บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผู้ป่วยโรคข้ออักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อ GC ที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงปี พ.ศ. 2539 ถึง 2540 เป็นระยะเวลา 1 ปี

รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยเชิงพรรณนาแบบ cross-sectional descriptive study สำหรับวัตถุประสงค์หลัก เนื่องจากเป็นการวัดสัดส่วนของการตรวจพบและระดับของ proinflammatory cytokine ส่วนวัตถุประสงค์รอง ใช้การวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบ quasi - experimental design (before - after study)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

ประชากรเป้าหมาย คือ ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ไม่ใช่ GC

ประชากรตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ไม่ใช่ GC ที่มารับการรักษาที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เนื่องจาก ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ไม่ใช่ GC ทั้งหมด ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ผู้ป่วยในโรงพยาบาลจึงเป็นตัวแทนของผู้ป่วยทั้งหมดได้

คุณสมบัติของผู้ป่วยที่เข้าในการวิจัย (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยต้องมีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป ทั้งเพศหญิงและชาย และต้องมีครบ 3 ข้อ ต่อไปนี้

1. มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับ acute arthritis คือ มีอาการปวด บวม แดง ร้อน รอบข้อที่อักเสบ การขยับเคลื่อนไหวจะทำให้ปวดมากขึ้น และไม่สามารถเคลื่อนไหวข้อได้เป็นปกติ อาจมี อาการทั่วไปอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ไข้ ปวดเมื่อยตามตัว ตรวจร่างกายจะพบว่า มีลักษณะ บวม แดง ร้อนบริเวณข้อที่อักเสบ มีน้ำคั่งภายในข้อ เมื่อขยับเคลื่อนไหวข้อจะมีการติดขัด และอาการปวดมากขึ้น
2. ผลการเพาะเชื้อจากน้ำไขข้อ และ / หรือในเลือด พบเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่ GC
3. ผู้ป่วยยินยอมให้ ศึกษาโดยลงนามในใบยินยอมอนุญาตให้ทำการวิจัย

<u>คุณสมบัติของผู้ป่วยที่ไม่เข้าในการวิจัย</u> (Exclusion criteria)

1. มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับ acute arthritis แต่ตรวจน้ำไขข้อพบผลึก หรือ ผลการเพาะเชื้อไม่ขึ้น ไม่ว่าในน้ำไขข้อ หรือ ในเลือด
2. อายุน้อยกว่า 15 ปี
3. มีการอักเสบของข้อที่ไม่สามารถเจาะน้ำไขข้อมาตรวจซ้ำได้ เนื่องจากเป็นข้อเล็ก มีน้ำน้อย ได้แก่ ข้อนิ้วมือ นิ้วเท้า, ข้อ sacroiliac, ข้อ sternoclavicular หรือข้อที่มีการอักเสบแล้วต้องได้รับการผ่าตัดระบายน้ำไขข้อทันที เพื่อป้องกันผลแทรกซ้อน ได้แก่ ข้อตะโพก และข้อไหล่
4. ผู้ป่วยไม่ยินยอมให้ทำการศึกษาวิจัย

<u>การคัดเลือกตัวอย่าง</u>

ศึกษาผู้ป่วยทุกรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นข้ออักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งได้มารับการรักษาที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาฯ

<u>ขนาดตัวอย่าง</u> (Sample size)

$$n = Z^2_{\alpha}\, pq / d^2$$

P = สัดส่วนของการพบ proinflammatory cytokine ในน้ำไขข้อผู้ป่วยข้ออักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาก่อนหน้านี้ [21] พบว่า สัดส่วนของการตรวจพบ proinflammtory cytokine ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย มีค่าเท่ากับร้อยละ 94 ดังนั้น ค่า p = 0.94

$$n = \frac{(1.96)^2(0.94)(0.06)}{(0.1)^2} = 21.6$$

ดังนั้น ขนาดตัวอย่างที่มาศึกษาควรใช้อย่างน้อย 22 คน (อาจเพิ่มอีกร้อยละ 10 เพื่อป้องกันข้อมูลสูญหาย)

<u>การรวบรวมข้อมูล</u> (Data collection)

ผู้ทำวิจัยได้ขอความร่วมมือจาก แพทย์ประจำบ้านแผนกอายุรศาสตร์ ที่ประจำห้องฉุกเฉิน, คลินิกผู้ป่วยนอก ตึกภ.ป.ร. และที่หอผู้ป่วยของภาควิชาอายุรศาสตร์ ให้แจ้งแก่ผู้ทำวิจัย เมื่อมีผู้ป่วยใหม่ที่มีคุณสมบัติเข้าในการวิจัย มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาฯ ผู้ทำวิจัยจะไปพบผู้ป่วย และเมื่อผู้ป่วยเซ็นใบยินยอมอนุญาตให้ทำการวิจัยแล้ว ก็จะซักประวัติและตรวจร่างกายผู้ป่วย ผู้ทำวิจัยจะบันทึกข้อมูลที่ได้ลงในแบบฟอร์มรายละเอียดเกี่ยวกับผู้ป่วยด้วยตนเอง (รายละเอียดของแบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วยข้ออักเสบ อยู่ในภาคผนวก)

ขั้นตอนในการเก็บรวบรวมข้อมุลเกี่ยวกับผู้ป่วยโดยละเอียด ได้แสดงในหัวข้อ **วิธีดำเนินการวิจัย**

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ผู้ป่วยข้ออักเสบเฉียบพลันทุกรายที่สงสัยว่าสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่ GC เมื่อได้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาฯแล้วจะได้รับ

- การซักประวัติทั่วไป เพื่อหาข้อมูลพื้นฐาน : อายุ เพศ อาชีพ ภูมิลำเนา
- การซักประวัติ ตรวจร่างกายอย่างละเอียดเพิ่มเติม เพื่อหาแหล่งของการติดเชื้อ โรคเดิม หรือโรคร่วม ยาที่ใช้เป็นประจำ
- การเจาะข้อที่อักเสบ เพื่อเอาน้ำจากข้อไปตรวจหา : จำนวน WBC และ differential count
  ย้อมสีแกรมเพื่อหาเชื้อ
  ส่งเพาะเชื้อ พร้อมกับ hemoculture

น้ำไขข้อส่วนหนึ่ง (ประมาณ 1 ml. ขึ้นไป) จะนำไปตรวจหา cytokine ต่อไป

2. ผู้ป่วยจะได้รับยาปฏิชีวนะทางหลอดเลือดที่เหมาะสมตามผลการย้อมสีแกรมและเจาะข้อซ้ำ เพื่อลดการอักเสบ ถ้าไม่พบเชื้อจากการย้อมสีแกรม จะได้รับ Cloxacillin 6 gramต่อวัน ทางหลอดเลือดเพื่อครอบคลุมเชื้อ *S. aureus* ไปก่อน

3. ที่ 24 ชั่วโมง, 72 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากเริ่มให้การรักษา จะเจาะข้อที่อักเสบซ้ำเพื่อตรวจหาดังข้อ 1

4. เฝ้าสังเกตอาการทางคลินิกว่าอาการข้ออักเสบดีขึ้นอย่างไร โดยผู้ทำวิจัย และลงผลในแบบฟอร์ม

5. ตามผลการเพาะเชื้อ จากน้ำไขข้อและในเลือด และดูผล sensitivity อาจเปลี่ยนยาปฏิชีวนะตามผล sensitivity

6. ผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาต้องพิจารณาผ่าตัดระบายน้ำไขข้อที่อักเสบ จะใช้ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ จึงไม่เป็นอุปสรรคในการเก็บ specimen ไปตรวจ

การตรวจหา proinflammatory cytokines

นำน้ำไขข้อมาปั่นที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เอา supernatant แยกมาใส่ 2 tubes โดยใส่tube ละ 1 ml. แล้วเก็บไว้ที่ -70°C ทันทีที่แยก supernatant ออกมา หรือ ภายในเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมงหลังจากเจาะข้อ โดยเก็บไว้ที่ -20°C ก่อน นำน้ำที่ปั่นแยกแล้วมาตรวจหา IL-1, IL-6 และ TNF-α โดยวิธี ELISA (monoclonal antibody ต่อ IL-1β และ TNF-α รวมทั้ง reagent อื่นๆ ตลอดจนวิธีการทำ ELISA ได้รับการสนับสนุนจาก Cellular Technology Institute, Otsuka Pharmaceutical Ltd.Co., Japan ส่วนการตรวจหา IL-6 ใช้ ELISA commercial kit ของบริษัท INCSTAR Corp., USA)

วิธีการตรวจหา IL-1β และ TNF-α โดยวิธี ELISA ตาม protocol ของ Otsuka

Primary monoclonal Ab

1. เจือจาง IL-1β moAb หรือ TNF-α moAb ด้วย coating buffer (PBS, 0.05%thimerosal) ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 μg/ml แล้วใส่ใน plate ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 μl
2. ครอบ plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง หรือเก็บที่ 4°C ไว้ข้ามคืน
3. ล้าง plate ด้วย washing buffer (NaCl, Tween-20) 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้ใส่ washing buffer เต็มหลุมและทิ้งไว้นาน 1 นาที ก่อนดูดหรือเทออก คว่ำ plate บนผ้าหรือกระดาษเพื่อซับน้ำที่เกินหลังจากล้างเสร็จ

Blocking

4. block ด้วย blocking buffer (PBS, 0.05%thimerosal, 0.1%BSA, phenol red) โดยใส่หลุมละ 400 μl

5. ครอบ plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง

6. ล้าง plate 2 ครั้ง ด้วย washing buffer

Samples

7. ใส่ first buffer (IL-1β หรือ TNF-α) ปริมาณ 100 μl ในหลุม ก่อนใส่ตัวอย่างน้ำไขข้อ และ standard

8. เจือจาง standard (IL-1β หรือ TNF-α) ด้วย dilution buffer (PBS, 0.05%thimerosal, 0.1%BSA, phenol red, 0.05%Tween-20) ให้มีความเข้มข้นเป็น 5000 pg/ml, 1666 pg/ml, 555 pg/ml, 185 pg/ml, 61pg/ml, 20 pg/ml, 6 pg/ml และ 0 pg/ml

9. เติมตัวอย่างน้ำไขข้อ และ standard (IL-1β หรือ TNF-α) หลุมละ 100 μl

10. ครอบ plate และ incubate ข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง

11. ล้าง plate อีก 3 ครั้ง ด้วย washing buffer

Secondary Ab ให้ทำตามขั้นตอนนี้เฉพาะการตรวจหา TNF-α สำหรับ IL-1β ให้ข้ามไปที่ conjugate

12. เติม secondary Ab (IL-1β) หลุมละ 100 μl

13. ครอบ plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง

14. ล้าง plate 5 ครั้ง ด้วย washing buffer

Conjugate

15. เจือจาง conjugate (IL-1β หรือ TNF-α) ด้วย dilution buffer เป็น 100 เท่า แล้วใส่หลุมละ 100 μl

16. ครอบ plate และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง

17. ล้าง plate อีก 5 ครั้ง ด้วย washing buffer

Substrate

18. ละลาย OPD tablet (เม็ดละ 10 mg) ใน OPD buffer (citric acid monohydrate, Na_2HPO_4 - 12 H_2O, 30% H_2O_2) ปริมาณ 10 ml ใส่สารละลายหลุมละ 100 μl และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-20 นาที

19. เติม stop solution (2N H_2SO_4) หลุมละ 100 μl

20. อ่าน plate ที่ OD 492 nm

Calculate

21. คำนวณค่า OD ของตัวอย่างน้ำไขข้อจาก standard โดยใช้โปรแกรม Delta Soft (McIntosh) จะได้ปริมาณของ cytokine แต่ละชนิด มีหน่วยเป็น pg/ml

ส่วนวิธีการตรวจหา IL-6 กระทำตามคู่มือการตรวจหาโดยวิธี ELISA ที่มีชื่อทางการค้าว่า INTERLEUKIN-6 EASIA™ ซึ่งเป็น microtiter plate ที่ coat ด้วย anti-IL-6 moAb สำเร็จรูป

ความไวในการตรวจหา cytokine แต่ละชนิดด้วยวิธี ELISA

IL-1β	ค่าต่ำสุดที่วัดได้ คือ	6 pg/ml
IL-6	ค่าต่ำสุดที่วัดได้ คือ	3 pg/ml
TNF-α	ค่าต่ำสุดที่วัดได้ คือ	20 pg/ml

ตารางการปฏิบัติงาน

เตรียมโครงการ	มกราคม - กุมภาพันธ์ 2539
เสนอโครงร่าง	มีนาคม 2539
เก็บรวบรวมข้อมูล	มีนาคม 2539 - กุมภาพันธ์ 2540
วิเคราะห์ข้อมูล	มีนาคม - เมษายน 2540
นำเสนอ	พฤษภาคม 2540

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงคุณภาพ	ใช้สถิติเป็น	ร้อยละ (%)
		สัดส่วน (proportion)
		Chi-square test
ข้อมูลเชิงปริมาณ	ใช้สถิติเป็น	ค่าเฉลี่ย (mean)
		standard error of mean (SEM.)
		ค่ามัธยฐาน (median)
		Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test
		Mann Whitney U test
		Correlations
		Univariate analysis ที่ 0,24,72 ชั่วโมง และที่ 1 สัปดาห์

การนำเสนอข้อมูล

ตาราง แผนภูมิ กราฟเส้น

ปัญหาด้านจริยธรรม

แม้ว่าการเจาะข้อซ้ำๆ เพื่อระบายน้ำไขข้อที่อักเสบเป็นการรักษามาตรฐานของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบ จากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่ GC และมีการตรวจน้ำไขข้อเพื่อดูจำนวนเม็ดเลือดขาว ย้อมสีแกรมหาเชื้อ และส่งเพาะเชื้อเป็นประจำอยู่แล้ว การศึกษานี้เป็นการนำน้ำไขข้อมาตรวจเพิ่มเติมจากการตรวจประจำเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยจะได้รับการบอกกล่าวถึงการศึกษาวิจัยนี้ และให้ลงนามยินยอมก่อนทำการศึกษาทุกราย

งบประมาณ

ค่าใช้จ่ายต่อการตรวจหาระดับ cytokine ประมาณ 500 - 600 บาทต่อครั้ง ต่อ cytokine 1 ชนิด ดังนั้น ค่าใช้จ่ายทั้งหมดของเครื่องมือในการตรวจจะตกประมาณ 6,000 - 7,000 บาท ต่อผู้ป่วย 1 ราย ซึ่งยังไม่รวมค่าใช้จ่ายอื่นๆ แต่ทางภาควิชาอายุรศาสตร์ ได้สนับสนุนค่าวัสดุส่วนหนึ่งที่ใช้ในการวิจัย และหน่วยวิทยาอิมมูนและภูมิแพ้ได้รับการสนับสนุนเครื่องมือในการตรวจหาระดับ cytokine จากประเทศญี่ปุ่นโดยไม่คิดมูลค่า ทำให้ค่าใช้จ่ายต่อผู้ป่วย 1 ราย ลดลงไปมาก อย่างไรก็ตาม หน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม มีงบให้ใช้จ่ายในการวิจัยนี้ประมาณ 15,000 บาท