

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

4.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

4.2.1 ประชากร(Population)

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลัน (acute fever) ที่สงสัยว่าเป็นไข้เลือดออก

ประชากรตัวอย่าง (Sample Population)

ผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลัน (acute fever) ในภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่สงสัยว่าเป็นไข้เลือดออก

4.2.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยที่จะเข้าสู่การวิจัยต้องมีคุณสมบัติครบทุกข้อดังต่อไปนี้

- มีอายุมากกว่า 15 ปี
- มีไข้ไม่เกิน 7 วัน
- ไม่พบสาเหตุของการติดเชื้อ (source of infection) ที่แน่นอนจากอาการ อาการแสดงและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ร่วมกับมีอาการ และ/หรือ อาการแสดงอย่างน้อย 2 ข้อ ดังต่อไปนี้
 1. คลื่นไส้ และ/หรือ อาเจียน และ/หรือ ถ่ายเหลว
 2. ปวดท้อง และ/หรือ ตรวจพบการกดเจ็บที่ท้องด้านขวาบน และ/หรือ บริเวณลิ้นปี่
 3. ตับโต หรือโตขึ้นกว่าเดิมในกรณีที่มีหลักฐานว่าตับโตอยู่แล้ว
 4. ปวดเมื่อยตามร่างกาย
 5. ผื่นที่ไม่ใช่จุดเลือดออก (non-petechial rash)

6. เลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ เอง (spontaneous hemorrhagic manifestations) เช่น ผื่น petechiae ที่ผิวหนัง, เลือดกำเดาออก, เลือดออกตามไรฟันหรือเหงือก, อาเจียนเป็นเลือด, ถ่ายเป็นเลือด, ถ่ายดำ (melena), เลือดออกจากช่องคลอด และ/หรือ การทดสอบทูนิเกตีได้ผลบวก
7. ความดันโลหิตต่ำ หรือ อยู่ในภาวะช็อค (systolic BP \leq 90 มม.ปรอท หรือ ลดลง \geq 40 มม.ปรอท จากค่าปกติ)

4.2.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการวิจัย (Exclusion Criteria)

ผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติอย่างน้อย 1 ข้อดังต่อไปนี้จะถูกตัดออกจากการวิจัย

- ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมให้ความร่วมมือในการวิจัย
- มีแผลในปาก
- มีเลือดออกในปาก
- มีโรคเลือดออกง่าย
- มีหลักฐานว่ามีเม็ดเลือดขาว หรือ เกร็ดเลือด ต่ำอยู่แล้ว เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว, หลังได้รับเคมีบำบัด, ติดเชื้อ HIV ที่มีการติดเชื้อฉวยโอกาสในไขกระดูก เป็นต้น
- ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive agents)
- ได้รับยาประเภท corticosteroids
- ผู้ป่วยที่ทราบก่อนล่วงหน้าว่าไม่สามารถมาตรวจตามนัดได้

4.2.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample Size Determination)

$$N = (Z^2 pq/d^2)/\text{incidence}$$

Z = ค่า Z จากตารางแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%
= 1.96 (two-tailed)

d = ค่าความคลาดเคลื่อน 15%
= 0.15

p = sensitivity
= 0.60

q = 1-p
= 0.40

incidence = 0.6 (60%)

N = 68

เพิ่มจำนวนผู้ป่วยที่อาจถอนตัวจากการศึกษา 10%

ดังนั้นประชากรที่ต้องนำมาศึกษา = 75 คน

4.2.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง (Sample Techniques)

ผู้ป่วยทุกรายที่มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ (Consecutive cases)

4.3 วิธีและขั้นตอนการทำวิจัย (Study Methods)

- ทถามประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจทางห้องปฏิบัติการ และรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ตามแบบบันทึกข้อมูล
- อธิบายให้ผู้ป่วย และ/หรือ ญาติเข้าใจถึงวัตถุประสงค์และรายละเอียดของวิธีการทำวิจัยใน ส่วนที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยจนเข้าใจดีแล้ว จึงให้ผู้ป่วยหรือญาติลงนามในใบยินยอมผู้เข้ารับการ ศึกษา (informed consent)
- เก็บ EDTA blood 5 ลบ.มม. ในวันแรกที่เข้านอนในโรงพยาบาล วันที่เสียชีวิตหรือจำหน่าย ออกจากโรงพยาบาล และ 7-14 วันนับจากวันที่เข้านอนในโรงพยาบาล
- เก็บน้ำลาย 2 ลบ.มม. ใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อ โดยให้ผู้ป่วยบ้วนเอง หรือใช้เครื่องดูด เสมหะในกรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถบ้วนน้ำลายเองได้ โดยเก็บทุกวันตั้งแต่วันที่เข้านอน ในโรงพยาบาล จนถึงวันที่ไข้ลงหรือเสียชีวิต
- เก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มใส่หลอดพลาสติกที่มีสารละลาย buffer 20 ลบ.มม. โดย เจ้าของโครงการวิจัย ใช้แปรงสีฟันถูเบา ๆ ที่กระพุ้งแก้มทั้งสองข้าง ข้างละ 5 ครั้ง แล้วจุ่ม ลงในสารละลาย buffer ทันที ได้ โดยเก็บทุกวันตั้งแต่วันที่เข้านอนในโรงพยาบาล จนถึงวันที่ไข้ลงหรือเสียชีวิต
- สิ่งส่งตรวจทุกชนิดจะถูกนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่สามารถส่งถึง ห้องปฏิบัติการได้ภายในเวลาดังกล่าว เช่น วันหยุดราชการ จะแช่สิ่งส่งตรวจไว้ในตู้เย็น
- สิ่งส่งตรวจจะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมเพื่อทำ RT-PCR และตรวจหา dengue antibody ด้วยวิธี ELISA ในวันเดียวกัน หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในกรณีที่ยังไม่ได้ทำ การตรวจในวันนั้น

- ผู้ป่วยอาจถูกส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ตามแต่แพทย์เจ้าของผู้ป่วยเห็นสมควร
- ตัวอย่างหรือสารพันธุกรรมที่เหลือจากการศึกษาจะถูกเก็บไว้เป็นเวลา 5 ปี เพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต หรือเพื่อทำการตรวจซ้ำเพื่อยืนยันในกรณีที่เกิดการตรวจมีความขัดแย้ง
- ในกรณีที่ผล PCR ของสิ่งส่งตรวจชนิดเดียวกันของแต่ละวันมีความขัดแย้งกัน จะมีการทบทวนผลทางห้องปฏิบัติการสำหรับวันนั้น ๆ และอาจนำสารพันธุกรรมที่สกัดไว้ซึ่งยังเหลืออยู่มาทำการตรวจซ้ำเพื่อยืนยันความถูกต้อง

4.4 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

การวัดผล (Outcome) คือ ผล RT-PCR ของ dengue virus โดยเทียบกับวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี คือ การหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA

4.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลทั้งหมด ประวัติ ผลการตรวจร่างกาย ผลทางห้องปฏิบัติการต่างๆ จะได้รับการลงบันทึกในแบบเก็บข้อมูลของผู้ป่วย โดยผู้ทำการวิจัยเป็นผู้รวบรวม

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. ตัวแปรที่มีค่าต่อเนื่องจะถูกนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธีทางสถิติ independent *t*-test โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows รุ่น 13.0
2. คำนวณหาความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), positive predictive value, negative predictive value ของวิธี RT-PCR ของเชื้อไวรัสเดงกีจากน้ำลายโดยรวม และแยกกันของแต่ละวันที่เก็บสิ่งส่งตรวจ

3. คำนวณหาความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), positive predictive value, negative predictive value ของวิธี RT-PCR ของเชื้อไวรัสเดงกีจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม โดยรวม และแยกกันของแต่ละวันที่เก็บสิ่งส่งตรวจ

4.7 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

1. ผู้ป่วยมีความจำเป็นต้องใช้ปริมาณเลือดเพิ่มขึ้นประมาณ 20 ลบ.มม. ซึ่งไม่มีผลเสียต่อสุขภาพของผู้ป่วย สำหรับส่งไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจยืนยันการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยวิธี ELISA
2. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีส่วนใหญ่จะมีภาวะแห้งน้ำอยู่แล้ว จากไข้ที่สูงลอย และบางรายอาจมีอาการคลื่นไส้อาเจียน เบื่ออาหาร ต้องได้รับความยากลำบากในการเก็บน้ำลายปริมาณ 1-2 ลบ.มม.

4.8 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

การแช่สิ่งส่งตรวจไว้ในตู้เย็น ในกรณีที่ไม่สามารถส่งสิ่งส่งตรวจถึงห้องปฏิบัติการภายใน 4-6 ชั่วโมง เช่น วันหยุดราชการนั้น อาจทำให้ผลการทำ RT-PCR เป็นผลลบปลอม (false negative) มากขึ้น จากการสลายตัวของ RNA ของเชื้อไวรัสเดงกี เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสิ่งส่งตรวจขึ้นลงหลายครั้งก่อนที่สิ่งส่งตรวจจะไปถึงห้องปฏิบัติการ เพื่อสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (viral RNA extraction)

4.9 อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

อุปสรรค

ผู้ป่วยไม่มาตรวจติดตามภายหลังจากจำหน่ายออกจากโรงพยาบาลแล้ว ทำให้ไม่มี paired serum ในการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA ทำให้ไม่ทราบการวินิจฉัยที่แน่นอน ในกรณีที่ผลการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีจากซีรัมแรกยังไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี

มาตรการในการแก้ไข

1. โทรศัพท์เตือนผู้ป่วยหรือญาติของผู้ป่วยก่อนถึงวันนัด 1 วัน
2. ถ้าผู้ป่วยไม่มาตามนัด อาจแปลผลโดยใช้ paired serum ในวันที่จำหน่ายผู้ป่วยออกจากโรงพยาบาลแทน ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของ antibody titer มากกว่า 4 เท่าแล้ว

4.10 การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time Schedule)

การดำเนินงาน	2547			2548												2549			
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
1. ศึกษาและเตรียมงาน	*	*	*																
2. รวบรวมข้อมูลและทดสอบทางห้องปฏิบัติการ		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
3. วิเคราะห์ข้อมูล														*	*	*	*		
4. สรุปและเขียนรายงาน																*	*	*	
5. รายงานผล																			*

4.11 งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)

หมวดค่าใช้สอย

ค่าตรวจเลือดด้วยวิธี ELISA

200 บาท x 2 ครั้ง x 75 คน 30,000 บาท

ค่าตรวจน้ำลายและเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยวิธี RT-PCR

400 บาท x 2 specimens x 2 ครั้ง x 75 คน 120,000 บาท

หมวดค่าวัสดุ

หลอดแก้ว EDTA สำหรับใส่เลือด

4 บาท x 3 หลอด x 75 คน 900 บาท

เข็มเจาะเลือดเบอร์ 22

1 บาท x 3 อัน x 75 คน 225 บาท

ขวดแก้ว sterile สำหรับเก็บน้ำลาย

1 บาท x 4 ขวด x 75 คน 300 บาท

น้ำยา buffer สำหรับเก็บเซลล์กระพุงแก้ม

5 บาท x 4 หลอด x 75 คน 1,500 บาท

หลอดพลาสติกสำหรับใส่น้ำยา buffer

5 บาท x 4 หลอด x 75 คน 1,500 บาท

แปรงสีฟัน

10 บาท x 75 คน 750 บาท

ค่าเอกสาร

500 บาท

หมวดเบ็ดเตล็ด

500 บาท

รวม

156,175 บาท



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย