บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและการรวบรวมข้อมูล

คำถามของการวิจัย

การตรวจนับจำนวนเชื้อในผู้ที่เป็นเกลื้อนโดยวิธี CSSS ตรวจพบเชื้อยีสต์ Pityrosporum ได้มากกว่าวิธีเพาะและนับเชื้อแบบ "tape method" หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาจำนวนเชื้อยีสต์ Pityrosporum โดยวิธี CSSS ในผู้เป็นเกลื้อนเปรียบเทียบกับวิธีเพาะและนับเชื้อแบบ "tape method"

วัสดุและอุปกรณ์

1. กาว commercial cyanoacrylate "super glue"
2. แผ่นกาวใส Scotch tape ของ 3M
3. แผ่นพลาสติกแข็งใส ตัดขนาด 1.5 x 6 เซนติเมตร
4. น้ำยา methylene blue
5. จานใส่วุ้นเลี้ยงเชื้อ
6. Sabouraud 's dextrose agar with chloramphenicol and cycloheximide

ส่วนประกอบ

glucose	40. g
neopeptone	10.0 g
agar	15.0 g

cycloheximide (actidione)	0.50 g
chloramphenicol	0.05 g
distilled water	1000.0 ml

ละลาย chloramphenicol 0.05 กรัม (g) ใน alcohol 10 มิลลิลิตร (ml) และละลาย cycloheximide 0.50 กรัม ในสาร acetone 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมลงในส่วนประกอบที่เหลือที่ละลายไว้แล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

7. น้ำมันมะกอก (sterile olive oil)

8. ตู้ safety carbinet model Securigarde 1200

ใช้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการเพาะเชื้อ

คุณสมบัติ

-มีลักษณะการไหลผ่านของอากาศในระนาบเดียว (laminar flow)

-มีขอบเขตอากาศป้องกันระหว่างบริเวรทำงานและสิ่งแวดล้อมภายนอก (โดยอาศัยอากาศที่ไหลผ่านด้วยความเร็ว >/= 0.4 เมตร/วินาที)

-มีหลอดอัลตราไวโอเลตสำหรับฆ่าเชื้อ (germicidal U.V. lamp)

-มีตัวกรองอนุภาค HEPA (efficiency 99.999% สำหรับอนุภาค >/= 0.3 µm NaCl และ DOP tests) พร้อมด้วยกรอบอลูมิเนียม

9. ตู้ Termaks laboratory cabinet TS 5260

ใช้ในการ incubate ตัวอย่างที่นำมาเพาะเชื้อ

คุณสมบัติ

-มีช่วงอุณหภูมิ 5 °C เหนืออุณหภูมิห้องจนถึง 70 °C

-มีความแม่นยำของอุณหภูมิ +/- 1 °C

-มีตัวควบคุมอุณหภูมิ ไม่ให้ สูงหรือต่ำเกินไป (overheat and low temperature safety thermostat)

-มีพัดลมความเร็ว 2 ระดับสำหรับควบคุมและปรับอุณหภูมิในกรณีที่มีการเปิดประตูตู้เป็นประจำ

10. กล้องจุลทรรศน์

11. แผ่นพลาสติกแข็งใส เพื่อการนับเชื้อ

-มีเส้นแบ่งเป็น 100 ช่องต่อตารางเซนติเมตร

ประชากรเป้าหมายและขนาดตัวอย่าง

-ประชากรเป้าหมาย

ผู้ที่เป็นโรคเกลื้อนที่มารับการตรวจรักษาในรพ.ธัญญารักษ์ จำนวน 43 ราย

-กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา

1. มีลักษณะทางคลีนิกที่เข้าได้โดยมีลักษณะเป็นผื่นเป็นวง มีสะเก็ด อาจรวมเป็นผื่นใหญ่ ที่มีสีแตกต่างไปจากผิวหนังปกติรอบข้าง อาจเป็นสีน้ำตาล สีแดง หรือเป็นดวงสีจางขาว พบมากบริเวณลำตัว คอ หรือแขนส่วนบน

2. ตรวจพบเชื้อยีสต์จากผื่นโดยนำสะเก็ดไปย้อมด้วย methylene blue

3. สามารถให้ความร่วมมือในการศึกษาและติดตามผลได้

4. ต้องไม่ได้ใช้ยาทาหรือยารับประทานต้านเชื้อราหรือยาสเตียรอยด์มาก่อน

-กลุ่มควบคุม

ผู้ที่มีลักษณะเข้าเกณฑ์ดังกล่าวแต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อยีสต์จากรอยโรคโดยใช้ Methylene blue

-การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา และข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพที่ได้จากการนับ ใช้สูตรคำนวณขนาดตัวอย่างดังนี้

$$n = \frac{Z^2 p q}{d^2}$$

จากผลของงานวิจัยนำร่อง (pilot study) ผู้ที่มีผื่นโรคเกลื้อน 10 ราย ที่ได้ทำการตรวจยืนยันด้วย methylene blue พบว่าทั้ง 10 รายเมื่อตรวจด้วยวิธี CSSS มีจำนวนโคโลนี มากกว่า 20 ทั้งหมด แต่มีเพียง 9 รายโดยวิธี tape method ที่มีจำนวน โคโลนี มากกว่า 20

โอกาสตรวจนับจำนวนเชื้อโดยวิธี tape method ได้มากกว่า 20 โคโลนี (p) = .9

q = 1-.9 = .1

Z = ค่า Z จากตาราง Z เมื่อ α .05 มีค่า = 1.96

d = ความคลาดเคลื่อนของโอกาสที่จะตรวจพบ (Maximum permissible error =0.1xp)

$$d = .1 \times p = .09$$

$$n = \frac{1.96^2 \times p \times q}{d^2} = \frac{1.96^2 \times .9 \times .1}{(.09)^2} = 43$$

หมายเหตุ อาศัยค่า p จากการทำ pilot study มาคำนวณ เนื่องจากจำนวน โคโลนี ต่อตารางเซนติเมตรในผิวหนังปกติที่ไม่เป็นเกลื้อนมีค่าอยู่ระหว่าง 1-16 โคโลนี และค่า 20 โคโลนี ใช้เป็นจุดแบ่งแยกระหว่างผื่นกับผิวหนังปกติ (Wikler, Nieboer,and Willemze, 1992)

การรวบรวมข้อมูล

-บันทึก อายุ , ระยะเวลาที่เป็นผื่น, โรคแทรกซ้อนต่าง ๆ, อาการที่เป็นเริ่มแรก, อาการคัน, การใช้ยา

-บันทึกลักษณะผื่น ตำแหน่ง และการกระจายของผื่น

-ตรวจหาเชื้อยีสต์จากผื่นโดยใช้แผ่นกาวใสปิดที่บริเวณผื่น แล้วนำสะเก็ดไปย้อมด้วย methylene blue

-การเพาะเชื้อ Pityrosporum

ใช้แผ่นพลาสติกแข็งใสขนาด 1.5 x 6 เซนติเมตร หยดด้วยสาร cyanoacrylate 1 หยด นำไปปิดที่บริเวณผิวหนังที่ทำการตรวจหาเชื้อทิ้งไว้ให้กาวแห้งประมาณ 1 นาที ลอกออกแล้วนำไปเพาะเชื้อและใช้แผ่นกาวใสปิดที่บริเวณใกล้เคียงที่เป็นผื่นพอ ๆ กัน นำไปเพาะเชื้อเช่นกัน

นำแผ่นที่ได้จากแต่ละวิธีไปวางบน หยดของ sterile olive oil ซึ่งอยู่บน sabouraud medium และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 7 วัน ทำการนับจำนวนโคโลนีต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร โดยใช้แผ่นพลาสติกที่มีเส้นแบ่งละเอียดทุก 1 ตารางมิลลิเมตร โคโลนีที่เห็นจากทุกแผ่นนำไปตรวจย้อมด้วย methylene blue เพื่อยืนยันว่าโคโลนี ที่พบเป็นยีสต์

การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ขึ้นจากทั้งสองวิธี

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีทั้งสองวิธี และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ การทดสอบวิลคอกซันแบบอันดับที่มีเครื่องหมาย (Wilcoxon Matched Pairs Signed-Ranks test)

การเปรียบเทียบความสามารถของทั้งสองวิธีในการวินิจฉัยแยกโรค

แยกรอยโรคจากผิวหนังปกติโดยใช้เกณฑ์ 20 โคโลนี เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แมคนีมาร์ (McNemar test for the significance of changes)