บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ก. ตัวอย่างศึกษา, วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

1. กลุ่มตัวอย่างศึกษา

กลุ่มตัวอย่างศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 25 คน

1. กลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือก

1. ชายหรือหญิงไทยที่ติดเชื้อเอชไอวีและได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยวิธีอีไลซา (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay) และมีจำนวนลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 น้อยกว่า 200 เซลล์/มม^3
2. เป็นพาหะของเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*แต่ตรวจไม่พบรอยโรคทางคลินิกของการติดเชื้อราในช่องปาก และไม่ได้รับยาต้านเชื้อราทั้งทางเฉพาะที่ และทางระบบ ในช่วง 1 เดือนก่อนการเก็บเชื้อจากช่องปาก

2. กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธีอีไลซา และเป็นพาหะของเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*, ไม่มีโรคทางระบบ และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ, ยาที่กดระบบภูมิคุ้มกัน และยาต้านเชื้อราในช่วง 1 เดือนก่อนการเก็บเชื้อจากช่องปาก

ตัวแปร

ตัวแปรอิสระ คือ

1. เชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*จากกลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์ และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

2. เชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*ที่สัมผัสกับยาต้านเชื้อรา คือ นิสตาตินและมิโคนาโซล

ตัวแปรตาม คือ ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในห้องปฏิบัติการ

2. <u>วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย</u>

<u>สารเคมี</u> กรดอะซิติก (Acetic acid), กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid), โซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride), โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-2-ไฮเดรต (Sodiumdihydrogenphosphate-2-hydrate), ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรต (Disodiumhydrogenphosphate-12-hydrate), ทวีน-80 (Tween-80), เมธานอล (Methanol), และเอธานอล (Ethanol) ได้จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) ส่วน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulphoxide), สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ (Coomassie brilliant blue R), อัลบูมินจากซีรัมของวัว (Bovine serum albumin, BSA), และเอ็น-ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N-dimethyl formamide) ได้จากบริษัท Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, U.S.A.)

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u> แซบูโร เด็กซ์โตรส อะการ์ (Sabouraud's dextrose agar), นูเทรียน บรอธ (Nutrient broth), น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลกาแล็กโตส, น้ำตาลมอลโตส, ยีสต์ คาร์บอน เบส (Yeast carbon base), ยีสต์ ไนโตรเจน เบส (Yeast nitrogen base), ยีสต์ เอ็กซ์แทร็ก (Yeast extract), และอะการ์ (Agar) ได้จากบริษัท Difco Laboratories (Detroit, Michigan, U.S.A.) แซบูโร เด็กซ์โตรส บรอธ (Sabouraud's dextrose broth), น้ำตาลซูโครส, และน้ำตาลแล็กโตส ได้จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) ส่วนกลูตินัส ไรซ์ อะการ์ (Glutinous rice agar) เตรียมโดยใช้แป้งข้าวเหนียว, อะการ์, ทวีน-80 และน้ำ ตามวิธีการของ Sukroongreung (1971)

<u>ยา</u> นิสตาติน (Nystatin) ได้จาก Squibb Manufacturing Inc. (A Bristol-Meyers Squibb Company, Humacao, Puerto Rico), มิโคนาโซล (Miconazole) ได้จาก Janssen Pharmaceutica Ltd. (Cork, Ireland) ส่วนเพนนิซิลิน จี โซเดียม (Penicillin G Sodium) และสเตร็ปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) ได้จาก M&H Manufacturing Co., Ltd. (กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

ข. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*

กลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มจะได้รับการสอบถามเกี่ยวกับประวัติทางการแพทย์ การได้รับยาชนิดต่างๆ ในช่วง 1 เดือนที่ผ่านมา รวมทั้งการตรวจสภาพในช่องปากเพื่อดูว่ามีรอยโรคแคนดิเดียซิสและโรคอื่นๆ หรือไม่ กลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์จะได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยวิธีอีไลซา และมีจำนวนลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4 น้อยกว่า 200 เซลล์/มม^3 ส่วนกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี จะได้รับการยืนยันว่าไม่ติดเชื้อดังกล่าวด้วยวิธีอีไลซาเช่นเดียวกัน การตรวจหาปริมาณลิมโฟซัยท์ทั้งหมดได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยท์ที่มีอยู่ในเม็ดเลือดขาว

การเก็บตัวอย่างเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์* ทำโดยใช้สำลีพันปลายไม้ (swab) ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ถูที่เยื่อบุผิวช่องปากโดยรอบ และนำมาเพาะเลี้ยงบน 6.5% แซบูโร เด็กซ์โตรส อะการ์ที่มีเพนนิซิลิน จี โซเดียม 250 ยูนิต/มิลลิลิตร และ สเตร็ปโตมัยซิน ซัลเฟต 0.25 กรัม/มิลลิลิตร แล้วนำมาเข้าตู้อบในสภาพที่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ในกรณีที่ยังไม่พบเชื้อขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ ก็อบต่อไปจนถึง 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำจานเลี้ยงเชื้อออกจากตู้อบ เลือกหาโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะสีครีม ผิวเรียบ มัน นูน กลม ถ่ายเชื้อจากโคโลนีใสในนูเทรียน บรอธ และทำให้เชื้อกระจายโดยใช้เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำเชื้อมาเพาะลงบนแซบูโรเด็กซ์โตรส อะการ์ที่ไม่มีเพนนิซิลิน จีและสเตร็ปโตมัยซิน และนำเข้าตู้อบที่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีที่แยกห่างจากโคโลนีอื่น (isolated colony)

การทดสอบว่าเป็นเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์* ทำได้โดยการถ่ายเชื้อมาเลี้ยงบนกลูตินัส ไรซ์ อะการ์ แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) ทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และตรวจหาแคลมิโดโคนิเดียมด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ยังทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ โดยเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ และอบเชื้อที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบการเกิดกรดและก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านั้น

การเก็บรักษาเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์* ทำได้โดยถ่ายเชื้อมาเลี้ยงในแซบูโร เด็กซ์โตรส สแลนท์ (slant) ที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียสนาน 2 วัน จากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4°เซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์ จากนั้นเชื้อจะถูกถ่ายไปเลี้ยงในสแลนท์ใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อยไป จนกว่าจะเสร็จการทดลอง

2. <u>การเตรียมโบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน อะการ์</u> (De Bernardis และคณะ, 1996)

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 10 เท่า ซึ่งประกอบด้วย ยีสต์ คาร์บอน เบส 11.7%, ยีสต์เอ็กซ์แทร็ก 0.1%, ซีรัม อัลบูมินของวัว 2% และปรับให้ได้ที่พีเอช 5 ด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริก จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำสารละลายนี้มากรองผ่านกระดาษกรองและแผ่นกรองเชื้อแบคทีเรียขนาดรู 0.45 และ 0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาผสมกับสารละลายอะการ์ 2.2% ที่ถูกทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:9 (สารละลายเข้มข้น 10เท่า:สารละลายอะการ์) และให้อยู่ใน water bath อุณหภูมิ 60^{o}เซลเซียสขณะผสม จากนั้นใช้ปิเปทดูดมา 10 มิลลิลิตรใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

3. <u>การเตรียมยาต้านเชื้อรา</u> (Wu และคณะ, 1996)

ยาต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบ ได้แก่ นิสตาตินและ มิโคนาโซล โดยนำนิสตาตินมาละลายในสารละลายไดเมธิล ซัลฟอกไซด์ และเอธานอล (อัตราส่วน 3 ต่อ 2) ส่วนมิโคนาโซลนำมาละลายในเอ็น-ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC) คือ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้น นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1/4 และ 1/16 ของ MIC

4. <u>วิธีการเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัว</u>

เตรียมยีสต์อายุ 18 ชั่วโมงที่แขวนลอยในแซบูโร เด็กซ์โตรส บรอธ หรือยีสต์ ไนโตรเจน เบส ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^{6} เซลล์/มล. ด้วยการนับเซลล์โดยใช้สไลด์สำหรับนับเซลล์เม็ดเลือด แล้วใช้ไมโคร ปิเปท (micro pipette) หยดเชื้อที่แขวนลอยนี้ 5 ไมโครลิตรหนึ่งจุด (spot inoculate) บนโบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน อะการ์ แล้วนำมาเข้าตู้อบที่มีอากาศในกล่องที่มีความชื้น (humidified container) ที่อุณหภูมิ 37^{o}เซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของกลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการหยดเชื้อหนึ่งจุด โดยวัด 3 ทิศทางด้วยเวอร์เนีย มิเตอร์ หลังจากนั้นนำมาย้อมสีอะการ์ด้วยสารละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 0.25% ตามวิธีการในข้อ 5

5. <u>การย้อมสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์เพื่อตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัว</u>

นำอะการ์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*และอบในตู้อบเชื้อนาน 5 วัน มาย้อมด้วยสารละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 0.25% ซึ่งอยู่ในสารละลายเมธานอล 45% และกรดอะซิติก 9% โดยใส่สารละลายของสีลงในจานเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10 มล. และทิ้งไว้นาน 15 นาที จากนั้นเทสารละลายของสีออกจากจานเลี้ยงเชื้อ และล้างสีที่ติดอยู่กับอะการ์ด้วยสารละลายเมธานอล 25% และกรดอะซิติก 7% โดยเทให้ท่วมส่วนที่เป็นอะการ์ และเททิ้งทันที 2 ครั้ง จากนั้นก็เติมสารละลายดังกล่าวลงไปใหม่ ให้ท่วมส่วนที่เป็นอะการ์และปล่อยทิ้งไว้ โดยจะเปลี่ยนสารละลายนี้ทุกๆ 5 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่มีการย่อยสลายโปรตีน (zone proteolysis) ซึ่งจะเป็นวงใส โดยวัด 3 ทิศทางด้วยเวอร์เนีย มิเตอร์ และบันทึกผลไว้

6. <u>การทดสอบขั้นต้นและการประเมินประสิทธิภาพของสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ในการทดสอบการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัว</u>

ในกรณีที่ต้องการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการล้างสี จะล้างสีด้วยสารละลายเมธานอล 25% และกรดอะซิติก 7% ตามวิธีการในข้อ 5 เป็นเวลา 7 วัน โดยจะวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางซึ่งเป็นวงใสทุกๆ วัน และบันทึกผลเพื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางที่อาจแตกต่างกันไปในแต่ละวัน

ในกรณีที่ต้องการศึกษาความน่าเชื่อถือของการใช้สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ในการย้อมโบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน อะการ์เพื่อให้เห็นบริเวณการย่อยสลายโปรตีนชัดเจนขึ้น หลังจากเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 4 แล้ว จะวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อก่อนการย้อมสี โดยวางจานเลี้ยงเชื้อบนกระดาษสีดำและวัด 3 ทิศทางโดยใช้เวอร์เนีย มิเตอร์ และบันทึกผล หลังจากนั้นนำมาย้อมสีตามวิธีการในข้อ 5 เพื่อเปรียบเทียบกับขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางก่อนและหลังการล้างสี

ในกรณีที่ต้องการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน จะต้องเตรียมยีสต์อายุ 18 ชั่วโมงแขวนลอยในแซบูโร เด็กซ์โตรส บรอธ ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^6, 2×10^6, 4×10^6 และ 8×10^6 เซลล์/มล. นำเชื้อความเข้มข้นต่างๆ มาหยดลงบนอะการ์ และนำไปเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 4 จากนั้นจึงย้อมด้วยสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ตามวิธีการในข้อ 5

7. การวัดค่าความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน โดยทดสอบการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัว

ดัดแปลงจากวิธีการของ Wu และคณะ (1996) สรุปโดยย่อ คือ

หลังจากเลี้ยงเชื้อและย้อมสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ตามวิธีการในข้อ 4 และ 5 แล้ว ทำการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่มีการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นวงใส โดยวัด 3 ทิศทาง ด้วยเวอร์เนีย มิเตอร์ แล้วนำมาคำนวณหาค่าความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน (Pr_d value) ตามสูตร

$$Pr_d \text{ value} = D_Z / D_C$$

D_Z = เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่มีการย่อยสลายโปรตีน

D_C = เส้นผ่าศูนย์กลางของกลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการหยดเชื้อหนึ่งจุด

8. การศึกษาผลของยาต้านเชื้อราต่อความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน

(Wu และคณะ, 1996)

นำยีสต์อายุ 18 ชั่วโมงที่แขวนลอยในแซบูโร เด็กซ์โตรส บรอธหนึ่งลูปถ่ายใสหลอดอาหารเหลวที่มียีสต์ ไนโตรเจน เบส 6.7%, น้ำตาลกลูโคส 50 มิลลิโมล ซึ่งมียาต้านเชื้อรานิสตาตินหรือมิโคนาโซลความเข้มข้น 1/4 หรือ 1/16 ของ MIC ผสมอยู่ รวมทั้งถ่ายเชื้อใส่ในหลอดที่ไม่มียาต้านเชื้อราด้วยเพื่อเป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส ใน shaking water bath เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 1500×g เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลีน (0.1 โมลาร์, พีเอช 7.2) 10 มล. 2 ครั้ง และนำเชื้อมาแขวนลอยในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลีน ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์/มล. ด้วยการนับเซลล์โดยใช้สไลด์สำหรับนับเซลล์เม็ดเลือด หยดเชื้อลงบนอะการ์ และนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีการในข้อ 4 หลังจากนั้น นำมาย้อมสีตามวิธีการในข้อ 5 และคำนวณหาค่าความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนตามวิธีการในข้อ 7

9. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

9.1 สถิติ Paired t-test ใช้วิเคราะห์

- เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่มีการย่อยสลายของโปรตีนระหว่างก่อนการย้อมสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์และวันที่ 5 หลังการย้อมสี

- เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*ก่อนใช้ยาต้านเชื้อราระหว่างสภาวะที่เลี้ยงเชื้อในแซบูโร เด็กซ์โตรส บรอธ และสภาวะที่เลี้ยงเชื้อในยีสต์ไนโตรเจน เบส ภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน (ทั้งกลุ่มโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี)

- เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนระหว่างก่อนและหลังการใช้ยาต้านเชื้อรานิสตาตินและมิโคนาโซล ภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน (ทั้งกลุ่มโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี)

- เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปหลังใช้ยาต้านเชื้อรานิสตาตินและมิโคนาโซลระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของยาต้านเชื้อราชนิดเดียวกัน และระหว่างยาต่างชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน ภายในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม

9.2 สถิติ Unpaired t-test ใช้วิเคราะห์

- เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคนส์*ก่อนใช้ยาต้านเชื้อราระหว่างกลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

- เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปหลังใช้ยาต้านเชื้อรานิสตาตินและมิโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ระหว่างกลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

9.3 สถิติ One Way Analysis of Variance (One way ANOVA) ใช้วิเคราะห์

- เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่มีการย่อยสลายโปรตีนระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของเชื้อที่ได้จากตัวอย่างเดียวกัน

- เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนก่อนใช้ยาต้านเชื้อราระหว่างเชื้อที่แยกจากเพศหญิงและเพศชายทั้งในกลุ่มตัวอย่างและระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ภายในสภาวะที่เลี้ยงเชื้อในแซบูโร เด็กซ์โตรส บรอธ และยีสต์ ไนโตรเจน เบส