

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

การติดเชื้อราในแผ่นเล็บ หมายถึง การที่ผู้ป่วยมีแผ่นเล็บผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้ มีขุยใต้เล็บหนาขึ้น แผ่นเล็บขรุขระ แผ่นเล็บร่อนจากเนื้อใต้เล็บ ร่วมกับตรวจพบเชื้อราโดยวิธีใดวิธีหนึ่งดังต่อไปนี้ คือ การเพาะเชื้อ การตรวจโดยน้ำยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ การตรวจโดย PAS stain

คำนิยามเชิงปฏิบัติการ

การตรวจหาเชื้อราในแผ่นเล็บโดยใช้ยาโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ให้ผลบวก หมายถึง การตรวจพบสายเชื้อรา อาจเป็น branching septate hyphae หรือ arthrospore รูปร่างเป็นท่อนๆ

การตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อให้ผลบวก หมายถึงการเพาะเชื้อให้ผลข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้ (Fizpatrick,1992)

1. เพาะเชื้อขึ้นเป็น Dermatophyte
2. เพาะเชื้อขึ้นเป็น mold หรือ yeast ซึ่งเมื่อนำไปตรวจด้วย Microscopic examination และพบ hypha หรือ spore
3. เพาะเชื้อขึ้นเป็น non-dermatophyte เมื่อนำไปทำ subculture แล้วพบว่ามี colony ขึ้นเป็น non-dermatophyte อย่างน้อย 5 colony ใน 20 colony โดยที่ไม่มี dermatophyte ขึ้น

การตรวจทางพยาธิวิทยา โดยย้อม PAS stain ให้ผลบวก หมายถึง ตรวจพบ hyphae หรือ spore ซึ่งติดสีแดงแทรกในแผ่นเล็บ

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าศึกษา (Inclusion criteria)

1. ไม่จำกัดเพศ อายุ
2. มีลักษณะเล็บผิดปกติเข้าได้กับโรคเชื้อราในเล็บ โดยมีลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้

- มีขุยใต้เล็บหนาขึ้น
- มีแผ่นเล็บขรุขระ
- มีแผ่นเล็บร่อนจากเนื้อใต้เล็บ

เกณฑ์ในการคัดเลือกรอกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยได้รับยาฆ่าเชื้อรามาก่อน โดยได้ยารับประทานภายใน 6 เดือน หรือได้ยาทาภายใน 2 สัปดาห์ ก่อนการศึกษา

วิธีทดลอง

1. ซึ่แจ้งวัตถุประสงค์วิธีการ ประโยชน์ที่ได้รับแก่ผู้ป่วย
2. ทำการซักประวัติ

- 2.1 ประวัติส่วนตัว อายุ เพศ อาชีพ ภูมิลำเนา
- 2.2 ประวัติของโรค ระยะเวลาที่เป็น อากาารร่วม
- 2.3 ประวัติการเจ็บป่วยในอดีต ประวัติโรคประจำตัว ประวัติการแพ้ยา
- 2.4 ประวัติการรักษาเชื้อรา

3. ตรวจร่างกาย

ตรวจลักษณะความผิดปกติของเล็บ บันทึกจำนวนเล็บ-ตำแหน่งเล็บที่ผิดปกติ ลักษณะของความผิดปกติ

4. ผู้ป่วยได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังนี้

- 4.1. Direct microscopic examination

วิธีการ ขูดขุยใต้เล็บตรงบริเวณที่มีลักษณะผิดปกตินำไปป้ายบนสไลด์และหยดน้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับ DMSO แล้วตรวจหาเชื้อราผ่านกล้องจุลทรรศน์อ่านผลโดยเจ้าหน้าที่ประจำห้องคนเดียวและบันทึกผล

- 4.2. Fungal culture

วิธีการ ทำความสะอาดแผ่นเล็บ และบริเวณรอบๆ ด้วย alcohol 70% และใช้กรรไกรตัดเล็บธรรมดาตัดแผ่นเล็บ โดยตัดบริเวณเดียวกับที่ขูดขุยใต้เล็บ ตัดแผ่นเล็บให้ได้ขนาดใหญ่ที่สุดเท่าที่จะตัดได้ โดยไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บ โดยให้ใหญ่กว่า 3 มม. หลังจากนั้นแบ่งครึ่งแผ่นเล็บที่ตัดได้โดยส่วนแรกนำไปตรวจหาเชื้อรา โดยวิธี ทางพยาธิวิทยา อีกส่วนหนึ่งนำไปเพาะเชื้อโดยใส่แผ่นเล็บในขวดแก้วฆ่าเชื้อและนำส่งห้องปฏิบัติการทันที อ่านผลโดยแพทย์คนเดียวและบันทึกผล

การเพาะเชื้อราในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เริ่มจากการนำแผ่นเล็บมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้ Sabouraud's dextrose and modified SDA ใช้ sterile scalpel หรือ inoculating needle ด้านปลายแต่ละสิ่งส่งตรวจนั้น แล้วเพาะลงที่ผิวของ medium (อย่าฝัง specimen ลึกลงไปใน medium) เก็บ media ที่เพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-30°C. อ่านผลเพาะเชื้อทุก 4-6 วัน ถ้ามีเชื้อราในอากาศขึ้นปนกับเชื้อราที่สงสัยว่าเป็น dermatophyte ต้องทำ subculture คือถ่ายเชื้อที่สงสัยเหล่านั้นลงบน Sabouraud's agar ใหม่เพื่อให้อ่านผลต่อไป ถ้ายังไม่มีเชื้อราขึ้นต้องเก็บต่อไปจนครบ 1 เดือนจึงจะสรุปว่าใน specimen นั้นไม่มีเชื้อรา ถ้ามีเชื้อราขึ้นต้องนำไปศึกษาลักษณะโคโลนี และลักษณะจุลสัณฐานเพื่อแยก species (กวี ภูโพนุลย์, 2524)

4.3. Histological examination : Periodic acid-Schiff staining

วิธีการ

4.3.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง ทำความสะอาดแผ่นเล็บและบริเวณรอบๆด้วย alcohol 70% และใช้กรรไกรตัดเล็บธรรมดาตัดแผ่นเล็บ โดยตัดบริเวณเดียวกับที่ซูดซูดได้เล็บ ตัดแผ่นเล็บให้ได้ขนาดใหญ่ที่สุดเท่าที่จะตัดได้ โดยไม่ทำให้ผู้ป่วยเจ็บ โดยให้ใหญ่กว่า 3 มม. หลังจากนั้นแบ่งครึ่งแผ่นเล็บที่ตัดได้ ส่วนหนึ่งนำไปเพาะเชื้อ อีกส่วนหนึ่งนำมาตรวจหาเชื้อราโดยวิธีทางพยาธิวิทยา

4.3.2 การเตรียมแผ่นเล็บให้อ่อนตัว เมื่อได้แผ่นเล็บที่ตัดจากผู้ป่วยแล้ว นำมาแช่ใน 10% KOH ผสมกับ DMSO (Dimethyl sulfoxide) เป็นเวลาครึ่งชม. เพื่อช่วยให้แผ่นเล็บอ่อนตัวลง

4.3.3 Fixation หลังจากนั้นจึงนำแผ่นเล็บไปแช่ต่อใน 10% Formalin อย่างน้อย 2 ชม.

4.3.4 Processing tissue ต่อจากนั้นจึงนำแผ่นเล็บที่ได้ไปผ่านขบวนการทาง Histological technique โดยผ่านเข้าเครื่อง Automatic tissue processor ของบริษัท Reichert-Jung ซึ่งเป็นเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ประกอบไปด้วยขั้นตอนดังนี้ แผ่นเล็บจะถูกนำไปแช่ใน 70% alcohol เป็นเวลา 3 ชม.ต่อจากนั้นนำไปแช่ใน Absolute alcohol 3 ชม.จากนั้นนำไปแช่ใน Xylene 3 ชม. และแช่ใน Paraffin 2 ชม.

4.3.5 Embedding หลังจากนั้นนำแผ่นเล็บที่ได้ไป embeded ใน paraffin แล้วนำไปขึ้นรูปใน block

4.3.6 Cutting นำแผ่นเล็บที่ได้ไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆโดยใช้เครื่อง Microtome รุ่น 820 ของบริษัท American optical โดยตัดให้มีความหนา 3 มม. แล้วนำชิ้นเล็บไปวางบนสไลด์แก้วเพื่อเตรียมการย้อมต่อไป

4.3.7 Staining

4.3.7.1 นำชิ้นเล็บที่ตัดไปย้อม Hematoxyline and eosin 1 ชิ้น ตามวิธีของ Ednar และคณะ (1992) หน้า 53-58

4.3.7.2 นำชิ้นเล็บที่ตัดไปย้อม Periodic acid Schiff 1 ชิ้น ตามวิธีของ Ednar และคณะ (1992) หน้า 151-152

4.3.8 นำ specimen ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อ่านผลโดยแพทย์หนึ่งคนซึ่งไม่ทราบผลการตรวจใดๆมาก่อนและบันทึกผล

5. การให้การรักษา

ผู้ป่วยที่พบเชื้อราในแผ่นเล็บโดยใช้น้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ จะได้รับยาฆ่าเชื้อราแบบรับประทานทันที

ผู้ป่วยที่ได้ผลการตรวจ โดยน้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ผลลบ จะนัดหลังการตรวจ 1 เดือนเพื่อรอผลเพาะเชื้อ ถ้าการเพาะเชื้อหรือการตรวจ PAS stain ให้ผลบวกจะได้รับยาฆ่าเชื้อรา

การเก็บรวบรวมข้อมูล

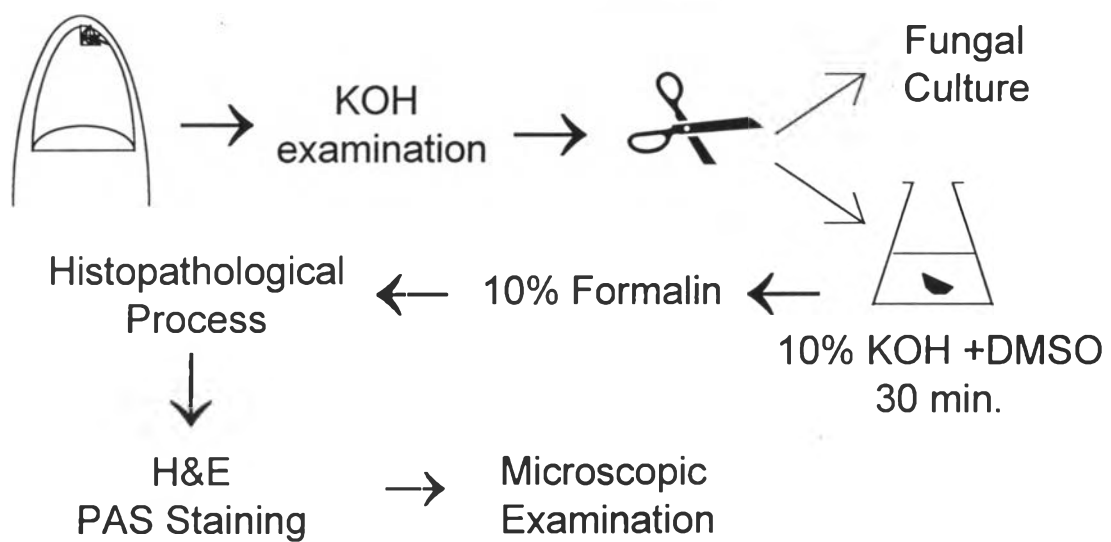
1. เก็บรวบรวมข้อมูลทั่วไปและข้อมูลการเจ็บป่วยของผู้ป่วย โดยการซักประวัติ ข้อมูลต่างๆ ประกอบด้วย ชื่อ, อายุ, HN, ระยะเวลาที่มีเล็บผิดปกติ ประวัติการรักษาเชื้อรา และบันทึกข้อมูลลงในแบบฟอร์ม ซึ่งทำโดยแพทย์ 1 คน
2. เก็บข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะความผิดปกติของเล็บที่สงสัยว่าติดเชื้อรา โดยการตรวจร่างกาย และบันทึกผลลงในแบบฟอร์ม ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่งของเล็บที่ผิดปกติและคำนวณพื้นที่ของแผ่นเล็บที่ติดเชื้อในแต่ละแผ่นบันทึกเป็นพื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร)
3. บันทึกตัววัดทางห้องปฏิบัติการ 3 ตัว ได้แก่
 - การตรวจดูสายเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้น้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์
 - การเพาะเชื้อในวุ้นเลี้ยงเชื้อ
 - การตรวจดูเชื้อราจากการย้อม PAS

ซึ่งจะทำการตรวจและบันทึกผลโดยแพทย์หรือเจ้าหน้าที่คนละคน และไม่ทราบผลของแต่ละตัววัด

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อราในแผ่นเล็บโดยวิธีทางพยาธิวิทยา กับวิธีมาตรฐาน คือ การเพาะเชื้อและ/หรือ การใช้น้ำยาโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ และวิเคราะห์ข้อมูลหาความแตกต่างของผลการตรวจหาเชื้อ

เราแต่ละวิธีโดยใช้ Mc Nemar'test และ ตรวจวัดความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อราในเล็บด้วย Kappa statistic



ภาพที่ 1 ภาพแสดงขั้นตอนการทำวิจัยเพื่อหาเชื้อราในแผ่นเล็บ