

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดใดจุดหนึ่ง (Cross-sectional descriptive study)

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

3.1 ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ที่เข้ารับการตรวจรักษาในโรงพยาบาล ในฝ่ายกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ช่วงเดือน กรกฎาคม 2541 ถึง กุมภาพันธ์ 2542

3.1.2 กฎเกณฑ์การคัดเลือกเข้ามศึกษา

1. ได้รับ immunosuppressive agents เช่น radiation (รังสีรักษา), glucocorticoids ในขนาดที่สูงกว่า physiologic dosage (เทียบเท่า cortisol 12.5 mg/m²/day) เป็นเวลาติดต่อกัน อย่างน้อย 1 เดือน, cytotoxic drugs เช่น cyclophosphamide, cyclosporine

2. Infiltrative and hematologic diseases เช่น leukemia, lymphoma, aplastic anemia

3. มีภาวะ uremia จากไตวายเรื้อรัง

4. มีการติดเชื้อ HIV

3.1.3 การคำนวณตัวอย่างที่ต้องการ ในการศึกษาความชุกของการติดเชื้อ Cytomegalovirus ในผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยการตรวจหา CMV-DNA จากซีรัม ประมาณการติดเชื้อ Cytomegalovirus (จากการศึกษา pilot study ระยะแรกของการศึกษาจาก 25 ตัวอย่าง ตรวจพบ CMV-DNA 2 ตัวอย่าง) เป็น 8 % และยอมให้มีความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 5 %

กำหนดระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล 95%

$$\begin{aligned} Z\alpha &= Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)} \\ n &= Z\alpha^2 pq/d^2 \\ p &= \text{อัตราการศึกษาเหตุการณ์} = 0.08 \\ q &= 1-0.08 = 0.92 \\ d &= \text{acceptable error} = 0.05 \\ n &= (1.96)^2 (0.08)(0.92) / (0.05)^2 = 113 \end{aligned}$$

3.2. การสังเกตและการวัด (Observation & Measurement)

ผู้วิจัยเป็นผู้เก็บข้อมูลประวัติของกลุ่มตัวอย่างดังนี้

1. ข้อมูลพื้นฐาน: ชื่อ, เพศ, อายุ, หมายเลขบัตรประจำตัวผู้ป่วย
2. การวินิจฉัยโรค
3. ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือดตรวจทางห้องปฏิบัติการ : anti-CMV IgG, anti-CMV IgM, CMV-DNA

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- การตรวจทาง serology

anti-CMV IgG ตรวจโดยใช้วิธี ELISA ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของ HUMAN (Wiesbaden, Germany)

* Dilution buffer มี anti-human IgG ป้องกันการ interfere จาก rheumatoid factor และ ป้องกัน competition จาก specific IgG ที่มีในตัวอย่าง

anti-CMV IgM ตรวจโดยใช้วิธี ELISA ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของ HUMAN (Wiesbaden, Germany)

* ตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วย mononucleosis จาก Epstein-Barr virus อาจให้ค่าผลบวกในระดับต่ำได้ จาก Epstein-Barr virus ทำให้เกิด B-cell proliferation ทำให้เกิด reactivation ของการสร้าง CMV IgM antibody

- การตรวจ CMV-DNA

CMV-DNA ตรวจโดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. Primers selection

ได้เลือก primers เพื่อการตรวจสอบ CMV-DNA ในส่วนคงตัว (conserve region) ของสารพันธุกรรมที่สร้าง Immediate early protein 1(IE1) ได้มาจาก Gene bank accession No.X03922⁽³⁰⁾ โดยเลือก primers 2 คู่ ในการทำ nested PCR ได้แก่

คู่นอก	ตำแหน่ง	981-1000	5'	TTT CCA AGT CTC CAC CCC AT	3'
		1270-1251	5'	GTA CTT ACG TCA CTC TTG GC	3'
คู่ใน	ตำแหน่ง	1011-1030	5'	GGG AGT TTG TTT TGG CAC CA	3'
		1240-1221	5'	CGC GTT CCA ATG CAC CGT TC	3'

โดยการทำ PCR รอบแรก จะมี product band อยู่ที่ 290 base pair และรอบสองอยู่ที่ 230 base pair ตามลำดับ

2. DNA extraction and detection

ใช้ serum 10 μ l inactivate โดยใช้ความร้อนสูงสุดใน microwave เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำมาทำ nested PCR โดยใช้ primer คู่นอก ซึ่ง PCR reaction mixture ประกอบด้วย 2.5 U ของ Taq polymerase , 200 μ M ของ dNTP แต่ละตัว , 0.5 μ M ของ primer แต่ละตัว, 100 mM buffer และ 1.5 mM $MgCl_2$ โดยมีปริมาตรสุดท้าย 50 μ l เริ่มต้นปฏิกิริยา ที่ 95 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที (denaturation) , 55 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที (annealing) , 72 $^{\circ}$ C 2 นาที (extension) เป็นจำนวน 30 รอบ และต่อรอบสุดท้ายด้วยอุณหภูมิ 72 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที (final extension)

ในทำนองเดียวกัน ทำ nested PCR โดยใช้ primer คู่ใน และ template จาก 1 st PCR มาทำการ amplification หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ โดยการให้วิ่งใน 2.5% agarose gel บนกระแสไฟฟ้าค่าความต่างศักย์ที่ 90 V. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้ววิเคราะห์ผ่านแสง UV เปรียบเทียบกับ DNA size marker (ดังแสดงในรูปภาคผนวก)

3.3 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ผู้วิจัยเป็นผู้เก็บข้อมูลประวัติของกลุ่มตัวอย่างดังนี้

1. ข้อมูลพื้นฐาน: ชื่อ , เพศ, อายุ , หมายเลขบัตรประจำตัวผู้ป่วย
2. การวินิจฉัยโรค
3. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ : anti-CMV IgG, anti-CMV IgM, CMV-DNA

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลผลการตรวจหาทาง Serology(anti -CMV IgG ,anti -CMV IgM) และ CMV-DNA ของกลุ่มตัวอย่าง (ผู้ป่วยเด็กที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง) โดยใช้อัตราส่วน และร้อยละ

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)

