 5% และ 10%

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ด้วยวิธี agar well diffusion

3.1 นำเชื้อ *C. acnes* ชนิดที่ดื้อยา และชนิดไม่ดื้อยาจากตัวอย่างที่เก็บมาใส่ใน Brain heart infusion broth แล้วทดสอบความขุ่น (OD) ของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^8 โคโลนียูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)

3.2 เตรียมจานเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่มี 10% Horse serum หลังจากนั้นนำสำลีชุบสารละลาย *C. acnes* ป้ายลงบนจานเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี three-dimension swab โดยการป้าย 3 ทิศทาง เป็นแนวขนานกับจานจนเต็มจานเพาะเชื้อ ซึ่งแต่ละครั้งทำมุม 45 องศา กับทิศทางก่อนการป้ายก่อนหน้านี้ และทิ้งไว้เพื่อให้ส่วนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3.3 ใช้ sterile cork border ขนาด 4 มม. เจาะหลุมบนอาหารแข็ง ในข้อ 3.2 โดยเว้นระยะห่างแต่ละหลุมพอประมาณ

3.4 ใส่สาร BP ที่เตรียมไว้ ในข้อ 2 ปริมาณ 40 ไมโครลิตร (μL) ลงในหลุมแต่ละหลุม

3.5 ทำซ้ำข้อ 3.1-3.3 จนครบเชื้อ 70 ชนิด

3.6 จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน

3.7 บันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) ประเมินผลเป็น มิลลิเมตร (มม.) แปลผลเป็น MIZ (minimal inhibition zone)

3.8 นำผลที่ได้ทั้งหมด มาหาค่ามัธยฐาน และ พิสัยควอไทด์

4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* จากการหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution ของเชื้อ *C. acnes* จากกลุ่มตัวอย่าง

4.1 นำเชื้อ *C. acnes* จากตัวอย่างที่เก็บมาใส่ใน Brain Heart Infusion broth ที่มี 10% Horse serum แล้ววัดความขุ่นของเชื้อแต่ละชนิดให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/ml

4.2 เจือจางเชื้อ *C. acnes* ที่จะทดสอบให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5×10^6 CFU/ml โดยเจือจางลงทีละ 10 เท่าลงอีก 2 ครั้ง

4.3 เจือจาง Benzoyl peroxide แต่ละชนิดเป็นลำดับส่วน 2 เท่า ด้วย Brain Heart Infusion broth ใส่ใน microtiter plate จากนั้นเติม *C. acnes* ที่ปรับความขุ่นแล้วลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ที่มี Benzoyl peroxide หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน

4.4 อ่านผลการเจริญของ *C. acnes* โดยเติมสาร Resazurin เป็นสารสีม่วงน้ำเงิน มีคุณสมบัติเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นหลุมที่มีการเปลี่ยนสีของสาร Resazurin บ่งบอกถึงมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเทียบกับหลุมควบคุมเป็นหลุมที่ไม่มี *C. acnes* และหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยาในหลุมทดลองที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ซึ่งหลุมทดสอบนั้นจะเห็นเป็นหลุมสุดท้ายที่มีสีม่วงน้ำเงิน

4.5 นำ ค่าความเข้มข้นของ BP ที่ได้มา โดยค่าที่น้อยที่สุดคือค่า MIC หลังจากนั้นจัดกลุ่ม เชื้อ *C. acnes* ดื้อยา และ เชื้อ *C. acnes* ที่ไม่ดื้อยา

5. การทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *C. acnes*

5.1 Stability BP ใน DMSO ใน culture medium ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* incubation 2 h ที่ 37°C

5.2 ชุดการทดลองประกอบด้วยผสม phosphate-buffered saline (PBS) ที่ความเป็นกรดต่ำ (pH) 6.0 เติมเชื้อ *C. acnes* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และเติมสารละลาย BP ที่ผสมกับ 25% DMSO โดยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น ร้อยละ 1.25, 2.5, 5 และ 10 ตามลำดับ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร โดยมีหลุมควบคุมเป็น control base และทำให้คงสภาพที่ภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้น และหยุดปฏิกิริยาด้วย NaOH 6 molar 20 ไมโครลิตรที่เวลา 30 วินาที, 1, 5, 10, 15, 30, และ 60 นาที ตามลำดับ หยดสารทดสอบสุดท้ายลงบน agar และบ่มที่ภาวะไร้ออกซิเจนอุณหภูมิ 37°C 5-7 หากไม่พบการเจริญของโคไลนีแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จะแปลผลว่าเกิดฤทธิ์การฆ่าเชื้อหรือเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ $\geq 99.99\%$

การประเมินผล

1. ประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของ Benzoyl peroxide (BP) โดยรายงานเป็นค่า บริเวณโซนใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* (MIZ)
2. ประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของ BP โดยรายงานเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ได้ (MIC)
3. ประเมินฤทธิ์การฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันกับระยะเวลาที่สัมผัสเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยวัดผลจากการไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล (Data collection and management)

รวบรวมข้อมูล ค่า MIZ ของ 2.5%, 5%, 10% BP ต่อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา ค่า MIC ของ BP ต่อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา รวบรวมข้อมูลฤทธิ์ Bactericidal ของ BP ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ต่อ *C. acnes* ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ

แบบฟอร์มเก็บรวบรวมข้อมูล

Outcome

1. MIZ of 2.5%, 5% and 10% Benzoyl peroxide on *C. acnes*
2. MIC of Benzoyl peroxide on *C. acnes*
3. Time killing profile of Benzoyl peroxide to *C. acnes*

ตาราง 5 แบบฟอร์ม Baseline characteristic

Susceptibility		จำนวน <i>C. acnes</i>
ดื้อยา	clindamycin	
	Erythromycin	
ไม่ดื้อยา		

ตาราง 6 แบบฟอร์ม MIZ

C. acnes	เชื้อ C. acnes ดื้อยา			C. acnes	เชื้อ C. acnes ไม่ดื้อยา		
	ค่า MIZ (มิลลิเมตร)				ค่า MIZ (มิลลิเมตร)		
	2.5%	5%	10%		2.5%	5%	10%
1							
2							
.							
70							
รายละเอียดของการ ยับยั้งเชื้อจาก isolate ดื้อยา ทั้งหมด				รายละเอียดของการ ยับยั้งเชื้อจาก isolate ดื้อยา ทั้งหมด			

ใช้เพื่อรายงานผลรายงานผล Mean $\pm$ SD หรือ Median + IQR ของ 2.5% BP, 5% BP และ 10% BP

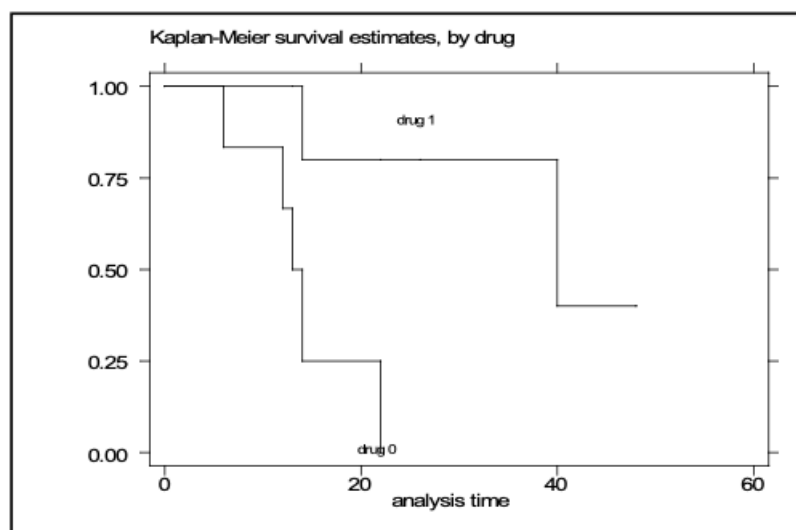
ตาราง 7 แบบฟอร์ม Susceptibility of *C. acnes* to Benzoyl peroxide by broth microdilution method

ตัวแปร	กลุ่มของเชื้อ <i>C. acnes</i>			p-value*
	ทั้งหมด	กลุ่มดื้อยา	กลุ่มไม่ดื้อยา	
	(N=70)	(N=41)	(N=29)	
ค่า MIC ของ BP (ไมโครกรัม/มิลลิเมตร)† (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)				

ตาราง 8 แบบฟอร์ม Time killing assay of *C. acnes* by Benzoyl peroxide

ระยะเวลา ที่สัมผัสเชื้อ (นาทื)	จำนวน isolate ที่ถูกฆ่าในแต่ละความเข้มข้นของ BP (isolates(%))			
	BP 1.25%	BP 2.5%	BP 5%	BP 10%
0.5				
1				
5				
10				
15				
30				
60				

failure_d: dead
analysis time _t:time



ภาพประกอบ 23 Kaplan-Meier Survival Curve

Definition: Bactericidal = Inhibit growth of *C. acnes* $\geq 99.99\%$

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คือ โปรแกรม The words statistics and data (Stata) version 14 for window

2. Baseline characteristic ของเชื้อ *C. acnes*

2.1 ข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data)

2.1.1 รายงานผลค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation/SD) เมื่อข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) รายงานผลเป็นค่ามัธยฐาน (median) และค่าส่วนเบี่ยงเบนควอไทล์ (inter-quartile range) เมื่อข้อมูลการกระจายตัวเป็นแบบไม่ปกติ ของเชื้อ *C. acnes* และค่า MIC

2. 1. 2 ข้อมูลที่จัดเป็นกลุ่ม (Categorical data) เปรียบเทียบกลุ่มเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยาโดยรายงานเป็นร้อยละ

3. ข้อมูลเชิงอนุมาน (Interferential statistics) เปรียบเทียบข้อมูล 2 กลุ่ม

3.1 ใช้ T-Test เปรียบเทียบความสามารถของ BP แต่ละความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อจากค่า MIZ ระหว่างกลุ่มเชื้อดื้อยาและ เชื้อไม่ดื้อยา

3.2 Shapiro-Wilk W test ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล MIC

3.3 ใช้ Wilcoxon Rank-sum test เปรียบเทียบความสามารถ bactericidal ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างความเข้มข้น BP ที่แตกต่างกัน

วิเคราะห์ข้อมูล Survival analysis (วิเคราะห์ระยะปลอดเหตุการณ์)

เป็นการหาระยะปลอดเหตุการณ์ (Time to event หรือ survival time) คือ ระยะเวลา ระหว่างเมื่อเริ่มต้นจนถึงเมื่อเกิดเหตุการณ์

สัญลักษณ์ที่ใช้ $T = \text{survival time } (T > 0)$

$t = \text{Specific value of } T$

การวิเคราะห์เพื่อตอบคำถามวิจัย

ข้อมูลเบื้องต้นของ survival analysis

1. Date of start accrual

2. Date of end accrual

3. Date of end follow up

4. จำนวน lost follow up

5. จำนวนที่ยังคงไม่เกิดเหตุการณ์ (Number at risk) ในแต่ละช่วงเวลา

โดยทำการศึกษาหัวข้อ ดังนี้

จุดเริ่มต้นคือ *C. acnes* ทั้งหมด 30 isolates ที่เป็นตัวแทนของกลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา และศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลา และจำนวน Isolate ที่รอดชีวิตที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยทดสอบด้วย BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5%, และ 10% และวัดผลที่ เวลา 30 วินาที 1, 5, 10, 15, 30, และ 60 นาที

ผลการวิเคราะห์เพื่อตอบคำถามวิจัย

1. Kaplan-Meier survival curve ระบุจำนวน isolate ของ *C. acnes* ที่รอดชีวิตหรือไม่เกิด bactericidal effect โดยวัดที่ระยะเวลา 30 วินาที, 1, 5, 10, 15, 30, และ 60 นาที หลังสัมผัสกับ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5%, และ 10%

3. เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต ระหว่าง *C. acnes* กลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยาที่สัมผัสกับ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5%, และ 10% วัดที่ระยะเวลา 30 วินาที, 1, 5, 10, 15, 30, และ 60 นาที เปรียบเทียบอัตราการเกิด bactericidal effect ของ BP แต่ละความเข้มข้น

4. Harzard ratio ใช้เปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของ bactericidal effect ของ BP ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเทียบกับ 1.25% BP

จริยธรรมทางการวิจัย (Ethical Considerations)

งานวิจัยที่เก็บเชื้อ *C. acnes* จากอาสาสมัครจากงานวิจัยของ Laochunsuwan A. ไม่ได้เก็บจากอาสาสมัครเพิ่มซึ่งงานวิจัยดังกล่าว ได้ผ่านการรับรองจากโครงการจริยธรรมสำหรับโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ BP ทำปฏิกิริยาฆ่าเชื้อ *C. acnes* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เป็นกลุ่มตัวแทนของสายพันธุ์ *C. acnes* ในประชากรคนไทยที่เป็นสิ่วโดยรูปแบบการวิจัยเป็นแบบ cross-section วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยคือ เพื่อหาความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ BP ที่ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5%, และ 10% ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* และวัตถุประสงค์รองคือ หาระยะเวลาน้อยที่สุดที่ BP ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ โดยงานวิจัยนี้ไม่ใช่ข้อมูลทางคลินิกหรือข้อมูลใด ๆ ที่อาจถึงคนไข้มานี้ จะใช้เพียงค่าการตอบสนองต่อ BP ซึ่งเก็บในรูปแบบข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ (electronic files)

ระยะเวลาการทำวิจัย

ใช้ระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 6 เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม 2563 - กุมภาพันธ์ 2564

แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย

ตาราง 9 แผนการดำเนินงานตลอดการวิจัย

ขั้นตอน	July 63	Aug 63	Sep 63	Oct 63	Nov 63	Dec 63	Jan 64	Feb 64	Mar 64
คิดหัวข้อวิจัย, ค้นหาข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ตั้งคำถามงานวิจัย ตั้งสมมติฐาน เสนอโครงร่าง งานวิจัย ขออนุมัติคณะกรรมการจริยธรรม การวิจัย		*	*	*					
ทำงานในห้องปฏิบัติการ เก็บข้อมูลงานวิจัย				*	*	*	*	*	
วิเคราะห์ข้อมูลวิจัย แปลผลวิจัย							*	*	
รายงานผลวิจัย ตีพิมพ์ผลงานวิจัย								*	*

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

งบประมาณ

ตาราง 10 งบประมาณที่ใช้ในการวิจัย

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
1. หมวดค่าใช้สอยและค่าตอบแทน	15,000
- ค่าพิมพ์เอกสาร/ รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	3,500
- ค่าผู้ช่วยวิจัย	10,000
2. หมวดวัสดุอุปกรณ์	
2.1 ค่าวัสดุในการเพาะเชื้อ	
- Sterile Petri Dish 90X15 mm (500 pcs.) 4 packs	12,800
- Pipette tip 1000 ul. (1000 ea./pack) 5 packs	1,800
- Pipette tip 200 ul. (1000 ea./pack) 5 packs	1,520
- Brain Heart Infusion Agar 500 g. 7 ขวด	12,250
- Brain Heart Infusion Broth 500 g. 3 ขวด	5,250
- Microtube 1.5 ml (1000 ea./pack) 4 packs	960
- Centrifuge tube 15 ml. Sterile 500 อัน	2,250
- Centrifuge tube 50 ml. Sterile 100 อัน	550
- Anaerobe gas pack/ Merck, 10 ea./pack 6 pack	9,000
- Horse serum 500 ml 10 ขวด	57,000
- ถุงมือไม่มีแป้ง No. S 10 กล่อง	1,600
2.2 ค่าอุปกรณ์ที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสาร	
- Benzoyl peroxide	1,500
- Ethanol	2,000
- DMSO	1,700
- Resazurin	8,000
2.3 ค่าเหมาจ่ายในการทำลายเชื้อและวัสดุปนเปื้อน	3,320
รวมงบประมาณทั้งสิ้น	150,000

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาระยะเวลาของ Benzoyl peroxide (BP) ที่มีความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) โดยผลการทดลองในงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วยข้อมูลการทดลองทั่วไป ลักษณะของกลุ่มเชื้อ *C. acnes* และผลของ BP ต่อ *C. acnes* ซึ่งแบ่งเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ผลทดสอบประสิทธิภาพของ 2.5% BP, 5% BP และ 10% BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone (MIZ)

ตอนที่ 2 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของ BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโต หรือ minimal inhibition concentration (MIC) ต่อ เชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution

ตอนที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของเบนโซิลเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5%, และ 10% ในการ ฆ่าเชื้อ *C. acnes* (bactericidal) ที่ระยะเวลา 30 วินาที, 1 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที, 30 นาที, และ 60 นาที ต่อเชื้อกลุ่มดีดียวและไม่ดีดียว

ข้อมูลการทดลองทั่วไป

ในการทดลองนี้การเตรียมสารละลาย BP เลือกสารละลายสารอินทรีย์ DMSO เป็นตัวทำละลายซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ชนิดไม่มีขั้ว (nonpolar) เป็นตัวทำละลายพื้นฐานทำหน้าที่ละลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ และใช้เป็นตัวทำละลาย BP อย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจาก BP ตกตะกอนง่ายในความเข้มข้นที่มากขึ้น การทดลองนี้ BP ความเข้มข้นสูงสุดคือ 10% จึงได้มีการทดสอบการละลายของ BP กับ DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของ DMSO ที่สามารถละลาย BP ได้ และไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *C. acnes* งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบ 100% DMSO, 50% DMSO และ 25% DMSO กับ เชื้อ *C. acnes* โดยวิธี agar well diffusion และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ที่ 100% DMSO มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* แต่ที่ 50% และ 25% DMSO ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จึงใช้ 25% DMSO เป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้ปัจจัยที่รบกวนความคงตัวของ BP หรือสารที่เพิ่มการสลายตัวของ BP เช่น สารที่เป็นกรด และ oxidizing agent เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้ไม่มีส่วนผสมของสารดังกล่าว (95)

ในการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *C. acnes* ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบอ้างอิงจากการศึกษาของ Okamoto และคณะ (40) ทดสอบความคงตัวของ BP โดยประเมินความคงตัวหลังบ่ม 2 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าความคงตัวของ BP ลดลง 50% จึงมีการทดสอบความคงตัวของ BP หลังบ่ม 1 ชั่วโมง พบว่าที่ 1 ชั่วโมงความคงตัวของ BP คงที่ การวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของ BP ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง

ในการทดสอบการฆ่าเชื้อ *C. acnes* ต่อหน่วยเวลาเนื่องจากต้องควบคุมเวลาให้ชัดเจนในการสัมผัสของ BP กับเชื้อ จึงต้องใช้สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ BP จากการศึกษาพบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มีคุณสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาของ BP (86) โดยใช้อัตราส่วน 6 molar โดย NaOH ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. acnes* ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ NaOH ต่อเชื้อ *C. acnes* ซึ่งไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ ดังนั้น จึงสามารถใช้ NaOH ในการยับยั้งปฏิกิริยาของ BP โดยที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ในการยับยั้งการทำงานของ BP ที่ 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ

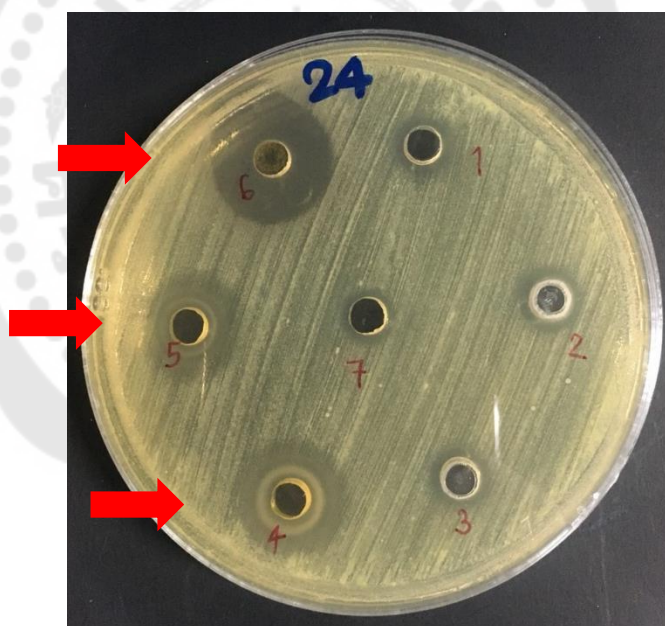
ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มเชื้อ *C. acnes*

เชื้อ *C. acnes* ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากงานวิจัยของ Laochusuwan A. (96) ที่แยกได้จากอาสาสมัครคนไทยที่มีสิ่วเพื่อศึกษาความไวของเชื้อ *C. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ โดยได้มีการเก็บเชื้อ *C. acnes* จากคนไข้สิ่วทุกระดับความรุนแรงที่มารักษาที่ศูนย์ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย เป็นคนไข้กลุ่มตัวอย่างจำนวน 95 คน ทั้งเพศชายและหญิง อายุระหว่าง 18 - 44 ปี ระยะเวลาเป็นสิ่วเฉลี่ย 5 ปี เคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะทั้งชนิดกินและชนิดทาร้อยละ 23.2 และไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร้อยละ 37.9 โดยแบ่งจากงานวิจัยสามภาคแบ่ง *C. acnes* เป็นกลุ่มเชื้อดื้อยาและเชื้อไม่ดื้อยา ซึ่งกลุ่มเชื้อดื้อยาจะหมายถึง *C. acnes* นั้นดื้อยาปฏิชีวนะชนิดใดชนิดหนึ่งไม่ว่าจะเป็นยาปฏิชีวนะ ชนิด Tetracycline, clindamycin หรือ erythromycin

ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล

ตอนที่ 1 ผลทดสอบประสิทธิภาพของ 2.5% BP, 5% BP และ 10% BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง หรือ minimal inhibition zone (MIZ)

ในช่วงแรกนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเติมสาร BP ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ลงไปในแต่ละหลุม ที่มีขนาด 4 มิลลิเมตร และวัดผลจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) รอบหลุม หากเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบหลุมได้มากกว่า 4 มิลลิเมตร (ลูกศรสีแดง ภาพประกอบ 24) หากวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 4 มิลลิเมตร จะแปลผลว่าไม่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นในการแปลผลค่า MIZ และการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition) ของเชื้อ *C. acnes* หากค่า MIZ มีค่ามากกว่า 4 มิลลิเมตร จะแสดงถึงมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อ เชื้อ *C. acnes*



ภาพประกอบ 24 การทดสอบ MIZ ของ BP ต่อ *C. acnes* แสดง plate วงใสการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* รหัส 24 ด้วย BP ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ผลการทดสอบพบว่าวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบหลุมของ BP ความเข้มข้นที่ 2.5% (วงเบอร์ 4), 5% (วงเบอร์ 5) และ 10% (วงเบอร์ 6) ได้มากกว่า 4 มิลลิเมตร ดังลูกศรสีแดง แปลผลว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* รหัส 24

1.1) ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) ของ BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ต่อเชื้อ *C. acnes* ในกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาจำนวน 70 isolates ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางรอบหลุม (MIZ) เป็นมิลลิเมตร ดังแสดงในตาราง 11 ผลการศึกษพบว่า ในเชื้อกลุ่มดื้อยาเมื่อดูจากค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) BP ที่ความเข้มข้น 2.5% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มดื้อยาได้ 36 isolates จากทั้งหมด 41 isolates คิดเป็นร้อยละ 87.8 เช่นเดียวกับ BP ความเข้มข้นที่ 5% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มดื้อยาได้ 36 isolates คิดเป็นร้อยละ 87.8 และ BP ความเข้มข้นที่ 10% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มดื้อยาได้ 39 isolates คิดเป็นร้อยละ 95 ส่วนเชื้อกลุ่มไม่ดื้อยาพบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มไม่ดื้อยาได้ทุก isolates (ร้อยละ 100)

ตาราง 11 ผลค่า MIZ ของ 2.5% BP, 5% BP และ 10% BP ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

เชื้อ <i>C. acnes</i> ดื้อยา (n = 41)				เชื้อ <i>C. acnes</i> ไม่ดื้อยา (n = 30)			
รหัสเชื้อ	ค่า MIZ (มิลลิเมตร)			รหัสเชื้อ	ค่า MIZ (มิลลิเมตร)		
	2.5% BP	5% BP	10% BP		2.5% BP	5% BP	10% BP
1	9	15	12	9	8	8	9.5
2	7.5	16	11.5	21	9	8	8.5
3	12	14	10	41	8	8	8
4	9.5	11	11.5	42	8	9.5	8.5
5	11	12.5	12.5	43	10	10	12
6	9	13	11.5	44	8.5	7.5	9.5
7	10	13	10.5	45	7.5	9	7.5
8	9	12	12	46	9.5	11.5	11
10	10.5	11.5	11	47	9.5	10.5	12.5
11	12	11.5	13	48	10	10	12
12	11.5	12.5	12	49	8	10	11
13	10.5	13	13	50	9	8.5	9
14	9.5	12	11.5	51	7	7	8
15	10	12	10.5	52	10	8	11
16	9.5	12.5	10.5	53	8.5	9.5	11

ตาราง 11 (ต่อ)

เชื้อ <i>C. acnes</i> ดื้อยา (n = 41)				เชื้อ <i>C. acnes</i> ไม่ดื้อยา (n = 30)			
รหัสเชื้อ	ค่า MIZ (มิลลิเมตร)			รหัสเชื้อ	ค่า MIZ (มิลลิเมตร)		
	2.5% BP	5% BP	10% BP		2.5% BP	5% BP	10% BP
17	-	-	15	54	12	12	15
18	10	13	11	56	8	8.5	10
19	8.5	11.5	10.5	57	8	9	10
20	10.5	11	10.5	58	9	9.5	10
22	15	13	10	59	8	9	11.5
23	10	14	13	60	9	9.5	11.5
24	10	15.5	12.5	61	8.5	11	10
25	8	10	12	62	10.5	11.5	10
26	-	-	-	63	10.5	10	13.5
27	-	-	-	64	7.5	9.5	11
28	8.5	11	10	65	7.5	7.5	9.5
29	-	-	-	66	9	9	9
30	8	8.5	9.5	68	7.5	7.5	8.5
31	9.5	14	12	69	8.5	8.5	10.5
32	10	12	8.5	70	7.5	8.5	10
33	8	13	11.5				
34	8	9	8				
35	10.5	12.5	10.5				
36	11	9	11				
37	-	-	20				
38	10	13	11.5				
39	8	9	9.5				
40	9	14	10.5				
55	10.5	9.5	11.5				
67	8	8.5	10.5				
ร้อยละของการยับยั้งเชื้อจาก isolate ดื้อยาทั้งหมด				ร้อยละของการยับยั้งเชื้อจาก isolate ไม่ดื้อยาทั้งหมด			
87.8				100			
87.8				100			
95				100			

- หมายถึง ไม่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

1.2) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยคิดจากจำนวน isolates ที่ถูกยับยั้งได้ (Growth inhibition) ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

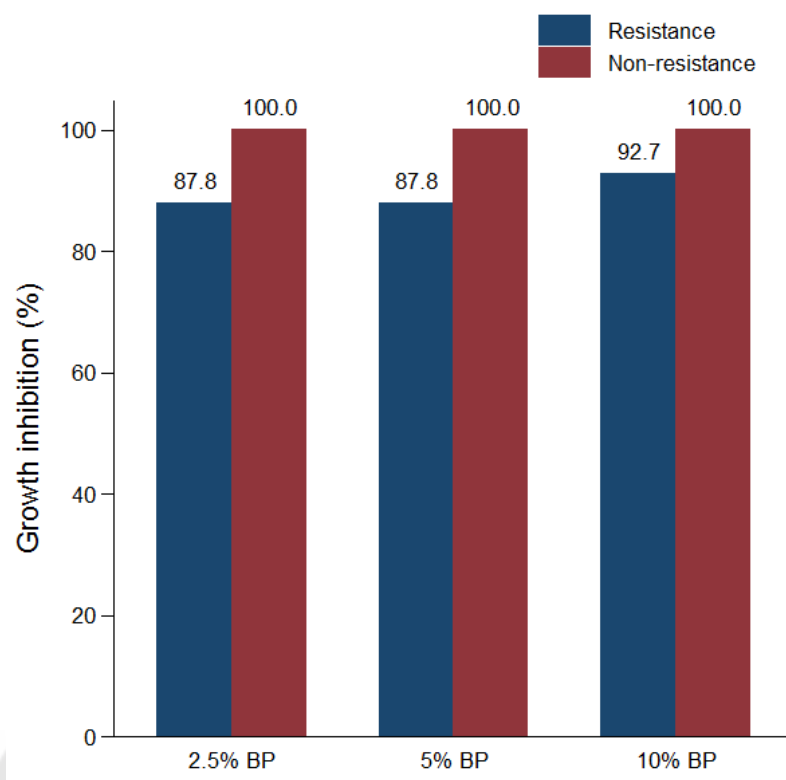
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibition) ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยดูจากความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงในตาราง 12 และภาพประกอบ 25 ผลการศึกษาพบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibition) ในกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาเป็นร้อยละ 87.8 และ 100.0 ตามลำดับ (p-value = 0.072) ประสิทธิภาพของ BP ที่ความเข้มข้น 5% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition) ร้อยละ 87.8 และ 100.0 ตามลำดับ (p-value = 0.072) และ BP ความเข้มข้นที่ 10% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกันเช่นกัน โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition) ร้อยละ 92.7 และ 100.0 ตามลำดับ (p-value = 0.261) ถึงแม้ว่าในกลุ่ม *C. acnes* ที่ดื้อยาจะมีเปอร์เซ็นต์ของ isolates ที่เชื้อถูกยับยั้งได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยา ดังนั้นพบว่า BP ทั้ง 3 ความเข้มข้นสามารถยับยั้งจำนวน isolates ของเชื้อ *C. acnes* ในกลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน

ตาราง 12 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยคิดจากจำนวน isolates ที่ถูกยับยั้งได้

ความเข้มข้นของ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์	กลุ่มของเชื้อ <i>C. acnes</i>				p-value*
	กลุ่มดื้อยา (N=41)		กลุ่มไม่ดื้อยา (N=29)		
	n	(%)	n	(%)	
2.5% BP	36	(87.8)	29	(100.0)	0.072
5% BP	36	(87.8)	29	(100.0)	0.072
10% BP	38	(92.7)	29	(100.0)	0.261

*Fisher's exact test

* p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพประกอบ 25 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยา และไม่ดื้อยา

1.3) การเปรียบเทียบค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

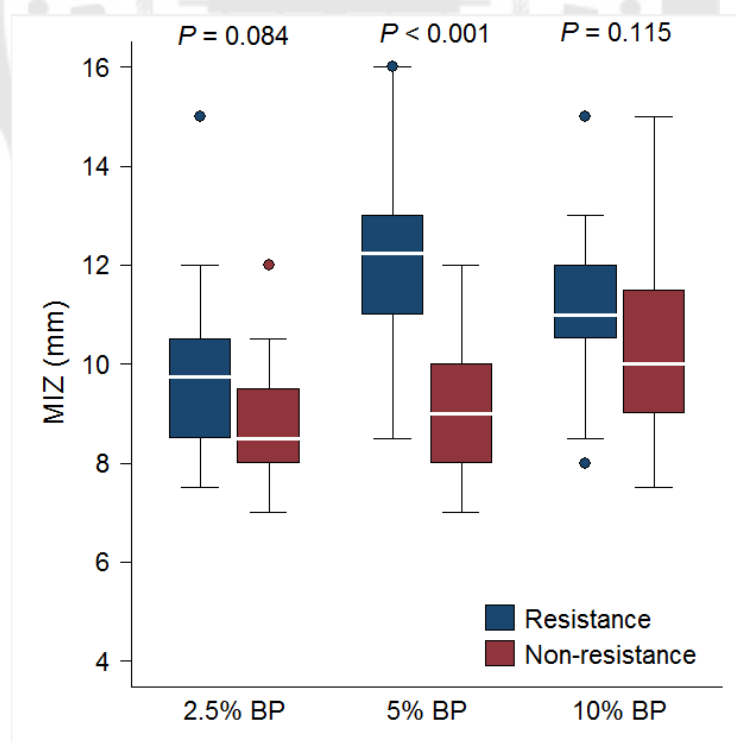
การเปรียบเทียบค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา ดังแสดงในตาราง 13 และภาพประกอบ 26 ผลการศึกษาพบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน ($p\text{-value} = 0.084$) โดยมีค่ามัธยฐานของค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) เท่ากับ 9.5 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 8, 10.5 มิลลิเมตร) และ 8.5 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 8, 9.5 มิลลิเมตร) ในกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา ตามลำดับ BP ความเข้มข้นที่ 5% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ที่ดื้อยาได้ดีกว่า *C. acnes* ที่ไม่ดื้อยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.001$) โดยมีค่ามัธยฐานของค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) เท่ากับ 12 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 9, 13 มิลลิเมตร) และ 9 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 8, 10 มิลลิเมตร) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10% BP มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

ไม่แตกต่างกัน (p -value = 0.115) โดยมีค่ามัธยฐานของค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) เท่ากับ 11 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 10.5, 12 มิลลิเมตร) และ 9 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 10, 11.5 มิลลิเมตร) ตามลำดับ

ตาราง 13 ผลการเปรียบเทียบค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

ความเข้มข้นของ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์	MIZ (มิลลิเมตร)				p-value*
	กลุ่มดื้อยา (N=41)		กลุ่มไม่ดื้อยา (N=29)		
	Median	(IQR)	Median	(IQR)	
2.5% BP	9.5	(8,10.5)	8.5	(8,9.5)	0.084
5% BP	12	(9,13)	9	(8,10)	<0.001
10% BP	11	(10.5,12)	9	(10,11.5)	0.115

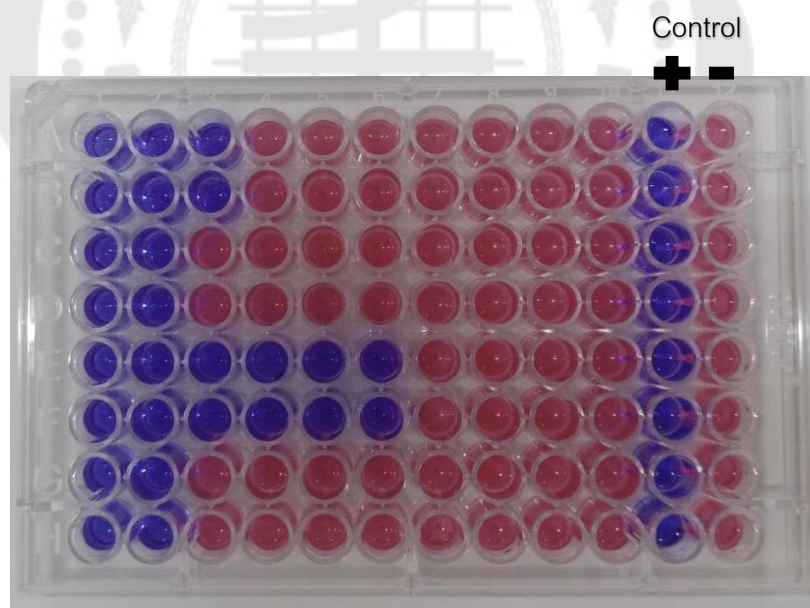
* p -value น้อยกว่า 0.05 ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คำนวณจาก Wilcoxon rank-sum test



ภาพประกอบ 26 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งการเจริญเติบโต (MIZ) ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

ตอนที่ 2 ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ BP ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* (MIC)

การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* โดยวิธี broth microdilution เนื่องจากผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของ BP พบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ดังนั้นจึงได้นำความเข้มข้นที่ 2.5% มาเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการหาค่า MIC ซึ่งความเข้มข้นที่ 2.5% จะอยู่หลุมทางซ้ายสุด (ภาพประกอบ 27) และหลุมถัดมาทางด้านขวา จะมีความเข้มข้นของ BP ลดลงทีละเท่าตัวของหลุมด้านซ้ายจนได้เป็น BP ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.3125%, 0.156%, 0.078% เรียงจากหลุมด้านซ้ายไปขวา ตามลำดับ หลังจากนั้นใส่ เชื้อ *C. acnes* ปริมาณมาตรฐานลงไปแต่ละหลุม และได้ resazurin สารสีม่วงน้ำเงิน เมื่อมีการเจริญเติบโตของเชื้อ resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ดังนั้น หลังจากใส่ resazurin หลุมที่ resazurin เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีชมพู บ่งบอกว่าเชื้อในหลุมนั้นเจริญได้ การอ่านค่า MIC โดยใช้ resazurin จึงอ่านจากหลุมสุดท้ายที่ resazurin มีสีม่วงน้ำเงิน ดังแสดงภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 แสดง 96 well plate ในการทดสอบ MIC ของ BP ต่อ *C. acnes* โดยการเจาะจงความเข้มข้นลงเรื่อย ๆ เพื่อดูว่าความเข้มข้นใดสามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยมีหลุมควบคุมซึ่งอยู่ด้านขวาสุดของ plate 2 หลุม หลุมที่หนึ่งคือหลุมที่ไม่มีเชื้อ *C. acnes* และหลุมที่สองคือ หลุมที่มีเชื้อ *C. acnes* แต่ไม่มี BP ซึ่งจะมีสีม่วงน้ำเงินและชมพูตามลำดับ

ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของ BP ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ของเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา จำนวนทั้งหมด 70 isolates ด้วยวิธี broth microdilution ดังแสดงในตาราง 14 ผลการศึกษาพบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 78 – 2500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่ามัธยฐาน MIC ของเชื้อทั้งหมดเท่ากับ 937.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250) โดยในเชื้อกลุ่มดื้อยามีค่ามัธยฐาน MIC เท่ากับ 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250) ส่วนเชื้อกลุ่มไม่ดื้อยามีค่ามัธยฐาน MIC เท่ากับ 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250) การเปรียบเทียบค่า MIC ของ *C. acnes* กลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยาพบว่าค่า MIC ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.084$)

ตาราง 14 เปรียบเทียบค่ามัธยฐานและค่าพิสัยควอไทล์ของค่าความเข้มข้นต่ำที่สุด ของ BP ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* (MIC) ของเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา

ตัวแปร	กลุ่มของเชื้อ <i>C. acnes</i>			p-value*
	ทั้งหมด	กลุ่มดื้อยา	กลุ่มไม่ดื้อยา	
	(N=70)	(N=41)	(N=29)	
ค่า MIC ของ BP (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)†	937.5 (625-1250)	625 (625-1250)	1250 (625-1250)	0.084*
(ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)	(78 - 2500)	(78 - 2500)	(156 - 2500)	

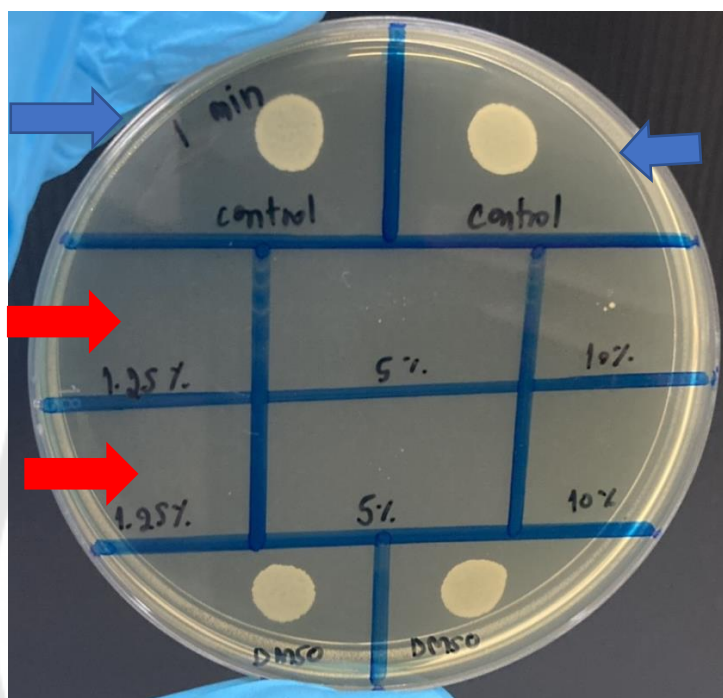
†Data are presented as median (interquartile range)

*p-value ระหว่างเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา โดย ≤ 0.05 จึงถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ คิดจาก Wilcoxon rank-sum test

ตอนที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* (bactericidal) ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ต่อกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา

การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* โดยวิธี drop plate (97) เชื้อ *C. acnes* จำนวน 30 isolates ที่คัดเลือกมาจากกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาและดื้อยาทดสอบกับ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5%, และ 10% ที่ระยะเวลา 30 วินาที, 1 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที, 30 นาที, และ 60 นาที ตามลำดับ โดยแปลผลการทดสอบว่าหาก BP ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้จะพบการ

เจริญเติบโตของเชื้อตามรอยที่หยดเชื้อลงไปเกิดลักษณะขุ่นขาวบนจานเพาะเชื้อ แต่หาก BP ความเข้มข้นที่ฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะใส (ลูกศรสีแดง ภาพประกอบ 28) โดยจะเปรียบเทียบกับช่องเพาะเชื้อควบคุมที่มีเชื้อเจริญอยู่ (ลูกศรสีฟ้า ภาพประกอบ 28)



ภาพประกอบ 28 แสดง plate การเจริญเติบโตของ *C. acnes* ที่ระยะเวลา 1 นาที ผลทดสอบ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 5% และ 10% กับ *C. acnes* ที่ระยะเวลา 1 นาที พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* โดยเปรียบเทียบกับช่องเพาะเชื้อควบคุม (ลูกศรสีฟ้า) แปลผลว่า BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ เมื่อสัมผัสเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 1 นาที

3.1) การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* โดยรวม (Bactericidal) ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ที่ระยะเวลาต่างกัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา ที่คัดเลือกมาจำนวนทั้งหมด 30 isolates ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ซึ่งพิจารณาจากฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ ซึ่งสังเกตจากไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเพาะเชื้อ กล่าวคือมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ $\geq 99.99\%$ ของเชื้อในช่องนั้น

ตาราง 15 จำนวนและร้อยละของ isolate *C. acnes* ที่ถูกฆ่า (bactericidal) ด้วย BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ

ระยะเวลาที่ สัมผัสเชื้อ (นาที)	จำนวน isolate ที่ถูกฆ่าในแต่ละความเข้มข้นของ BP (isolates(%))											
	1.25%			2.5%			5%			10%		
	รวม (n=30)	ดื้อยา (n=17)	ไม่ดื้อยา (n=13)	รวม (n=30)	ดื้อยา (n=17)	ไม่ดื้อยา (n=13)	รวม (n=30)	ดื้อยา (n=17)	ไม่ดื้อยา (n=13)	รวม (n=30)	ดื้อยา (n=17)	ไม่ดื้อยา (n=13)
0.5	20 (66.7%)	9 (53%)	11 (84.6%)	28 (93.4%)	15 (88.2%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)
1	21 (70%)	10 (58.8%)	11 (84.6%)	28 (93.4%)	15 (88.2%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)
5	21 (70%)	10 (58.8%)	11 (84.6%)	29 (96.7%)	16 (94%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)
10	22 (73.3%)	10 (58.8%)	12 (92.3%)	29 (96.7%)	16 (94%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)
15	24 (80%)	12 (70%)	12 (92.3%)	30 (100%)	17 (100%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)
30	26 (86.7%)	14 (82.3%)	12 (92.3%)	30 (100%)	17 (100%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)
60	30 (100%)	17 (100%)	13 (100%)	30 (100%)	17 (100%)	13 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	13 (100%)

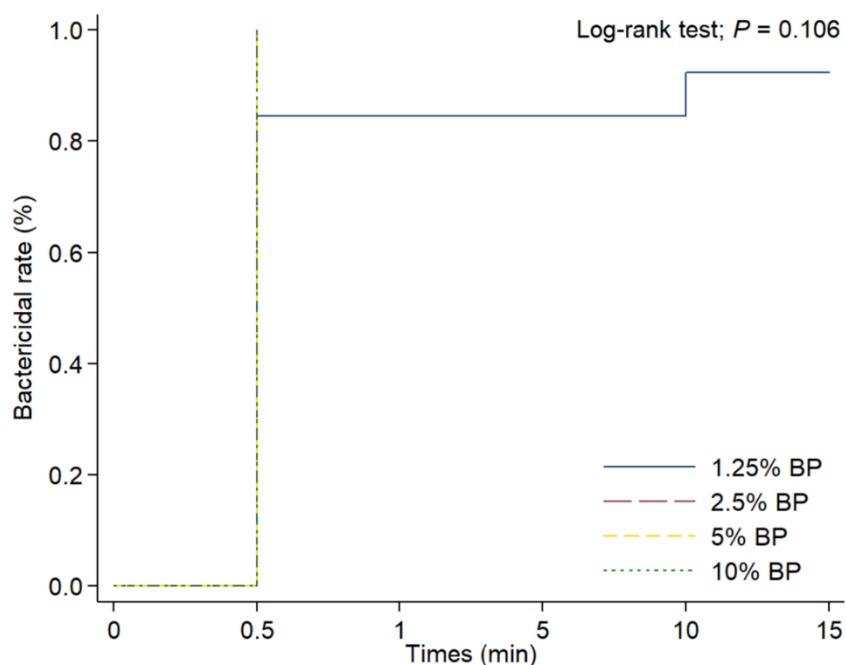
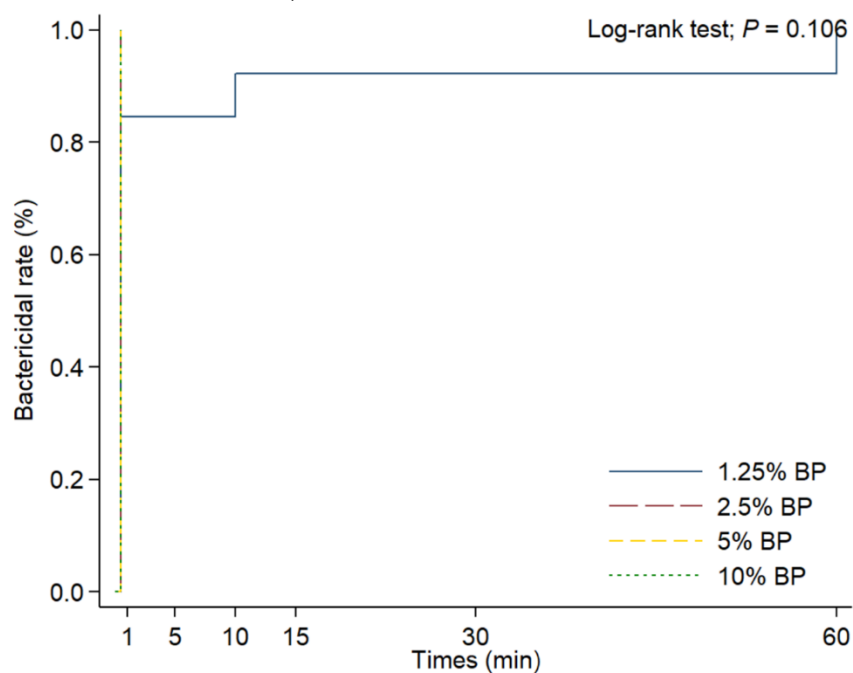
จากตาราง 15 ผลการศึกษาพบว่า BP เข้มข้นที่ 1.25% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทุก isolates เมื่อสัมผัสเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 60 นาที และ BP ความเข้มข้นที่ 2.5% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทุก isolates เมื่อสัมผัสเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 15 นาที ในขณะที่ BP ความเข้มข้นที่ 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทุก isolates เมื่อสัมผัสเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 30 วินาที

3.2) ระยะเวลาที่เกิดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทุก isolate ของ BP (Time killing profile) ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% หลังสัมผัสเชื้อ *C. acnes*

3.2.1) Time killing profile ใน *C. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยา

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยาที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ โดยใช้สถิติ survival analysis แสดงดังภาพประกอบ 29 ซึ่งประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในกลุ่มไม่ดื้อยา

พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Log-rank test: p-value = 0.106) โดยที่ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 30 วินาที มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อร้อยละ 84.62, 100, 100 และ 100 ตามลำดับ

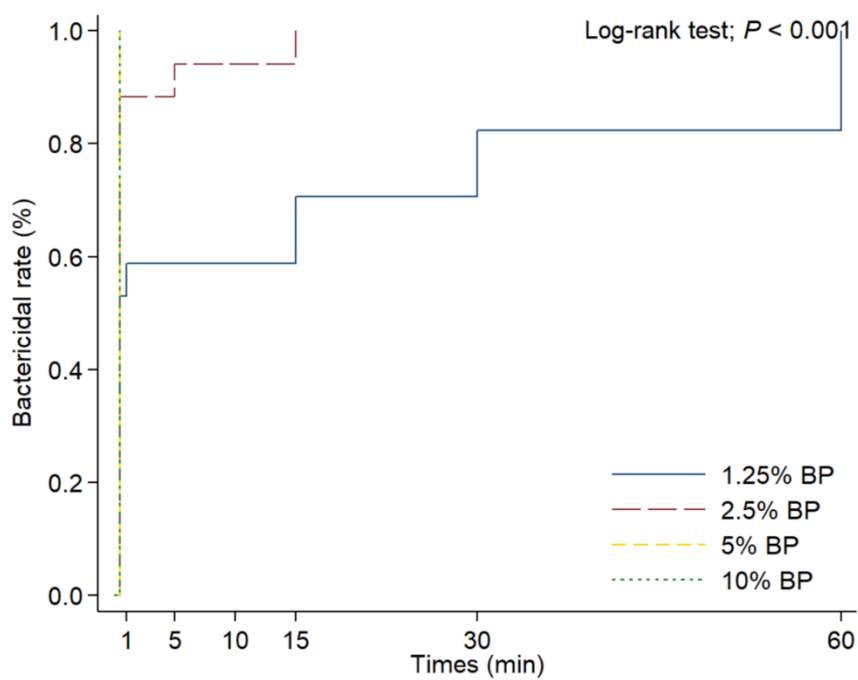
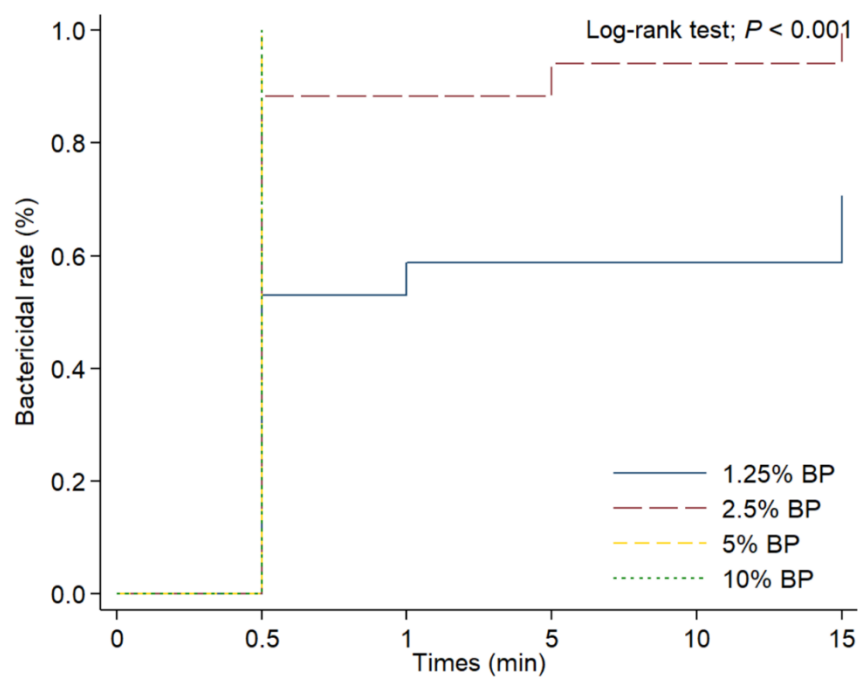


ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ของฤทธิ์การฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที

3.2.2) Time killing profile ใน *C. acnes* กลุ่มดื้อยา

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP เข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในกลุ่มดื้อยา เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 30 ซึ่งประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ในกลุ่มดื้อยา พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Log-rank test: $p\text{-value} < 0.001$) โดยที่ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 30 วินาที มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อร้อยละ 52.94, 88.24, 100 และ 100 ตามลำดับ โดยพบว่าหากต้องการฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อดื้อยาร้อยละ 100 ต้องใช้เวลาถึง 60 นาทีในการใช้ BP ความเข้มข้นที่ 1.25% และ ใช้เวลา 15 นาที สำหรับ BP ความเข้มข้นที่ 2.5%



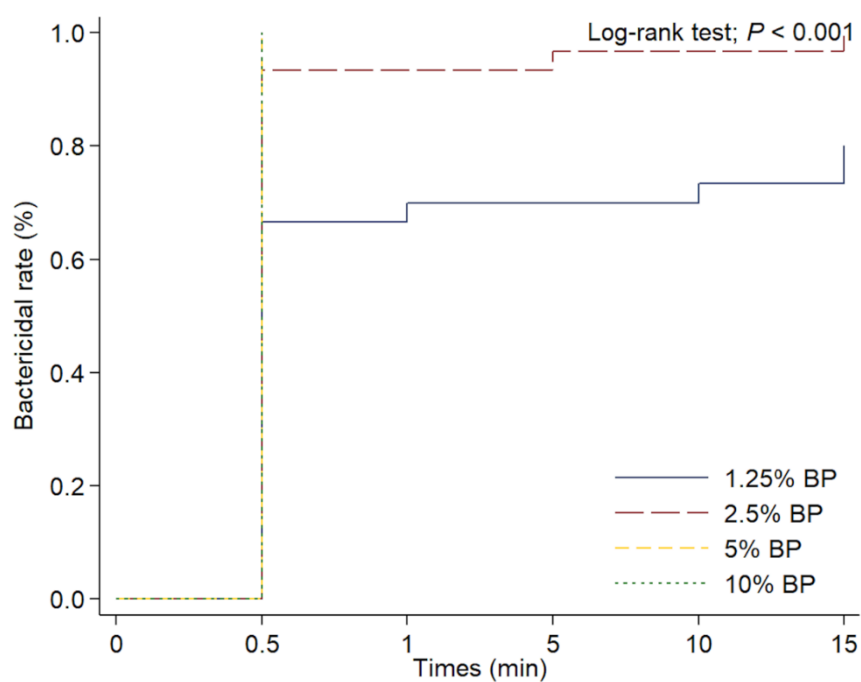
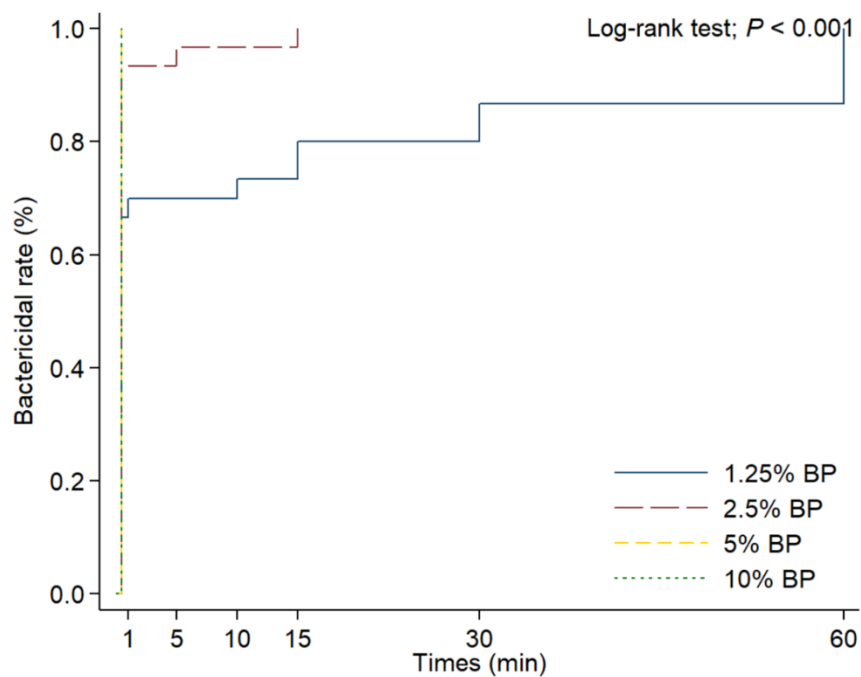


ภาพประกอบ 30 ความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ

3.2.3) Time killing profile ใน *C. acnes* โดยรวมกลุ่มดื้อยา และกลุ่มไม่ดื้อยา

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยารวมกัน ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 31 ซึ่งประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Log-rank test: $p\text{-value} < 0.001$) โดยที่ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* ที่เวลา 30 วินาที มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อร้อยละ 66.67, 93.33, 100 และ 100 ตามลำดับ

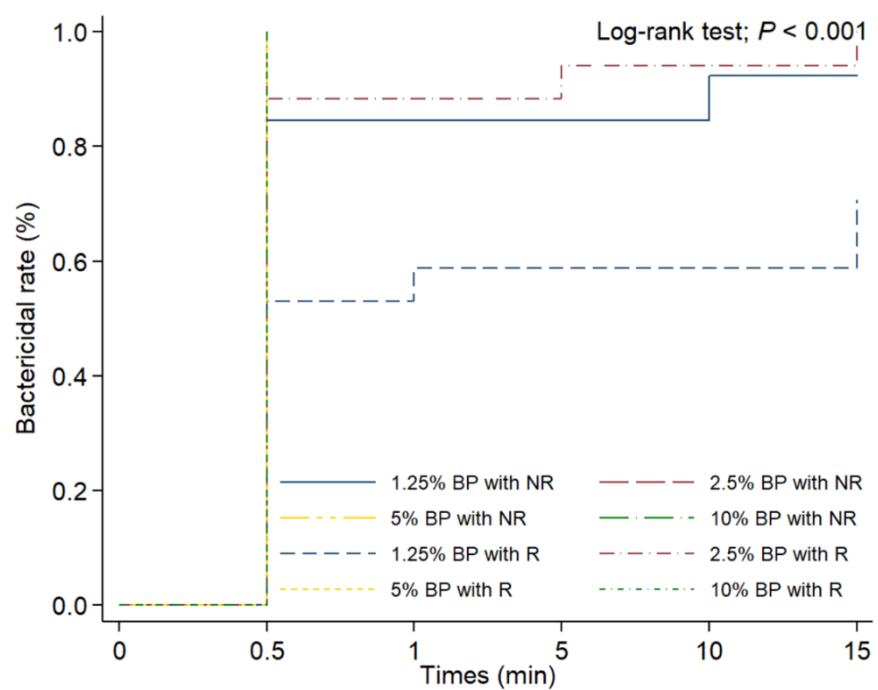
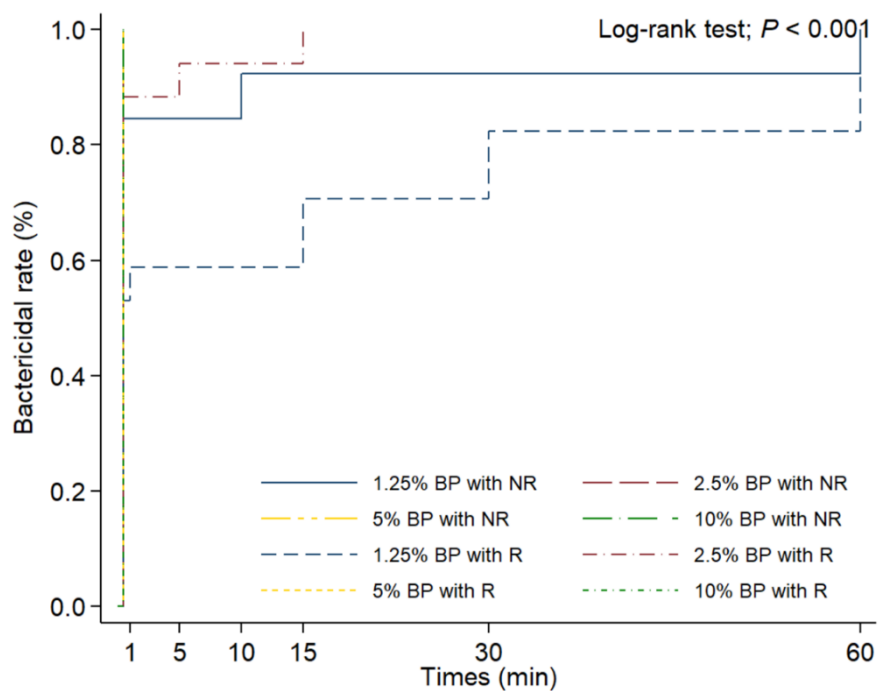




ภาพประกอบ 31 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ

3.2.4) เปรียบเทียบ Time killing profile ของ BP ต่อ *C. acnes* ระหว่าง กลุ่มดื้อยาและ กลุ่มไม่ดื้อยา

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยา กลุ่มไม่ดื้อยา และทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยารวมกัน ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 32 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ทั้งกลุ่มดื้อยา กลุ่มไม่ดื้อยา และทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยารวมกัน พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Log-rank test: p-value < 0.001) โดยที่ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มไม่ดื้อยา ที่เวลา 30 วินาที มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อร้อยละ 84.62, 100, 100 และ 100 ตามลำดับ ส่วน BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยา ที่เวลา 30 วินาที มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อร้อยละ 52.94, 88.24, 100 และ 100 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 32 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% เมื่อสัมผัสกับเชื้อ *C. acnes* ชนิดดื้อยา ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที 5 นาที 10 นาที 15 นาที 30 นาที 60 นาที ตามลำดับ

3.3) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10%

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ต่อเชื้อ *C. acnes* โดยรวม โดยใช้สถิติ Cox proportional hazard regression analysis พบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มากกว่าความเข้มข้นที่ 1.25% 1.51 เท่า (HR = 1.51, 95%CI: 0.87 - 2.64, p-value = 0.145) และความเข้มข้นที่ 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มากกว่าความเข้มข้นที่ 1.25% 1.57 เท่า (HR = 1.57, 95%CI: 0.89 - 2.77, p-value = 0.118) (ตาราง 16)

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์ Cox proportional hazard regression analysis ของประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10%

ความเข้มข้นของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์	HR	95%CI	p-value
All samples			
1.25% BP	1.00	Reference	
2.5% BP	1.51	(0.87 - 2.64)	0.145
5% BP	1.57	(0.89 - 2.77)	0.118
10% BP	1.57	(0.89 - 2.77)	0.118
Non-resistance group			
1.25% BP	1.00	Reference	
2.5% BP	1.18	(0.53 - 2.64)	0.683
5% BP	1.18	(0.53 - 2.64)	0.683
10% BP	1.18	(0.53 - 2.64)	0.683
Resistance group			
1.25% BP	1.00	Reference	
2.5% BP	1.89	(0.87 - 4.10)	0.108
5% BP	2.05	(0.92 - 4.56)	0.080
10% BP	2.05	(0.92 - 4.56)	0.080

ตาราง 16 (ต่อ)

ความเข้มข้นของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์	HR	95%CI	p-value
Non-resistance group and Resistance group			
Non-resistance & 1.25% BP	1.00	Reference	
Non-resistance & 2.5% BP	1.28	(0.58 - 2.82)	0.534
Non-resistance & 5% BP	1.28	(0.58 - 2.82)	0.534
Non-resistance & 10% BP	1.28	(0.58 - 2.82)	0.534
Resistance & 1.25% BP	0.68	(0.32 - 1.44)	0.314
Resistance & 2.5% BP	1.20	(0.57 - 2.49)	0.634
Resistance & 5% BP	1.28	(0.61 - 2.69)	0.509
Resistance & 10% BP	1.28	(0.61 - 2.69)	0.509

Note: HR, Hazard Ratio; CI, confident interval.

เมื่อแยกดูในกลุ่ม *C. acnes* ดื้อยา และไม่ดื้อยา พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ BP ต่อเชื้อไม่ดื้อยา พบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มากกว่าความเข้มข้นที่ 1.25% 1.18 เท่า (HR = 1.18, 95%CI: 0.53 - 2.64, p-value = 0.683) ในขณะที่กลุ่มเชื้อดื้อยา พบว่า BP ความเข้มข้นที่ 2.5% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มากกว่าความเข้มข้นที่ 1.25% 1.89 เท่า (HR = 1.89, 95%CI: 0.87 - 4.10, p-value = 0.108) และความเข้มข้นที่ 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* มากกว่าความเข้มข้นที่ 1.25% 2.05 เท่า (HR = 2.05, 95%CI: 0.92 - 4.56, p-value = 0.080)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อระหว่างกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา BP ในทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มฆ่าเชื้อ *C. acnes* ชนิดไม่ดื้อยาได้ดีกว่าชนิดดื้อยา แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มเชื้อ *C. acnes*

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อ *C. acnes* จากคนไข้กลุ่มประชากรคนไทยที่เป็นสิ่วซึ่งบ่งบอกถึงเชื้อก่อโรคในคนไข้ ดังนั้นเชื้อกลุ่มที่ได้จากคนไข้จะเป็นตัวแทนที่ดีเชื้อของกลุ่มประชากรคนไข้จริงในเวชปฏิบัติ ผลการทดลองที่ได้นำไปสู่การอ้างอิงผลลัพธ์ที่สามารถใช้ในเวชปฏิบัติได้

ตอนที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* โดย minimal inhibition zone (MIZ)

ผลการทดสอบด้วยการทำ MIZ พบว่า ประสิทธิภาพการของ BP ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *C. acnes* กลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน แม้ว่าแนวโน้มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อกลุ่มไม่ดื้อยาจะมากกว่ากลุ่มดื้อยา โดย BP ความเข้มข้น 2.5%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มดื้อยาร้อยละ 87.8, 87.8 และ 92.7 ในขณะที่ BP สามความเข้มข้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มไม่ดื้อยาร้อยละ 100 ของ isolate ทั้งหมด เมื่อดูที่ค่า MIZ ของ BP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลดังนี้ 1) ความเข้มข้นที่ 2.5% ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา มีค่า 9.5 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 8, 10.5 มิลลิเมตร) และ 8.5 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 8, 9.5 มิลลิเมตร) 2) ความเข้มข้นที่ 5% ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 12 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 9, 13 มิลลิเมตร) และ 9 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 8, 10 มิลลิเมตร) ซึ่งใกล้เคียงกับ 3) ความเข้มข้นที่ 10% มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 11 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 10.5, 12 มิลลิเมตร) และ 9 มิลลิเมตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 10, 11.5 มิลลิเมตร)

ตอนที่ 2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของ BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโต หรือ minimal inhibition concentration (MIC) ต่อเชื้อ *C. acnes*

การทดสอบนี้ใช้วิธี broth microdilution วิธีนี้ BP จะสัมผัสกันโดยตรงกับสารทดสอบ ต่างจาก agar well diffusion ดังนั้นการละลายและการแพร่ของสารจึงไม่มีผลต่อการหาค่า MIC

จากการทดสอบได้ค่า MIC ของ BP อยู่ในช่วง 78 – 2500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เชื้อโดยรวมมีค่ามัธยฐาน MIC เท่ากับ 937.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250) โดยเชื้อกลุ่มดื้อยามีค่ามัธยฐาน MIC เท่ากับ 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250) และค่ามัธยฐาน MIC ต่อกลุ่มเชื้อไม่ดื้อยาเท่ากับ 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าพิสัยควอไทล์ 625 - 1250)

ตอนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* ของ BP ความเข้มข้นที่ 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ต่อหน่วยเวลา

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี drop plate พบว่าฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *C. acnes* โดยรวมที่ ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ต้องใช้เวลาสัมผัสเชื้อ อย่างน้อย 60 นาที 15 นาที 30 วินาที และ 30 วินาที ตามลำดับ และเมื่อดูที่ระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ 30 วินาที BP ความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ร้อยละ 66.67, 93.33, 100 และ 100 ตามลำดับ ผลการสอบในงานวิจัยนี้บ่งบอกว่าประสิทธิภาพ การฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้นที่ 5% และ 10% ไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยในงานวิจัยนี้พบว่า BP มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *C. acnes* ได้ดีทั้งในกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา หากสามารถทายาทั่วไวด้านบน อย่างไรก็ดีตามระยะเวลาสัมผัสเชื้อ *C. acnes* ของยา BP ก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของยาอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในความเข้มข้นที่ต่ำ

เมื่อดูจากผลการทดลองค่า MIZ จะพบว่าค่า MIZ ของ 5% และ 10% BP มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งน่าจะเป็นจาก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นถึงจุดอิ่มตัวของสาร อาจทำให้การแพร่กระจายของ BP ไม่ดี เนื่องจากวิธี agar well diffusion ใช้หลักการการแพร่กระจายของสาร ความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นจะแพร่กระจายผ่านตัวกลางที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้กว้างขึ้นและ สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้มากขึ้น แต่การแพร่กระจายของสารละลาย BP มีปัจจัยรบกวนเนื่องจาก 1) BP ละลายน้ำได้น้อย ทำให้มีผลต่อการกระจายตัวของสารได้ไม่ดีเมื่อความเข้มข้นของ BP ที่มากขึ้น และ 2) การออกฤทธิ์ของ BP คือปล่อยอนุโมลอิสระซึ่งเป็นอนุโมลที่ไม่เสถียร ปัจจัยเหล่านี้ จึงมีผลต่อขนาดของโซนการยับยั้ง ซึ่งอาจจะไม่แปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การแปลผลของ BP ด้วยค่า MIZ มีข้อจำกัด ต่างจากยาปฏิชีวนะที่มีค่ามาตรฐานในการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เนื่องจาก BP เป็นสารฆ่าเชื้อ (antiseptic) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีค่ามาตรฐาน MIZ ที่บ่งบอกความสามารถในการยับยั้งที่สัมพันธ์กับปริมาณ ของ BP และไม่สามารถบ่งบอกได้ว่า เชื้อแบคทีเรียเป็นเชื้อดื้อ BP หรือไม่ แต่ค่า MIZ (98, 99) ของ antibiotics จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นและความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อย่างไรก็ดีในการทดสอบของเราก็สามารถยืนยันได้ว่า BP ในความเข้มข้นที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* จากการพบวงใสของการยับยั้งรอบหลุมทดสอบ ผลการทดสอบ MIZ ของ BP สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *C. acnes* ได้ 67 isolates จากทั้งหมด 70 isolates โดย 3 isolates ที่ BP ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เป็นเชื้อที่ดื้อต่อ erythromycin

และ clindamycin แต่เชื้อทั้ง 3 isolates เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่ายับยั้งการเจริญเติบโตได้ ซึ่งน่าจะเป็นจากวิธี microbroth dilution สารละลายจะสัมผัสกับเชื้อได้โดยตรงทำให้ไม่ผ่านการแพร่กระจายหรือตัวกลาง ซึ่งทำให้แปลผลได้ดีกว่า วิธี agar well diffusion (99) และเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC และ MIZ ซึ่งโดยปกติค่า MIZ จะสอดคล้องกับค่า MIC คือ ค่า MIZ ที่มากขึ้น ค่า MIC ควรน้อยลง แต่จากสาเหตุการละลายและการแพร่กระจายของ BP ไม่ดีในตัวกลางที่กล่าวข้างต้น ดังนั้น วิธี agar well diffusion อาจจะไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุดใน การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อของ BP ที่ความเข้มข้นสูง

ค่า MIC ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* ในงานวิจัยนี้พบว่า อยู่ในช่วง 78 – 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยค่ามัธยฐาน MIC ของกลุ่มเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่ามีความสอดคล้องกัน การศึกษาของ MR Farmery และคณะ ในปี ค.ศ. 1994 ทดสอบเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาได้ค่า MIC เท่ากับ 64- 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100) Okamoto และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 ได้ค่า MIC ของ BP มีค่า 128 - 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยได้ทดสอบกับเชื้อ *C. acnes* ที่เก็บจากคนไข้ผิวหนังผู้ป่วย 44 คน ทั้งกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาซึ่งกลุ่มเชื้อดื้อยานั้นประกอบไปด้วยเชื้อที่ดื้อต่อ nadifloxacin และ clindamycin (40) และล่าสุดมีการศึกษาโดย Blaskovich, M. A. และคณะ (75) ในปี ค.ศ. 2019 พบว่า ค่า MIC ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* อยู่ในช่วง 1,024 - มากกว่า 2,048 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในงานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่เน้นศึกษาดูระยะเวลาการสัมผัสกับเชื้อของยา BP ต่อฤทธิ์การฆ่าเชื้อ โดยพบว่าหากต้องการผลของ BP ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* จะต้องใช้เวลาสัมผัสกับเชื้ออย่างน้อย 60 นาที สำหรับ 1.25% BP และใช้เวลาสัมผัสกับเชื้ออย่างน้อย 15 นาที สำหรับ 2.5% BP แต่หากใช้ BP ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% พบว่าระยะเวลาสัมผัสเพียง 30 วินาที ก็สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นที่มากกว่า 5% อาจจะไม่เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ ในทางปฏิบัติเราจึงสามารถเลือกใช้ 5% BP แทนการใช้ 10% BP ได้ ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ BP และระยะเวลาที่สัมผัสเชื้อต่อฤทธิ์การฆ่าเชื้อสอดคล้องกับ การศึกษาของ Cove และคณะ ในปี ค.ศ. 1983 (72) ทดสอบประสิทธิภาพ BP ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อการลดจำนวน *C. acnes* ในหลอดทดลอง โดยวัดปริมาณ *C. acnes* ทุก 5-15 นาที เป็นระยะเวลา 180 นาที พบว่า หลังจาก BP สัมผัสเชื้อ 59 นาที จะเกิดการลดลงของเชื้ออย่างรวดเร็ว โดยทุก ๆ 12.5 นาที เชื้อจะลดลงปริมาณ 4.42 log₁₀ และ การศึกษาของ Okamoto และคณะ พบว่าในกาที่ปริมาณเชื้อ *C. acnes* ลดลง 5-log BP ที่

ความเข้มข้นเท่ากับ MIC ใช้ระยะเวลาสัมผัสเชื้อ 2 ชั่วโมง แต่ BP ความเข้มข้นที่ 2 เท่าของ MIC จะใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง (40)

สิวเป็นโรคเรื้อรัง ดังนั้นจึงต้องการการรักษาในระยะยาว ซึ่งการรักษาที่ต่อเนื่อง จึงเป็นปัจจัยสำคัญเพื่อให้การรักษาสัมฤทธิ์ผล (101) การรักษาด้วยยาทาพบอุบัติการณ์การหยุดยา 45.6% สาเหตุจากประสิทธิภาพของยา 62.3% และผลข้างเคียงของยา 33.2% โดยเกิดจาก BP และอนุพันธ์วิตามินเอ เป็นหลัก (102, 103) สำหรับประสิทธิภาพของยานั้น ปัจจุบันมีอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อสิวมากขึ้น (71) ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาลดลง BP จึงเป็นยารักษามาตรฐานในการรักษาสิวอักเสบชนิดทา อย่างไรก็ตามในเวชปฏิบัติจากการรักษาคนไข้ พบว่า BP มักเกิดผลข้างเคียงที่ทำให้เกิดการระคายเคืองได้บ่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคนไทย และกลุ่มผู้หญิงวัยกลางคนที่ยังเป็นสิิว รายงาน อาการแดง ขุย ลอกหลังใช้ยาคิดเป็น 14.2 และ 24.1% (29) จึงมีการใช้ BP ในรูปแบบทาแล้วล้างออกเพื่อลดผลข้างเคียงจากการระคายเคืองนี้ โดยระยะเวลาที่ทาที่มีความหลากหลายแล้วแต่ประสบการณ์ของแพทย์ที่รักษา จากการสืบค้นงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาที่บอกถึงระยะเวลาและความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของ BP ที่สามารถฆ่าเชื้อ *C. acnes* ได้ จากงานวิจัยของเราซึ่งพบว่า จะต้องใช้เวลาสัมผัสกับเชื้ออย่างน้อย 60 นาที สำหรับ 1.25% BP และใช้เวลาสัมผัสกับเชื้ออย่างน้อย 15 นาที สำหรับ 2.5% BP เพื่อฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* แต่หากใช้ BP ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% พบว่าระยะเวลาสัมผัสเพียง 30 วินาทีก็สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งเชื้อดื้อยาและไม่ดื้อยา จึงเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะช่วยให้แพทย์นำไปใช้แก่ผู้ป่วย เช่น การทายา 2.5% BP แล้วล้างออกจำเป็นต้องทาอย่างน้อย 15 นาที เพื่อหวังฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ หรือการใช้สารทำความสะอาดที่มี BP น้อยกว่า 5% น่าจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อน้อย อย่างไรก็ตามในการผิวหนังของคนเรานั้น *C. acnes* มักจะอาศัยอยู่ในรูขุมขนซึ่ง อาจจะต้องใช้เวลาในการที่ยาซึมผ่านลงไปฆ่าเชื้อนานกว่าในหลอดทดลอง แต่ผลที่เราได้จะเป็นแนวทางการแสดงถึงระยะเวลาที่น้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อได้แล้วของ *C. acnes* เมื่อสัมผัสกับเชื้อซึ่งในการใช้ในเวชปฏิบัติไม่ควรระยะเวลาสั้นกว่านี้ ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ก็แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำมาใช้ในคนระยะเวลาสัมผัสเชื้ออาจจะต้องมากกว่าในหลอดทดลอง การศึกษาของ Leyden และคณะ ปี 2010 (104) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวน *C. acnes* ของ 5.3% BP ชนิดโฟมทาทั้งไว้ วันละครั้ง กับ สารทำความสะอาด 8% BP ฟอกวันละครั้ง หลังจาก 2 สัปดาห์ พบว่าการทา 5.3% BP สามารถลดปริมาณ *C. acnes* ที่ผิวที่ผิวได้ดี ในขณะที่แบบล้างออกไม่สามารถลดปริมาณ *C. acnes* ที่ผิวหนังได้ ดังนั้นระยะเวลาการสัมผัสเชื้อของ BP ที่แน่นอนจึงยังคงต้องมีการศึกษาในคนเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผล

ฤทธิ์ของ BP ในการยับยั้งการเจริญเติบโตจากค่า MIZ ของ BP ความเข้มข้นที่ 2.5%, 5% และ 10% ต่อเชื้อ *C. acnes* กลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยาไม่แตกต่างกัน ผลของค่า MIC ของ BP ต่อเชื้อ *C. acnes* อยู่ในช่วง 78 - 2500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ต่อหน่วยเวลา พบว่า BP ฆ่าได้ทั้งเชื้อกลุ่มดื้อยาและไม่ดื้อยา โดยแนวโน้มกลุ่มเชื้อดื้อยาจะใช้เวลานานกว่า และความเข้มข้นที่มากกว่าในการฆ่าเชื้อ เมื่อเทียบกับกลุ่มไม่ดื้อยา ฤทธิ์การฆ่าเชื้อของ BP ความเข้มข้น 1.25% ใช้เวลาอย่างน้อย 60 นาที 2.5% ใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาที และ BP ความเข้มข้นที่ 5% และ 10% ใช้เวลาเท่ากันคือ 30 วินาที ในการฆ่าเชื้อ *C. acnes* ในหลอดทดลอง จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการให้คำแนะนำและรักษาคอนไชน์ได้อย่างไรก็ตามยังคงต้องอาศัยการศึกษาในคนเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ในคนต่อไป

ข้อจำกัดของการศึกษา

1. Benzoyl peroxide (BP) เป็นสารที่ละลายยาก ดังนั้นจึงต้องทดสอบหาความเข้มข้นที่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เหมาะสม และไม่รบกวนปฏิกิริยาในการยับยั้งและการฆ่าเชื้อ *C. acnes*
2. BP มีกลไกออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยปล่อยอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียร ดังนั้น ต้องเลือกวิธีการทดสอบที่สารสัมผัสกับเชื้อโดยตรง และต้องใช้สารเพื่อหยุดปฏิกิริยาเพื่อช่วยในการแปลผลที่แม่นยำ
3. การทดสอบการฆ่าเชื้อ *C. acnes* ต่อหน่วยเวลา แต่ละช่วงเวลาที่ทดสอบมีความใกล้เคียงกันมากจึงต้องจัดสรรการดำเนินการในห้องทดลองเพื่อให้ผลการทดสอบถูกต้องแม่นยำ

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการวิจัยต่อเนื่องเพื่อหาผลในคนที่ใช้เพื่อการรักษาต่อไป
2. ทำการวิจัยแบบพหุสถาบัน (multicenter study) เก็บตัวอย่างเชื้อจากหลายสถาบัน เพื่อเพิ่มโอกาสการทำงานวิจัยนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
3. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึง กลไกการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อของ BP ที่สัมพันธ์กับโครงสร้างของเชื้อดื้อยา

บรรณานุกรม

1. นภดล นพคุณ, เพ็ญวดี ทิมพัฒน์พงศ์, วัฒนศิริ สีนุรักษ์, เพ็ญพรรณ วัฒนไกร, รัชณี อัครพันธ์, นลินี สุทธิไพศาล, และคณะ. แนวทางการดูแลรักษาโรค Acne. ใน: วิตยา ศรีดามา, บรรณาธิการ. Clinical practice guideline 2010. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. น. 58-80.
2. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. J Am Acad Dermatol. 2016;74(5):945-73. Epub 2016 Feb 17. doi:10.1016/j.jaad.2015.12.037 PubMed PMID: 26897386.
3. Russell JJ. Topical therapy for acne. Am Fam Physician. 2000 Jan 15;61(2):357-66. PubMed PMID: 10670502.
4. Heng AHS, Chew FT. Systematic review of the epidemiology of acne vulgaris. Sci Rep. 2020;10(1):1-29.
5. Dessinioti C, Katsambas AD. The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: Facts and controversies. Clin Dermatol. 2010 Jan-Feb;28(1):2-7. doi:10.1016/j.clindermatol.2009.03.012 PubMed PMID: 20082942.
6. Gollnick H, Dreno B. Pathophysiology and management of acne. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Jun;29:1-2. doi:10.1111/jdv.13182 PubMed PMID: 26059727.
7. Adler BL, Kornmehl H, Armstrong AW. Antibiotic resistance in acne treatment. JAMA Dermatol. 2017 Aug 1;153(8):810-1. doi:10.1001/jamadermatol.2017.1297 PubMed PMID: 28636689.
8. Descamps V. Clinical guidelines for management of acne vulgaris. JAMA. 2017 Jan 10;317(2):213. doi:10.1001/jama.2016.19262 PubMed PMID: 28097351.
9. Tangheiti E. The evolution of benzoyl peroxide therapy. Cutis. 2008 Nov;82(5 Suppl):5-11. PubMed PMID: 19202772.
10. Foti C, Romita P, Borghi A, Angelini G, Bonamonte D, Corazza M. Contact dermatitis to topical acne drugs: a review of the literature. Dermatol Ther. 2015 Sep-Oct;28(5):323-9. Epub 2015 Aug 24. doi:10.1111/dth.12282 PubMed PMID: 26302055.

11. Walsh TR, Efthimiou J, Dréno B. Systematic review of antibiotic resistance in acne: an increasing topical and oral threat. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):e23-33. Epub 2016 Feb 5. doi:10.1016/S1473-3099(15)00527-7 PubMed PMID: 26852728.
12. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2013 Mar;168(3):474-85. doi:10.1111/bjd.12149 PubMed PMID: 23210645.
13. Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L. *Dermatología*. Elsevier Health Sciences; 2018. 2880 p.
14. Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel JP, Leccia MT, Del Giudice P, et al. *Propionibacterium acnes*: An update on its role in the pathogenesis of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Mar;28(3):271-8. Epub 2013 Aug 1. doi:10.1111/jdv.12224 PubMed PMID: 23905540.
15. Kang S, Amagai M, Bruckner AL, Enk AH, Margolis DJ, McMichael AJ, et al. *Fitzpatrick's Dermatology*. 9th ed.: McGraw-Hill; 2019. 1866 p.
16. Dréno B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Sep;31(Suppl 5):8-12. doi:10.1111/jdv.14374 PubMed PMID: 28805938.
17. Kim J, Ochoa M-T, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, et al. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1535-41. doi:10.4049/jimmunol.169.3.1535 PubMed PMID: 12133981; PubMed Central PMCID: PMC4636337.
18. Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: A brief look at the latest updates. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Jun;32(Suppl 2):5-14. doi:10.1111/jdv.15043 PubMed PMID: 29894579.
19. Thiboutot D, Gollnick H, Bettoli V, Dréno B, Kang S, Leyden JJ, et al. New insights into the management of acne: an update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne group. *J Am Acad Dermatol*. 2009 May;60(5):S1-50. doi:10.1016/j.jaad.2009.01.019 PubMed PMID: 19376456.
20. Bhate K, Williams HC. What's new in acne? An analysis of systematic reviews

published in 2011-2012. Clin Exp Dermatol. 2014 Apr;39(3):273-7. doi:10.1111/ced.12270 PubMed PMID: 24635060.

21. Brammann C, Müller-Goymann CC. An update on formulation strategies of benzoyl peroxide in efficient acne therapy with special focus on minimizing undesired effects. Int J Pharm. 2020 Mar;578:119074. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119074 PubMed PMID: 31982561.

22. Kumar B, Pathak R, Mary PB, Jha D, Sardana K, Gautam HK. New insights into acne pathogenesis: exploring the role of acne-associated microbial populations. Dermatol Sin. 2016;34(2):67-73.

23. Zuliani T, Khammari A, Chaussy H, Knol AC, Dréno B. Ex vivo demonstration of a synergistic effect of Adapalene and benzoyl peroxide on inflammatory acne lesions. Experimental dermatology. 2011 Jul 2;20(10):850-3. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01339.x.

24. Dispenza MC, Wolpert EB, Gilliland KL, Dai JP, Cong Z, Nelson AM, et al. Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients. J Invest Dermatol. 2012 Sep;132(9):2198-205. Epub 2012 Apr 19. doi:10.1038/jid.2012.111 PubMed PMID: 22513780; PubMed Central PMCID: PMC3614089.

25. Choi EH, Ahn SK, Lee SH. The changes of stratum corneum interstices and calcium distribution of follicular epithelium of experimentally induced comedones (EIC) by oleic acid. Exp Dermatol. 1997 Feb;6(1):29-35. doi:10.1111/j.1600-0625.1997.tb00142.x PubMed PMID: 9067704.

26. Sparavigna A, Tenconi B, De Ponti I, La Penna L. An innovative approach to the topical treatment of acne. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2015 Apr 9;8:179-85. doi:10.2147/CCID.S82859 PubMed PMID: 25914552; PubMed Central PMCID: PMC4399783.

27. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. Lancet. 2012 Jan 28;379(9813):361-72. Epub 2011 Aug 29. doi:10.1016/S0140-6736(11)60321-8 PubMed PMID: 21880356.

28. O'brien SC, Lewis JB, Cunliffe WJ. The Leeds revised acne grading system. *J Dermatolog Treat.* 1998;9(4):215-20.
29. Sagransky M, Yentzer BA, Feldman SR. Benzoyl peroxide: a review of its current use in the treatment of acne vulgaris. *Expert Opin Pharmacother.* 2009 Oct;10(15):2555-62. doi:10.1517/14656560903277228 PubMed PMID: 19761357.
30. Tanghetti EA, Popp KF. A current review of topical benzoyl peroxide: new perspectives on formulation and utilization. *Dermatol Clin.* 2009 Jan;27(1):17-24. doi:10.1016/j.det.2008.07.001 PubMed PMID: 18984364.
31. Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, Dreno B, Finlay A, Leyden JJ, et al. Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(1):S1-S37. doi:10.1067/mjd.2003.618 PubMed PMID: 12833004.
32. Matin T, Goodman MB. *Benzoyl Peroxide.* FL: StatPearls Publishing; 2020.
33. Dutil M. Benzoyl peroxide: Enhancing antibiotic efficacy in acne management. *Skin Therapy Lett.* 2010 Nov-Dec;15(10):5-7. PubMed PMID: 21076800.
34. Habeshian KA, Cohen BA. Current Issues in the Treatment of Acne Vulgaris. *Pediatrics.* 2020 May;145(Suppl 2):S225-S230. doi:10.1542/peds.2019-2056L PubMed PMID: 32358215.
35. Tucker R, Walton S. The role of benzoyl peroxide in the management of acne vulgaris. *Pharm J.* 2007;279:48-53.
36. Lamel SA, Sivamani RK, Rahvar M, Maibach HI. Evaluating clinical trial design: systematic review of randomized vehicle-controlled trials for determining efficacy of benzoyl peroxide topical therapy for acne. *Arch Dermatol Res.* 2015 Nov;307(9):757-66. Epub 2015 Jun 6. doi:10.1007/s00403-015-1568-9 PubMed PMID: 26048131.
37. Kawashima M, Hashimoto H, Alio Sáenz AB, Ono M, Yamada M. Is benzoyl peroxide 3% topical gel effective and safe in the treatment of acne vulgaris in Japanese patients? A multicenter, randomized, double-blind, vehicle-controlled, parallel-group study. *J Dermatol.* 2014 Sep;41(9):795-801. Epub 2014 Aug 11. doi:10.1111/1346-8138.12580 PubMed PMID: 25132461.
38. Hughes BR, Norris JF, Cunliffe WJ. A double-blind evaluation of topical isotretinoin

0.05%, benzoyl peroxide gel 5% and placebo in patients with acne. *Clin Exp Dermatol*. 1992;17(3):165-8.

39. Ellis CN, Leyden J, Katz HI, Goldfarb MT, Hickman J, Jones TM, et al. Therapeutic studies with a new combination benzoyl peroxide/clindamycin topical gel in acne vulgaris. *Cutis*. 2001 Feb;67(2 Suppl):13-20. PubMed PMID: 11236210.

40. Okamoto K, Ikeda F, Kanayama S, Nakajima A, Matsumoto T, Ishii R, et al. In vitro antimicrobial activity of benzoyl peroxide against *Propionibacterium acnes* assessed by a novel susceptibility testing method. *J Infect Chemother*. 2016 Jun;22(6):426-9. Epub 2016 Jan 21. doi:10.1016/j.jiac.2015.12.010 PubMed PMID: 26806150.

41. Mills OH, Kligman AM, Pochi P, Comite H. Comparing 2.5%, 5%, and 10% benzoyl peroxide on inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol*. 1986 Dec;25(10):664-7. doi:10.1111/j.1365-4362.1986.tb04534.x PubMed PMID: 2948929.

42. Veraldi S, Brena M, Barbareschi M. Allergic contact dermatitis caused by topical antiacne drugs. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2015;8(4):377-81. Epub 2015 May 17. doi:10.1586/17512433.2015.1046839 PubMed PMID: 25982754.

43. Tripathi SV, Gustafson CJ, Huang KE, Feldman SR. Side effects of common acne treatments. *Expert Opin Drug Saf*. 2013 Jan;12(1):39-51. Epub 2012 Nov 20. doi:10.1517/14740338.2013.740456 PubMed PMID: 23163336.

44. Leyden JJ, Del Rosso JQ. The effect of benzoyl peroxide 9.8% emollient foam on reduction of *Propionibacterium acnes* on the back using a short contact therapy approach. *J Drugs Dermatol*. 2012 Jul;11(7):830-3. PubMed PMID: 22777224.

45. Stringer T, Nagler A, Orlow SJ, Oza VS. Clinical evidence for washing and cleansers in acne vulgaris: a systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2018 Nov;29(7):688-93. Epub 2018 Feb 25. doi:10.1080/09546634.2018.1442552 PubMed PMID: 29460655.

46. Shalita AR, Rafal ES, Anderson DN, Yavel R, Landow S, Lee W. Compared efficacy and safety of tretinoin 0.1% microsphere gel alone and in combination with benzoyl peroxide 6% cleanser for the treatment of acne vulgaris. *Cutis*. 2003;72(2):167-72.

47. Bhat YJ, Latief I, Hassan I. Update on etiopathogenesis and treatment of Acne. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2017 May-Jun;83(3):298-306. doi:10.4103/0378-

6323.199581 PubMed PMID: 28195079.

48. Conforti C, Chello C, Giuffrida R, di Meo N, Zalaudek I, Dianzani C. An overview of treatment options for mild-to-moderate acne based on American Academy of Dermatology, European Academy of Dermatology and Venereology, and Italian Society of Dermatology and Venereology guidelines. *Dermatol Ther*. 2020 May 8:e13548. doi:10.1111/dth.13548 PubMed PMID: 32385933.

49. Jacobs A, Starke G, Rosumeck S, Nast A. Systematic review on the rapidity of the onset of action of topical treatments in the therapy of mild-to-moderate acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2014 Mar;170(3):557-64. doi:10.1111/bjd.12706 PubMed PMID: 24641090.

50. Kolli SS, Pecone D, Pona A, Cline A, Feldman SR. Topical retinoids in acne vulgaris: a systematic review. *Am J Clin Dermatol*. 2019 Jun;20(3):345-365. doi:10.1007/s40257-019-00423-z PubMed PMID: 30674002.

51. Yang Z, Zhang Y, Mosler EL, Li H, Hu J, Zhang Y, et al. Topical benzoyl peroxide for acne. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Mar 16;3(3):CD011154. doi:10.1002/14651858.CD011154.pub2 PubMed PMID: 32175593; PubMed Central PMCID: PMC7077870.

52. Lee KC, Wambier CG, Soon SL, Sterling JB, Landau M, Rullan P, et al. Basic chemical peeling: Superficial and medium-depth peels. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Aug;81(2):313-24. Epub 2018 Dec 11. doi:10.1016/j.jaad.2018.10.079 PubMed PMID: 30550830.

53. Goulden V. Guidelines for the management of acne vulgaris in adolescents. *Pediatric Drugs*. 2003;5(5):301-13. doi:10.2165/00128072-200305050-00003 PubMed PMID: 12716217.

54. Weist K, Högberg LD, Diaz Högberg L. ECDC publishes 2015 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Euro Surveill*. 2016 Nov 17;21(46):30401. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30399 PubMed PMID: 27918266; PubMed Central PMCID: PMC5144945.

55. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales

data. *Lancet Infect Dis*. 2014 Aug;14(8):742-50. Epub 2014 Jul 9. doi:10.1016/S1473-3099(14)70780-7 PubMed PMID: 25022435.

56. Luk N-M, Hui M, Lee H-C, Fu LH, Liu ZH, Lam LY, et al. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Jan;27(1):31-6. Epub 2011 Nov 21. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04351.x PubMed PMID: 22103749.

57. Sacchidanand SA, Lahiri K, Godse K, Patwardhan NG, Ganjoo A, Kharkar R, et al. Synchronizing pharmacotherapy in acne with review of clinical care. *Indian J Dermatol*. 2017;62(4):341-57.

58. Harper JC. Should dermatologists prescribe hormonal contraceptives for acne? *Dermatol Ther*. 2009 Sep-Oct;22(5):452-7. doi:10.1111/j.1529-8019.2009.01261.x PubMed PMID: 19845722.

59. Arowojolu AO, Gallo MF, Lopez LM, Grimes DA. Combined oral contraceptive pills for treatment of acne. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jul 11;(7):CD004425. doi:10.1002/14651858.CD004425.pub6 PubMed PMID: 22786490.

60. Simonart T. Newer approaches to the treatment of acne vulgaris. *Am J Clin Dermatol*. 2012 Dec 1;13(6):357-64. doi:10.2165/11632500-000000000-00000 PubMed PMID: 22920095.

61. Petersen RC. Free-radicals and advanced chemistries involved in cell membrane organization influence oxygen diffusion and pathology treatment. *AIMS Biophys*. 2017;4(2):240-283. Epub 2017 Apr 6. doi:10.3934/biophy.2017.2.240 PubMed PMID: 29202036; PubMed Central PMCID: PMC5707132.

62. Krishna MC, Grahame DA, Samuni A, Mitchell JB, Russo A. Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Jun 15;89(12):5537-41. doi:10.1073/pnas.89.12.5537 PubMed PMID: 1319064; PubMed Central PMCID: PMC49327.

63. Nacht S, Yeung D, Beasley JN, Anjo MD, Maibach HI. Benzoyl peroxide: percutaneous penetration and metabolic disposition. *J Am Acad Dermatol*. 1981 Jan;4(1):31-7. doi:10.1016/s0190-9622(81)70004-5 PubMed PMID: 7204686.

64. Nacht S, Gans EH, McGinley KJ, Kligman AM. Comparative activity of benzoyl peroxide and hexachlorophene: in vivo studies against *Propionibacterium acnes* in humans. *Arch Dermatol*. 1983 Jul;119(7):577-9. PubMed PMID: 6222704.
65. Liu S-H, Hou H-Y, Shu C-M. Thermal hazard evaluation of the autocatalytic reaction of benzoyl peroxide using DSC and TAM III. *Thermochimica Acta*. 2015;605:68-76. doi:10.1016/j.tca.2015.02.008.
66. Sullia SB, Shantharam S. General microbiology. 2nd ed.: Oxford and IBH Publishing; 2019. 540 p.
67. Del Rosso JQ. A 6% benzoyl peroxide foaming cloth cleanser used in the treatment of acne vulgaris: aesthetic characteristics, patient preference considerations, and impact on compliance with treatment. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2009 Jul;2(7):26-9. PubMed PMID: 20729967; PubMed Central PMCID: PMC2924139.
68. Zeichner JA, Wong V, Linkner RV, Haddican M. Efficacy and safety of tretinoin 0.025%/clindamycin phosphate 1.2% gel in combination with benzoyl peroxide 6% cleansing cloths for the treatment of facial acne vulgaris. *J Drugs Dermatol*. 2013 Mar;12(3):277-82. PubMed PMID: 23545909.
69. Sklar J, Jacobson C, Rizer R, Gans E. Evaluation of Triaz 10% Gel and Benzamycin in acne vulgaris. *J Dermatolog Treat*. 1996;7(3):147-52. doi:10.3109/09546639609086876.
70. Alexis AF, Cook-Bolden F, Lin T. Treatment of moderate-to-severe acne vulgaris in a hispanic population: A post-hoc analysis of the efficacy and tolerability of clindamycin 1.2%/benzoyl peroxide 3.75% gel. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2017 Jun;10(6):36-43. Epub 2017 Jun 1. PubMed PMID: 28979655; PubMed Central PMCID: PMC5605206.
71. Leyden JJ, Wortzman M, Baldwin EK. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* suppressed by a benzoyl peroxide cleanser 6%. *Cutis*. 2008 Dec;82(6):417-21. PubMed PMID: 19181031.
72. Cove JH, Holland KT. The effect of benzoyl peroxide on cutaneous micro-organisms in vitro. *J Appl Bacteriol*. 1983 Jun;54(3):379-82. doi:10.1111/j.1365-2672.1983.tb02631.x PubMed PMID: 6874624.
73. Bojar RA, Cunliffe WJ, Holland KT. The short-term treatment of acne vulgaris with

- benzoyl peroxide: Effects on the surface and follicular cutaneous microflora. *Br J Dermatol*. 1995 Feb;132(2):204-8. doi:10.1111/j.1365-2133.1995.tb05014.x PubMed PMID: 7888356.
74. Gans EH, Kligman AM. Comparative efficacy of clindamycin and benzoyl peroxide for in vivo suppression of *Propionibacterium acnes*. *J Dermatolog Treat*. 2002 Sep;13(3):107-10. doi:10.1080/09546630260199451 PubMed PMID: 12227872.
75. Blaskovich MA, Elliott AG, Kavanagh AM, Ramu S, Cooper MA. In vitro antimicrobial activity of acne drugs against skin-associated bacteria. *Sci Rep*. 2019 Oct 10;9(1):14658. doi:10.1038/s41598-019-50746-4 PubMed PMID: 31601845; PubMed Central PMCID: PMC6787063.
76. Eady EA, Farmery MR, Ross JI, Cove JH, Cunliffe WJ. Effects of benzoyl peroxide and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients. *Br J Dermatol*. 1994 Sep;131(3):331-6. doi:10.1111/j.1365-2133.1994.tb08519.x PubMed PMID: 7918006.
77. Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, et al. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2009 Oct;129(10):2480-8. Epub 2009 Apr 23. doi:10.1038/jid.2009.93 PubMed PMID: 19387482; PubMed Central PMCID: PMC2772209.
78. Hsu JE, Whitson AJ, Woodhead BM, Napierala MA, Gong D, Matsen FA. Randomized controlled trial of chlorhexidine wash versus benzoyl peroxide soap for home surgical preparation: neither is effective in removing *Cutibacterium* from the skin of shoulder arthroplasty patients. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2020;44:1325-9. doi:10.1007/s00264-020-04594-x.
79. Martins RS, Péreira ES, Lima Jr SM, Senna MI, Mesquita RA, Santos VR. Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci*. 2002 Mar;44(1):41-8. doi:10.2334/josnurd.44.41 PubMed PMID: 12058869.
80. Pongsamart S, Nanatawanit N, Lertchaipon J, Lipipun V, editors. Novel water soluble antibacterial dressing of durian polysaccharide gel. III WOCMAP Congress on

Medicinal and Aromatic Plants-Volume 4: Targeted Screening of Medicinal and Aromatic Plants, Economics and Law 678; 2003. 65-73 p.

81. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Aug;52(2):145-8. Epub 2003 Jul 1.

doi:10.1093/jac/dkg312 PubMed PMID: 12837738.

82. Burdass D, Grainger J, Hurst J. Basic practical microbiology: Society for general microbiology. United Kingdom: Reading; 2006.

83. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749-55.

84. Fankhauser D. Pour Plate Technique for Bacterial Enumeration 1989 [updated Jul 5; cited 2020 Nov 2]. Available from:

<https://fankhauserblog.wordpress.com/1989/07/05/pour-plate-technique-for-bacterial-enumeration//>.

85. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016 Jun;38(6):1015-9. Epub 2016 Mar 11. doi:10.1007/s10529-016-2079-2 PubMed PMID: 26969604; PubMed Central PMCID: PMC4853446.

86. Gan X-Y, Yang S, Wang S-Y, Guo X-Y, Chen L-P, Chen W-H. Thermal behavior of benzoyl peroxide mixed with NaOH solution. *Thermochimica Acta.* 2018;670:13-7.

87. Lalitha M. Manual on antimicrobial susceptibility testing. Performance standards for antimicrobial testing: Twelfth Informational Supplement. 2004;56238:454-6.

88. Wikler MA. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS). 2006;26:M7-A7.

89. Holland TL, Woods CW, Joyce M. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infect Dis Clin North Am.* 2009 Dec;23(4):757-90. doi:10.1016/j.idc.2009.06.001 PubMed PMID: 19909884.

90. Joyce M, Woods CW. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infect Dis Clin North Am*. 2004 Sep;18(3):401-34. doi:10.1016/j.idc.2004.04.001 PubMed PMID: 15308270.
91. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition: American Society of Microbiology; 2015. p. 1253-73.
92. Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Arunyanart C, Aromdee C, Khunkitti W. Effect of citronella oil on time kill profile, leakage and morphological changes of *Propionibacterium acnes*. *J Essent Oil Res*. 2010;22(3):270-4.
93. Kamei Y, Sueyoshi M, Hayashi K-i, Terada R, Nozaki H. The novel anti-*Propionibacterium acnes* compound, Sargafuran, found in the marine brown alga *Sargassum macrocarpum*. *J Antibiot (Tokyo)*. 2009 May;62(5):259-63. Epub 2009 Mar 27. doi:10.1038/ja.2009.25 PubMed PMID: 19329987.
94. Eady EA, Bojar RA, Jones CE, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ. The effects of acne treatment with a combination of benzoyl peroxide and erythromycin on skin carriage of erythromycin-resistant *propionibacteria*. *Br J Dermatol*. 1996 Jan;134(1):107-13. PubMed PMID: 8745894.
95. Rota C, Tomasi A, Iannone A. α -tocopherol amplifies benzoyl peroxide free radical decomposition in a chemical system. *Free Radic Res*. 2006 Jun;40(6):637-45. doi:10.1080/10715760600654895 PubMed PMID: 16753842.
96. Laochunsuwan A, Taweechoatipatr M, Udompataikul M. In vitro study of antibiotic susceptibility of *propionibacterium acnes* strains isolated from acne vulgaris patients. *J Med Assoc Thai*. 2017;100(Suppl. 8):S24-S31.
97. Hoben HJ, Somasegaran P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Appl Environ Microbiol*. 1982 Nov;44(5):1246-7. doi:10.1128/AEM.44.5.1246-1247.1982 PubMed PMID: 16346141; PubMed Central PMCID: PMC242176.
98. Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WM. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol*. 1966 Mar;14(2):170-7. PubMed

PMID: 4959982; PubMed Central PMCID: PMC546645.

99. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, et al. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol*. 2005 May;54(5):481-3. doi:10.1099/jmm.0.45880-0 PubMed PMID: 15824428.
100. Farmery MR, Jones' CE, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ. In vitro activity of azelaic acid, benzoyl peroxide and zinc acetate against antibiotic-resistant propionibacteria from acne patients. *J Dermatol Treat*. 1994;5(2):63-5. doi:10.3109/09546639409084531.
101. Lott R, Taylor SL, O'Neill JL, Krowchuk DP, Feldman SR. Medication adherence among acne patients: a review. *J Cosmet Dermatol*. 2010 Jun;9(2):160-6. doi:10.1111/j.1473-2165.2010.00490.x PubMed PMID: 20618564.
102. Sevimli Dikicier B. Topical treatment of acne vulgaris: efficiency, side effects, and adherence rate. *J Int Med Res*. 2019 Jul;47(7):2987-92. Epub 2019 May 24. doi:10.1177/0300060519847367 PubMed PMID: 31122106; PubMed Central PMCID: PMC6683887.
103. Tan X, Al-Dabagh A, Davis SA, Lin HC, Balkrishnan R, Chang J, et al. Medication adherence, healthcare costs and utilization associated with acne drugs in Medicaid enrollees with acne vulgaris. *Am J Clin Dermatol*. 2013 Jun;14(3):243-51. doi:10.1007/s40257-013-0016-x PubMed PMID: 23572294.
104. Leyden JJ. Efficacy of benzoyl peroxide (5.3%) emollient foam and benzoyl peroxide (8%) wash in reducing *Propionibacterium acnes* on the back. *J Drugs Dermatol*. 2010 Jun;9(6):622-5. PubMed PMID: 20645523.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

นางสาวปณณันท์ บุญชญา

วัน เดือน ปี เกิด

22 ธันวาคม 2533

สถานที่เกิด

จังหวัดพัทลุง

วุฒิการศึกษา

- ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น : ร.ร. จุฬาลงกรณ์ราชวิทยาลัย ตรัง
- ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย : ร.ร. มอ. วิทยานุสรณ์
- แพทยศาสตรบัณฑิต : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
- กำลังศึกษาต่อ Master of Science in Dermatology (ตจวิทยา) ที่ศูนย์
ผิวหนัง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

