

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก ความชุกของโรคราที่เล็บที่เกิดจาก *Candida* ในผู้ป่วยนอก คลินิกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541 เป็นเท่าไร

คำถามรอง

1. เชื้อ *Candida* สายพันธุ์ใดบ้างที่สามารถก่อโรคราที่เล็บ
2. ลักษณะทางคลินิกของโรคราที่เล็บจาก *Candida* เป็นอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความชุกของโรคราที่เล็บที่เกิดจาก *Candida* ในผู้ป่วยนอก คลินิกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541
2. เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์ของ *Candida* ที่สามารถก่อโรคราที่เล็บ
3. เพื่อศึกษาลักษณะทางคลินิกของโรคราที่เล็บจาก *Candida*

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรคราที่เล็บ คือ ผู้ที่มีลักษณะเล็บผิดปกติเข้าได้กับโรคราที่เล็บ โดยมีลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ ได้แก่ มีขุยใต้เล็บหนาขึ้น หรือ มีแผ่นเล็บขรุขระ หรือ มีแผ่นเล็บร่อนจากเนื้อใต้เล็บ โดยที่ผลการตรวจเบื้องต้นโดยใช้น้ำยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์อาจให้ผลลบวก หรือให้ผลลบแต่จากลักษณะทางคลินิกยังตัดโรคราที่เล็บออกไปไม่ได้

รูปแบบการวิจัย

crosssectional descriptive study

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรศึกษา ผู้ป่วยนอก คลินิกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรคราที่เล็บ ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541

เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา

1. ผู้ป่วยนอก คลินิกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรคราที่เล็บ ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541 ทุกราย

2. ผู้ป่วยต้องสมัครใจที่จะเข้าร่วมการศึกษา

เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา

ผู้ป่วยที่ได้ยารักษาโรคเชื้อราโดยได้ยารับประทานภายใน 6 เดือน หรือได้ยาทาภายใน 2 สัปดาห์ก่อนการศึกษา

ตัวอย่าง

ศึกษาในผู้ป่วยทุกรายจากประชากรศึกษาที่เข้าเกณฑ์ข้างต้น (ไม่มีการคำนวณขนาดตัวอย่าง) โดยขอความร่วมมือจากแพทย์ท่านอื่นทุกท่านที่ทำการตรวจที่คลินิกผู้ป่วยนอกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการส่งต่อผู้ป่วยด้วย ซึ่งเมื่อประมาณจากจำนวนผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรคราที่เล็บของคลินิกผู้ป่วยนอกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในแต่ละเดือนซึ่งมีประมาณ 9-10 รายต่อเดือนแล้ว ตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 100 ราย

การสังเกตและการวัด

ตัวแปรต้น

1. ลักษณะของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ อาชีพ ศาสนา ระดับการศึกษา สถานภาพสมรส รายได้ของครอบครัวต่อเดือน ที่อยู่อาศัย กิจกรรมและงานอดิเรก โรคประจำตัว ยาที่ใช้ ประวัติ trauma บริเวณเล็บ

2. ลักษณะทางคลินิก ได้แก่ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเล็บ พื้นที่ผิวที่มีการเปลี่ยนแปลงของเล็บ สีของเล็บ การมี paronychia ตำแหน่งและจำนวนนิ้วที่เป็น ระยะ

เวลาที่เป็น การเป็นโรคเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณอื่น ผื่นผิวหนังอื่นบริเวณข้างเคียง ผื่นโรค สะเก็ดเงิน

ตัวแปรตาม

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของเล็บ ผลการตรวจโดยน้ำยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ และ ผลการเพาะเชื้อแผ่นเล็บ

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

I. อธิบายวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัย และประโยชน์ของการวิจัยแก่ผู้ป่วย

II. ชักประวัติและตรวจร่างกายเพื่อเก็บข้อมูลเกี่ยวกับ

- ลักษณะของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ อาชีพ ศาสนา ระดับการศึกษา สถานภาพสมรส รายได้ของครอบครัวต่อเดือน ที่อยู่อาศัย กิจกรรมและงานอดิเรก โรคประจำตัว ยาที่ใช้ ประวัติกระทบกระแทกบริเวณเล็บ

- ลักษณะทางคลินิก ได้แก่ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเล็บ พื้นที่ผิวที่มีการเปลี่ยนแปลงของเล็บ สีของเล็บ การมี paronychia ตำแหน่งและจำนวนนิ้วที่เป็น ระยะเวลาที่เป็น การเป็นโรคเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณอื่น ผื่นผิวหนังอื่นบริเวณข้างเคียง ผื่นโรคสะเก็ดเงิน

III. ตรวจหาเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคราที่เล็บ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. ทำความสะอาดบริเวณเล็บด้วย 70 %alcohol

2. ใช้sterile blade No. 15 ขูดขุยบริเวณเล็บที่เป็นโรคออกมา แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนหนึ่งนำไปตรวจโดยใช้น้ำยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ บันทึกรูป อีกส่วนหนึ่งนำไปเพาะเชื้อโดยใส่ในขวดแก้วปราศจากเชื้อและนำไปเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการทันที การขูดขุยเลือกบริเวณที่ขูดขึ้นกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเล็บ ดังนี้ คือ

- distal and lateral subungual onychomycosis ให้ตัดบริเวณส่วนปลายของเล็บ ออกไปก่อน แล้วจึงขูดขุยจาก nail bed และ nail plate ของเล็บที่มีรอยโรคที่ใกล้รอยต่อกับบริเวณเล็บปกติมากที่สุด

- white superficial onychomycosis ให้ขูดขุยบริเวณ nail surface

- proximal subungual onychomycosis ใช้ blade No. 15 ผ่านเอาเล็บส่วนบนออกไปก่อน แล้วจึงขูดขุยบริเวณ proximal nail bed

- total nail dystrophy ให้ขูดขุยจาก nail bed และ nail plate

3. นำขุยเล็บส่วนที่หนึ่งใส่ slide และหยด 10 % KOH with dimethylsulfoxide และตรวจหา budding yeasts , pseudohyphae และ septate hyphae ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และ 40X อ่านผลโดยผู้ศึกษาคนเดียวกันตลอดการศึกษาและบันทึกผล

4. ตัดเล็บบริเวณที่เป็นรอยโรคโดยใช้กรรไกรตัดเล็บธรรมดาตัดบริเวณเดียวกับที่ขูดขุยได้เล็บทุกรายในกรณีที่ทำได้โดยไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บ ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเล็บแบบ distal and lateral subungual onychomycosisทุกราย ตัดแผ่นเล็บให้ได้ขนาดใหญ่ที่สุดโดยให้ใหญ่กว่า 3 มม. เพื่อนำไปดูลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา โดยการย้อม Hematoxylin and eosin และ Periodic acid Schiff อ่านผลโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญหนึ่งคนซึ่งไม่ทราบผลการตรวจใดๆมาก่อน

5. นำขุยเล็บส่วนที่ 2 จากข้อ 3.2 มาเพาะเชื้อใส่จานเพาะเชื้อ 2 ใบ ๆ ละ 10 inoculi โดยจานเพาะเชื้อใบหนึ่งเป็น Sabouraud' s dextrose agar without cycloheximide เพื่อดูเชื้อ yeasts และ molds ส่วนอีกใบหนึ่งเป็น Sabouraud' s dextrose agar with cycloheximide โดย cycloheximide จะยับยั้งการเจริญของ molds และ yeasts บางชนิดจึงใช้เพาะเชื้อ dermatophytes อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดจะใส่ Chloramphenicol เพื่อยับยั้งการเจริญของ bacteria แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส และดูการเปลี่ยนแปลงอย่างน้อยสัปดาห์ละ 2 ครั้งจนถึง 4 สัปดาห์ เมื่อมี colonies ขึ้นให้สังเกตลักษณะ colonies และศึกษาลักษณะทางจุลสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้น้ำยา lactophenol cotton blue เพื่อดูชนิดของเชื้อรา

ถ้าผลการเพาะเชื้อขึ้นเชื้อ dermatophytes ถือว่าผลการเพาะเชื้อให้ผลบวกจริง แต่ถ้าผลการเพาะเชื้อขึ้นเชื้อ yeasts หรือ molds แล้ว จะต้องมีการตรวจโดยน้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือผลการตรวจจุลพยาธิวิทยาของเล็บที่ตรงกับผลการเพาะเชื้อให้ผลบวกด้วย และต้องขึ้นเชื้อเดียวกันอย่างน้อย 5 ใน 20 inoculi ⁷

ในการศึกษานี้เพื่อผลการศึกษาที่แน่นอนในการป้องกันการขึ้นเชื้อ *Candida* จาก contamination จะทำการเก็บขุยเล็บจากผู้ป่วยมาเพาะเชื้อซ้ำอีกครั้ง 2-3 สัปดาห์ต่อมา ในกรณีที่ผลการเพาะเชื้อครั้งแรกขึ้น *Candida*

6. ในกรณีผลการเพาะเชื้อขึ้น *Candida* จะทำการตรวจพิเศษเพื่อจำแนกชนิดสายพันธุ์ โดยดู germ tube production ที่ 37 องศาเซลเซียส Chlamydoconidia production ตลอดจนทดสอบ assimilation และ fermentation ในกรณีที่ผลการจำแนกยังไม่ชัดเจนจะทำการจำแนกด้วย API test kit

การแปลผลการเป็นเชื้อก่อโรคของ Candida

รวบรวมผลจากลักษณะทางคลินิก ผลการตรวจโดยน้ำยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของเล็บ ผลการเพาะเชื้อแผ่นเล็บ แล้วนำมาแปลผล โดยอาศัย Criteria ของ Haneke ที่ใช้วินิจฉัยว่า yeasts หรือ molds เป็นเชื้อก่อโรค ซึ่งมีดังนี้

1. ผู้ป่วยต้องมีอาการแสดงที่เข้าได้กับการติดเชื้อราที่เล็บ
2. ลักษณะรูปร่างเชื้อราที่พบในแผ่นเล็บ (ดูจากผลการตรวจโดยน้ำยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของเล็บ) จะต้องตรงกับชนิดของเชื้อที่พบในการเพาะเชื้อ

3. ผลการเพาะเชื้อพบว่ามี colony ขึ้นเป็นเชื้อเดียวกันอย่างน้อย 5 ใน 20 inoculi โดยไม่มีเชื้อกลางขึ้น

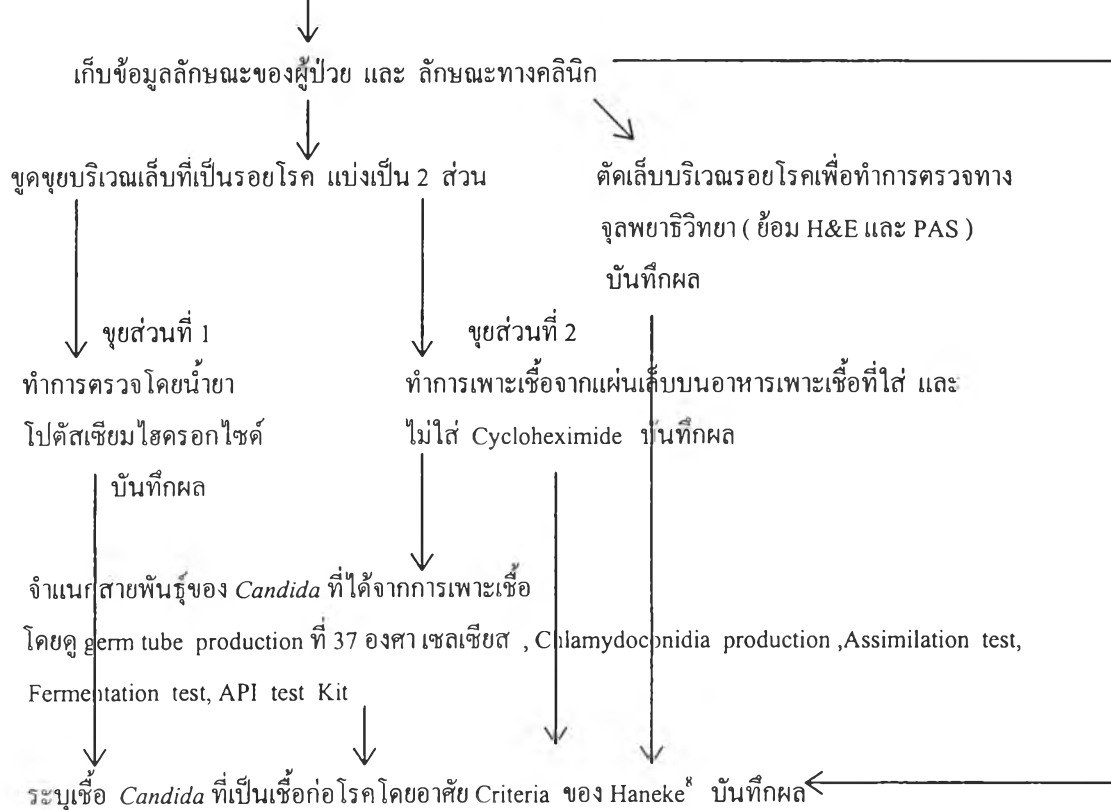
4. ไม่พบเชื้อราชนิดอื่นที่ก่อโรคราที่เล็บเจริญบนอาหารเพาะเชื้อที่ใส่ และไม่ใส่ Cycloheximide

5. เชื้อที่พบเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส

6. สีของ subungual mass ต้องเป็นสีเดียวกับใน colony ที่เพาะได้

Flow chart สรุปขั้นตอนการรวบรวมข้อมูล แสดงได้ ดังนี้

อธิบายวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัย และประโยชน์ของการวิจัยแก่ผู้ป่วย



การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ความชุกของโรคราที่เล็บที่เกิดจาก *Candida* ในผู้ป่วยนอก คลินิกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ต่อ 100 ราย ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541 คำนวณได้จาก

$$\frac{\text{จำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคราที่เล็บจาก } Candida \text{ ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541}}{\text{จำนวนผู้ป่วยนอก คลินิกโรคผิวหนังของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทั้งหมด}} \times 100$$

ในช่วงกันยายน พ.ศ. 2540 - สิงหาคม พ.ศ. 2541

2. สายพันธุ์ของ *Candida* ที่สามารถก่อโรคราที่เล็บ เป็นข้อมูลจำนวนนับ สามารถสรุปข้อมูลโดยการคำนวณเป็นร้อยละ และนำเสนอในรูปตาราง แผนภูมิแท่ง แผนภูมิวงกลม

3. ลักษณะทางคลินิกซึ่งพบในโรคราที่เล็บจาก *Candida* ได้แก่ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเล็บ สีของเล็บ การมี paronychia ตำแหน่งและจำนวนนิ้วที่เป็น การเป็นโรคเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณอื่น เป็นข้อมูลจำนวนนับ สามารถสรุปข้อมูลโดยการคำนวณเป็นร้อยละ และนำเสนอในรูปตาราง แผนภูมิแท่ง แผนภูมิวงกลม ส่วน ระยะเวลาที่เป็น พื้นที่ผิวที่มีการเปลี่ยนแปลงของเล็บ เป็นข้อมูลเชิงปริมาณที่ได้จากการวัด สามารถสรุปข้อมูลโดยการคำนวณเป็นค่าเฉลี่ย

ปัญหาทางจริยธรรม

การศึกษานี้ดูผลการตรวจจุลพยาธิวิทยาของเล็บ ผลการตรวจโดยน้ำยาไปดัสเซียม ไฮดรอกไซด์ และผลการเพาะเชื้อแผ่นเล็บของผู้ป่วยโดยไม่มีอันตรายแก่ผู้ป่วยและทำการศึกษาด้วยความสมัครใจ จึงไม่น่ามีปัญหาทางจริยธรรม

ข้อจำกัดในการวิจัย

การตัดเล็บผู้ป่วยโดยใช้กรรไกรตัดเล็บบริเวณรอยโรคโดยไม่ให้ผู้ป่วยเจ็บเพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยานั้น อาจทำได้จำกัดเฉพาะลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเล็บบางอย่างเท่านั้น

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

การศึกษานี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งทางคลินิก เนื่องจากการรักษาโรคราที่เก็บจาก *Candida* และ dermatophytes ต่างกัน การทราบว่าเชื้อใดเป็นเชื้อก่อโรครมีความสำคัญในแง่ของการรักษา การพยากรณ์โรค และการป้องกันการเกิดใหม่ของโรค

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

อุปสรรค การตรวจหาเชื้อราโดยน้ำยาโปสต์เซียมไฮดรอกไซด์ การตรวจลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และการเพาะเชื้อราอาจให้ผลผิดพลาดได้ถ้าขาดความชำนาญและความละเอียดรอบคอบ

มาตรการในการแก้ไข ผู้ศึกษาควรมีความรู้ความชำนาญ และความละเอียดรอบคอบ