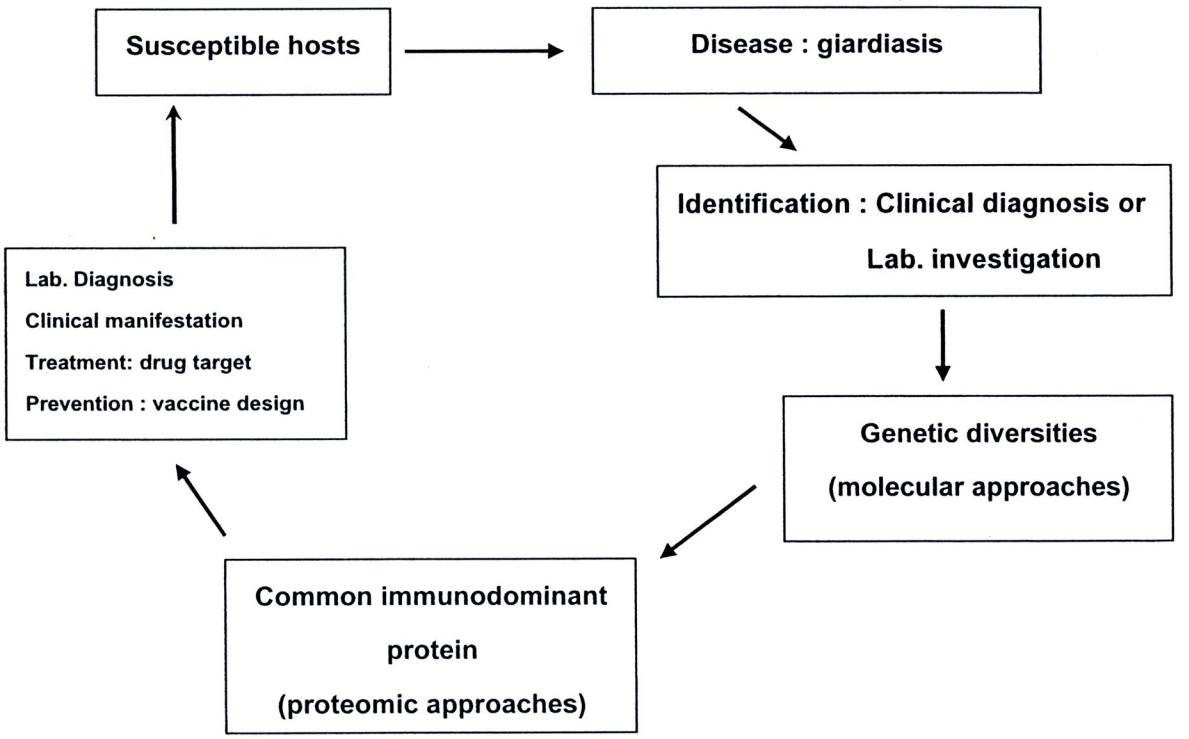
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย



รูปที่ 3 กรอบแนวความคิดของการศึกษาวิจัย

1. ประชากรที่รับเข้าศึกษา

จำนวน sample size ที่คัดเลือกได้จากการคำนวณจากสูตร

$n = Z_\alpha^2 * p * (1- p)/(d^2)$ โดย

Z_α = ค่าวิกฤต Z ที่ระดับนัยสำคัญ α (=0.05)

d = ความคลาดเคลื่อนที่ยอมได้ในครั้งนี้ (ประมาณ 5-10% ค่าเฉลี่ย 7.5%)

n = ขนาดตัวอย่าง

p = สัดส่วนของตัวแปรที่สำคัญที่คาดว่าจะเป็น

(ในที่นี้อัตราความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ที่มีการสำรวจในประชากรทั่วไปในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และเอเชีย ประมาณ 5-15% (ค่าเฉลี่ย 10%)

ดังนั้นเมื่อแทนค่า

$n = 1.96 * 1.96 * 0.1 * (1.0 - 0.1) / (0.075 * 0.075)$

$= 62.27$

หรือประมาณอย่างน้อย 60 คน

2. การคัดเลือกกลุ่มอาสาสมัครตัวอย่าง

คัดเลือกอาสาสมัครทั้งชายและหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 3 ปี ขึ้นไปจำนวน 100 คน โดยมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. ไม่มีโรคประจำตัวร้ายแรง
2. มาพบแพทย์ได้ตามเวลาที่นัดหมาย
3. ให้ความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม และมีความประสงค์ที่จะตรวจสุขภาพ
4. ได้รับการยินยอมจากอาสาสมัครหรือผู้ปกครอง (informed consent)

3. วิธีการเก็บข้อมูล

อาสาสมัครทุกรายตอบแบบสอบถามซึ่งจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับประวัติส่วนตัว ชีวิตความเป็นอยู่และพฤติกรรมบริโภค ประวัติความเจ็บป่วย ประวัติการใช้ยา เป็นต้น บันทึกผลการตรวจสุขภาพ วัดสัดส่วนของร่างกายแบบมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยการวัดน้ำหนัก, ส่วนสูง เพื่อเป็นตัวชี้วัดภาวะทางโภชนาการ และการวัดสภาวะโภชนาการเหล่านี้จะวัดด้วยบุคคลคนเดียวกันโดยวัดอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยในการวัดแต่ละครั้ง ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและการรักษา

4. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

4.1. Isolation of *G. intestinalis*

เก็บตัวอย่างอุจจาระจากอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการ เพื่อนำไปตรวจหาผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* และตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป คัดแยกระยะ cyst ของเชื้อ *G. intestinalis* จากอุจจาระของอาสาสมัครด้วยวิธี sucrose floatation

4.2. Molecular comparison of *G. intestinalis* isolation

นำ *G.intestinalis* ระยะ cyst มาสกัดแยก DNA โดยใช้ gel extraction kit (QIAEX; Qiagen) หลังจากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase (PCR) ตรวจหาลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงในยีนของสายพันธุ์ต่างๆ ที่ด้วยวิธี DNA sequencing ตรวจหาลำดับเบสเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างยีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยวิธี DNA sequencing และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) genotyping assays

4.3 Characterization of specific protein from trophozoite and cyst form

สกัดแยกโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* สายพันธุ์ที่คัดแยกจากผู้ป่วยทั้งระยะ trophozoite และระยะ cyst มาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคทาง proteomics โดยวิธีการแยกโปรตีนแบบ 2 มิติหรือ 2-D gel electropheresis หลังจากการแยกโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* แล้วก็ทำการย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue ทำการเปรียบเทียบโปรตีนที่แสดงออกต่างกันโดยใช้โปรแกรม bioinformatics information หลังจากนั้นทำการ identify โปรตีนที่ต่างกันของทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี liquid chromatography และ tandem mass spectrometer

5. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบความถูกต้องและบันทึกในรูปแบบของแฟ้มข้อมูลในส่วนความจำของคอมพิวเตอร์ นำเสนอข้อมูลเป็น descriptive ถ้าจำเป็นต้องมีการทดสอบเชิงเปรียบเทียบจะนำข้อมูลมาทดสอบการกระจายของข้อมูล normality ทั้ง skewness และ kurtosis ถ้าข้อมูลเป็น normal distribution การเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มจะใช้วิธีการทางสถิติแบบ parametric method ได้แก่ Anova และ independent student t test แต่ถ้าข้อมูลที่ทดสอบไม่เป็น normal distribution การนำเสนอจะเสนอเป็น median, 95% confidence interval และ range และใช้วิธีการทางสถิติแบบ non-parametric method การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ Kruskal-Wallis analysis of variance และ Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใช้ Spearman's rank correlation

6. สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
- ห้องปฏิบัติการหน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

1. ระยะเวลาการวิจัย 3 ปี

2. แผนภูมิแสดงขั้นตอนและระยะเวลาในการทำการวิจัย

2.1. วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้น คัดเลือกอาสาสมัคร การเก็บข้อมูลทั่วไป เช่น เก็บตัวอย่างอุจจาระ ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติ ขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ปี

2.2 คัดแยก *G.intestinalis* จากอุจจาระของอาสาสมัครด้วย วิธี sucrose floatation เก็บที่ -40^{0} C ขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 เดือน

2.3 สกัดแยก DNA ของสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ gel extraction kit หลังจากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase (PCR) ตรวจหาลำดับเบสเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างยีนของเชื้อ *Giardia intestinalis* ด้วยวิธี DNA sequencing และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) genotyping assays ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 1 ปี 3 เดือน

2.4. ศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยเทคนิคทาง proteomics โดยสกัดโปรตีนจากระยะ trophozoite หลังจากนั้นทำการแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis นำ protein spot บนเจลมาย้อมด้วย coomassie brilliant blue หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบการแสดงออกมาของโปรตีน โดยใช้โปรแกรม bioinfor-

matics information ทำการ identify โปรตีนที่สนใจด้วย วิธี liquid chromatography / tandem mass spectrometer ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 1 ปี

2.5. รวบรวมข้อมูลและเขียนรายงาน ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 6 เดือน

ตารางที่ 2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนและระยะเวลาในการทำการวิจัย

กิจกรรม/ขั้นตอนดำเนินงาน	ปีที่ 1				ปีที่ 2				ปีที่ 3			
	1-6		7-12		1-6		7-12		1-6		7-12	
1. วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้น ในการเก็บข้อมูลและการติดต่ออาสาสมัคร												
2. คัดเลือกอาสาสมัครเก็บข้อมูลทั่วไป และตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น												
3. คัดแยก *G.intestinalis* จากอุจจาระของอาสาสมัครเพื่อการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป												
4. สกัด DNA และทำ DNA Sequencing ตรวจหาโครงสร้างยีนของเชื้อ *G.intestinalis* ที่คัดแยกจากผู้ป่วยแต่ละราย												
5. ศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยเทคนิคทาง proteomics												
6. รวบรวมข้อมูลทั้งหมด ตรวจสอบความถูกต้องเพื่อวิเคราะห์ และเขียนรายงาน												

ตารางที่ 3 ผลงานความก้าวหน้าของการวิจัยที่ดำเนินการแล้ว

ระยะเวลา	กิจกรรมที่ดำเนินงาน	ผลที่ได้รับ
เดือนที่ 1-6	- วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บข้อมูล การจัดเตรียมและจัดซื้อน้ำยา สารเคมี สิ้นเปลือง วัสดุต่างๆ สำหรับห้องปฏิบัติการ - เริ่มดำเนินการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis*	- ได้แผนปฏิบัติการวิจัย และความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิจัย - ได้ผลการศึกษาและ samples ที่ จะใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป
เดือนที่ 7-12	- ดำเนินการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ต่อตามแผนที่วางไว้ - คัดแยก *G.intestinalis* cyst เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนไทย	- ทราบถึงความชุกของการติดเชื้อ *G. intestinalis* ในเด็กไทย และได้ clinical samples ที่จะใช้ในการ ศึกษาวิจัยต่อไป
เดือนที่ 13-18	- ศึกษาหาวิธีและ optimal condition ในการสกัดแยก DNA ของสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ gel extraction kit - ศึกษาทดลองจนได้ optimal condition ในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR - Design primers ที่ใช้ในการศึกษานี้	- ทราบถึงวิธีการสกัด DNA จาก stool sample - ทราบถึงวิธีการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR - ได้ primers ที่ใช้ในการศึกษานี้
เดือนที่ 19-24	- ตรวจหาลำดับเบสเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างยีนของเชื้อ *G. intestinalis* ด้วยวิธี DNA sequencing และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) genotyping assemblages	- ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *G. intestinalis* (genotype) ที่แยกได้จากผู้ป่วย
เดือนที่ 25-30	- ศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อ *G. intestinalis* ระยะ trophozoite ด้วยเทคนิคทาง proteomics	- ทราบเบื้องต้นถึงกลุ่มโปรตีนที่พบในผู้ที่มีการติดเชื้อ *G. intestinalis* ระยะ trophozoite
เดือนที่ 31-36	- รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูล เพื่อจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์และ manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	- ได้รายงานผลการศึกษาวิจัยฉบับสมบูรณ์ และบทความที่ตีพิมพ์เผยแพร่การวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 ต.ค. 2556
เลขทะเบียน 245544
เลขเรียกหนังสือ