บทที่ 6

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ประชากรและตัวอย่าง

1.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือก

การวินิจฉัยว่าเป็น Recurrent herpes simplex โดยอาศัยประวัติและการตรวจร่างกายดังต่อไปนี้

1.1.1 ประวัติ

ตุ่มน้ำใสขึ้นเป็นกลุ่ม แตกง่ายแล้วตกสะเก็ด มักเป็นซ้ำบริเวณเดิม มีอาการคัน แสบๆคันๆ หรือปวดเล็กน้อย อาจมีปัจจัยส่งเสริมให้เกิด เช่น การติดเชื้อ อดนอน แสงแดด เป็นต้น

1.1.2 ตรวจร่างกาย

พบเป็นตุ่มน้ำใสเป็นกลุ่ม เป็นตุ่มหนอง หรือแตกเป็นแผลตื้นๆ ตกสะเก็ดที่บริเวณปากและอวัยวะสืบพันธุ์

1.1.3 การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยการวินิจฉัยโรค

1.1.3.1 Tzanck test เป็นการตรวจดูเซลล์จากตุ่มน้ำ หรือตุ่มหนอง หรือก้นแผล ลักษณะเซลล์ที่ตรวจพบจะช่วยวินิจฉัยโรค

วิธีการตรวจ

เลือกตุ่มน้ำพองลักษณะและอายุที่เหมาะสม คือ ตุ่มใหม่ๆ อายุไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง ทำความสะอาดผิวหนังของตุ่มน้ำพอง และบริเวณรอบๆด้วยแอลกอฮอล์ 70% ใช้ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 23 เปิดผิวหนังที่ปกคลุมตุ่มน้ำพองออก ขูดที่พื้นของแผลเบาๆ อย่าให้เลือดออก ป้ายน้ำเหลืองและเซลล์ที่ได้ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง หรืออาจเร่งให้แห้งโดยผ่านไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ นำสไลด์ที่แห้งดีแล้วไปย้อมสี Wright หรือ Giemsa ถ้าต้องการดูทันทีให้หยด Methylene blue ผสมกับน้ำเหลืองที่ได้จากตุ่มน้ำพอง แล้วปิด cover slip นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ ผลการตรวจพบใน Herpes simplex จะพบ Multinucleated giant cell ร่วมกับ Neutrophil และ mononuclear cell การพบ multinucleated giant cell เป็นลักษณะเฉพาะของโรคติด

เชื้อไวรัส ทั้งใน Herpes simplex, Herpes zosterและ Varicella

1.1.3.2 **Viral culture** เป็นการตรวจหาตัวไวรัสจากตุ่มน้ำหรือตุ่มพอง หรือก้นแผล

วิธีการตรวจ

เลือกตุ่มน้ำพองใหม่ๆ ทำความสะอาดบริเวณตุ่มน้ำพองและบริเวณรอบๆด้วยแอลกอฮอล์ 70% ใช้ใบมีดผ่าตัดเปิดผิวหนังที่ปกคลุมตุ่มน้ำพองออก ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วป้ายที่พื้นของแผล แล้วใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุ Transport mediaนำหลอดทดลองใส่กระติกน้ำแข็ง แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการทันที เพื่อเก็บเชื้อไว้ที่ -70°C. การเพาะเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา รพ.จุฬาลงกรณ์ เริ่มจากการนำ specimen มาละลายและปั่นตะกอน cell หรือสิ่งแปลกปลอมออก โดยใช้แรงเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาทีที่ 4°C. เก็บน้ำใสที่ได้และนำมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Shell vial cell culture (SVC) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ Vero ในหลอดที่มีก้นแบนและสามารถใส่ cover slip ลงในก้นหลอดได้ เซลล์เจริญบนแผ่น cover slip เป็น Monolayer เป็นเวลา 3 วัน ใส่เชื้อไวรัสลงในหลอด 0.2 cc. ปั่นที่แรงเหวี่ยง 2,500 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมงที่ 26°C. เท Inoculum ทิ้ง เติม media ใหม่ 1 cc. แล้วเก็บที่ 37°C. นาน 18 ชั่วโมง นำ cover slip มาล้างด้วย PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.4) 2 ครั้งทิ้งให้แห้ง นำไปแช่ใน acetone ที่ 20°C. นาน 10 นาที แล้วนำมาทดสอบหาไวรัสในเซลล์โดยวิธี Indirect Immunofluorescence assay โดยการนำ cover slip มาทิ้งให้แห้ง เติม Rabbit anti HSV-1 ลงบน cover slip เก็บที่ 37°C. ในภาชนะที่มีความชื้นนาน 30 นาทีล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม Swine anti rabbit-FITC ทำปฏิกิริยา 30 นาที ล้างแล้วจิง counterstain ด้วย Evans blue 1:30,000 5 นาที ล้างน้ำ 1 นาที หยด Glycerol-PBS buffer คว่ำปิดบนแผ่น slide นำไปดูภายใต้กล้อง Fluorescence จะสังเกตเห็นเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสเรืองแสงสีเขียว

1.1.3.3 **Viral typing** เป็นการตรวจแยกชนิดของ HSV โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป Elisa-kit ของบริษัท Hoechst จากสิ่งส่งตรวจแหล่งเดียวกับการเพาะเชื้อ

หลักการโดยสังเขป

เตรียมสิ่งส่งตรวจโดยการนำออกจากตู้แช่แข็ง และละลายให้มี

อุณหภูมิ +18 ถึง +25 องศาเซลเซียส ใส่ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจลงในหลุมด้านซ้ายและขวาซึ่งมี antibodies ต่อ HSV เคลือบอยู่บนก้นหลุม หลุมละ 75 ไมโครลิตรและเติม diluent หลุมละ 75 ไมโครลิตร ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้งๆละ 1-2 นาทีด้วย washing solution สำเร็จรูป เติม conjugate ซึ่งมี anti-HSV-1+2 จับกับ enzyme ลงในหลุมซ้ายและ conjugate ซึ่งมี anti-HSV-1 จับกับ enzyme ลงในหลุมขวาหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที ล้างและเติม substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืดอุณหภูมิ +18 ถึง +25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม stopping solution (0,5 N.sulfuric acid) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ enzyme ไวรัสจะถูกแยกชนิดโดยการเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลุมซ้ายและขวา นำผลที่ได้ไปอ่านด้วย photometer ที่ 450 นาโนเมตร การแยกชนิดของไวรัส ตัดสินจากผลหารระหว่างค่าที่อ่านได้จากหลุมซ้ายกับหลุมขวา ถ้ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 ได้ผลเป็น HSV-2 และถ้าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 อ่านผลเป็น HSV-1 และถ้าได้ค่าอยู่ระหว่าง 2 กับ 5 ไม่สามารถแยกชนิดได้

1.2 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วย Recurrent herpes simplex ที่บริเวณปากและอวัยวะเพศที่มาตรวจในรพ.จุฬาลงกรณ์ ซึ่งไม่มีโรคหรือรับประทานยาที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติไปจำนวน 24 คน

1.3 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา

1. Viral culture ให้ผลบวก
2. เป็นไม่เกิน 72 ชั่วโมง
3. เป็น recurrent herpes simplex ที่บริเวณปากหรืออวัยวะสืบพันธุ์
4. มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ
5. สามารถมาติดตามการรักษาตามกำหนดได้

1.4 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา

1. ผู้ป่วยที่มีปัญหาทางสุขภาพ เช่น เป็นโรคหรือได้รับยาซึ่งกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย มะเร็ง ขาดอาหารขั้นรุนแรง เป็นต้น
2. มีผลข้างเคียงจากยา

2. **เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง** โดยวิธี Stratified randomization with block of four

Stratified sampling โดยการแบ่งประชากรออกเป็นกลุ่มตามเกณฑ์ดังนี้

1. อายุ < 60ปี
2. เพศ ชาย,หญิง
3. ตำแหน่งของแผล Orolabial, Genital

Random ผู้ป่วยเพื่อเข้ารับการรักษาด้วย ZMG หรือ Placebo โดยการสร้างblock of four กำหนดให้ ZMG หรือ Placebo เป็น A หรือ B (แล้วแต่กำหนดโดยบุคคลอื่นเพื่อให้การศึกษาเป็น double blind study)

จาก block of four จะได้ลำดับในการรักษา = $\frac{4!}{2!2!}$ = 6 แบบ

คือ AABB
ABAB
ABBA
BBAA
BABA
BAAB

เลือกแต่ละ block มาตามลำดับ โดย simple random ดังตัวอย่าง

อายุ<60ปี เพศ
- หญิง - ตำแหน่งแผล
  - ปาก AABB,BBAA,ABAB,BAAB, ABBA,BABA
  - อวัยวะเพศ BAAB,BBAA,BABA, AABB,ABBA,AABB
- ชาย - ตำแหน่งแผล
  - ปาก ABAB,AABB,BAAB,ABBA, BBAA, BABA
  - อวัยวะเพศ BBAA,ABAB,BABA, AABB,BAAB,ABBA

3. คำนวนขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากการทดลองในคนโดยใช้ ZMG รักษา Recurrent herpes simplex โดยใช้ตัววัดเป็นเวลาในการหายของแผล (Healing time) ยังไม่มีการศึกษามาก่อนจึงได้ทำ Pilot study 8 คน ได้ผลเป็นเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการหายของแผลและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนี้

ค่าเฉลี่ยของ ZMG = 6.25 วัน, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 1.892 (S1)
ค่าเฉลี่ยของยาหลอก = 8.5 วัน, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 1.913 (S2)

$$\text{ขนาดตัวอย่าง} = n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \times 2 \times Sp^2}{D^2}$$

$$Sp^2 = \text{Total varience} = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (N_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}$$

$S_1 = 1.892$

$S_2 = 1.913$

$$Sp^2 = \frac{(3)(1.892)^2 + (3)(1.913)^2}{6}$$

$= 3.6245$

D = ผลต่างของค่าเฉลี่ยที่ทดสอบ

$= 8.5 - 6.25$

$= 2.25$

กำหนดให้ $\alpha = 0.05$ $\quad Z\alpha = 1.64$

$= 0.01$ $\quad Z\beta = 1.28$

$$n = \frac{(1.64 + 1.28)^2 \times 2 \times 3.6245}{2.25^2}$$

$$= \frac{17.05 \times 3.6245}{2.25^2}$$

$= 12.208$

จะได้ตัวอย่างกลุ่มละ 12 คน

4. การสังเกตุและการวัด

4.1 ตัวแปรในการวิจัย

Healing time

Viral shedding time

4.2 นิยามเชิงปฏิบัติการ

Healing time หมายถึง จำนวนวัน นับตั้งแต่เริ่มรับการรักษา จนถึงวันที่แผลหาย

Viral shedding time หมายถึง จำนวนวันที่สามารถ culture ไวรัสจากแผลได้ผลบวก โดยที่ specimen

สำหรับการ culture คือ

ตุ่มน้ำใส - ใช้น้ำ(vesicle fluid)

แผล - ใช้ป้ายจากก้นแผล

Wet crust - เอาสะเก็ดออกและป้ายจากก้นแผล

5. ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย

5.1 ผู้วิจัยชี้แจงวัตถุประสงค์ วิธีการ ประโยชน์ที่ได้รับ อันตรายที่อาจเกิดขึ้นแก่ผู้ ป่วย

5.2 ผู้ป่วยเซ็นยินยอมเข้ารับการรักษา และสามารถถอนตัวจากการวิจัยเมื่อใดก็ได้

5.3 ซักประวัติและตรวจร่างกายทั่วไปอย่างละเอียด

5.4 นับจำนวนแผล ตามลักษณะแผลต่างๆ เช่น

Erythema

Vesicle

Pustule

Ulcer

Crusted

Healed

5.5 วัดบริเวณของแผล ประมาณโดยการคูณเส้นผ่าศูนย์กลางที่แคบที่สุดและกว้างที่ สุดของแผล ถ้ามีแผลหลายกลุ่ม ให้นำบริเวณแผลแต่ละกลุ่มมารวมกัน

5.6 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

5.6.1 ระดับ zinc ในเลือด (Serum zinc level) ก่อนและหลังการรักษา

5.6.2 Tzanck test ในวันแรก

5.6.3 Viral culture ทุกวันจนแผลตกสะเก็ด(dry crust)

5.7 ทา ZMG ในรูปผงสีขาว หรือยาหลอก (talcum) ที่แผล 4 ครั้ง ต่อวัน จนกระทั่งแผลหาย

5.8 นัดติดตามการรักษา

5.8.1 ผู้ป่วยต้องมาทุกวันจนกว่าแผลตกสะเก็ด (dry crust) หลังจากนั้นมาทุก 3 วันจนกระทั่งแผลหาย

5.8.2 ติดตามจำนวนแผลตามลักษณะต่างๆข้างต้น และจำนวนแผลที่ขึ้นใหม่

6. วิเคราะห์ข้อมูล

คำนวน Healing time และ viral shedding time เป็น mean และ standard deviation ทดสอบความสำคัญทางสถิติโดยใช้ Wilcoxon sign rank test