

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. วางแผนปฏิบัติการวิจัยเบื้องต้นในการเก็บข้อมูล และจัดซื้อน้ำยา และสารเคมีสิ้นเปลือง
2. คัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการจำนวน 50 ราย (กลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม) เพื่อทำการเก็บซีรัมไว้ใช้ในการศึกษา allergenicity ของสารก่อภูมิแพ้ที่ผลิตได้ โดยการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ พิจารณาจากประวัติ อาการทางคลินิก และการทดสอบ skin test ต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* เพื่อทำการเก็บซีรัม และนำมาใช้ในการดำเนินงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทย-ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มีมติรับรองให้ดำเนินการได้ โดยกำหนดการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการเข้าร่วมการวิจัย (Subject selection and allocation) ดังนี้

2.1. ประชากรที่เข้ารับการศึกษ

2.1.1 เกณฑ์การคัดเลือกประชากร (inclusion criteria) โดยการคัดเลือกจากอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ ที่มีอายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป

กลุ่มเป้าหมาย*

โดยคัดเลือกจากผู้ป่วยนอกที่มารับการตรวจรักษาที่ห้องตรวจโรคภูมิแพ้ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา และภาควิชากุมารเวชศาสตร์โรงพยาบาลศิริราช ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนังแล้ว (skin prick test ให้ผลบวก) ซึ่งตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลกถือว่าเป็น screening test ที่เป็น gold standard ในการตรวจวินิจฉัยภูมิแพ้

กลุ่มควบคุม*

โดยคัดเลือกจากผู้ป่วยนอกที่มารับการตรวจรักษาที่ห้องตรวจโรคภูมิแพ้ภาควิชาโสต นาสิก ลาริงซ์วิทยา และภาควิชากุมารเวชศาสตร์โรงพยาบาลศิริราช ที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนังแล้ว (skin prick test ให้ผลลบ) หรือ skin prick test ให้ผลลบต่อสารก่อภูมิแพ้ทุกชนิดที่ทดสอบ ซึ่งตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลกถือว่าเป็น screening test ที่เป็น gold standard ในการตรวจวินิจฉัยภูมิแพ้

* ได้รับการยินยอมจากผู้เข้าร่วมการวิจัย หรือผู้ปกครองในกรณีที่มีอายุต่ำกว่า 18 ปี

2.1.2 เกณฑ์การคัดออกประชากร (exclusion criteria)

- ผู้ป่วย/ผู้เข้าร่วมโครงการ ไม่สมัครใจเข้าร่วมโครงการ หรือปฏิบัติไม่ถูกต้องตามระเบียบปฏิบัติในการดำเนินงานศึกษาวิจัย

- ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ที่ยังไม่เคยได้รับการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test)

2.1.3 เกณฑ์การถอนผู้เข้าร่วมการวิจัยหรือยุติการเข้าร่วมการวิจัย (Withdrawal or termination criteria)

ผู้เข้าร่วมโครงการไม่สมัครใจเข้าร่วมโครงการหรือปฏิบัติไม่ถูกต้องตามระเบียบปฏิบัติในการดำเนินงานศึกษาวิจัย

2.2 การจัดผู้เข้าร่วมการวิจัยเข้ากลุ่ม (Subject allocation)

กลุ่มเป้าหมาย

ผู้เข้าร่วมโครงการที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนังแล้ว (skin prick test ให้ผลบวก)

กลุ่มควบคุม

ผู้เข้าร่วมโครงการที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะภูมิแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนังแล้ว (skin prick test ให้ผลลบ) หรือ skin prick test ให้ผลลบต่อสารก่อภูมิแพ้ทุกชนิดที่ทดสอบ

ส่งซีรัมของอาสาสมัครทั้งหมดเพื่อตรวจวิเคราะห์หา specific IgE level ต่อ *D. pteronyssinus* และ *D. farinae* ด้วยวิธี Immunocap

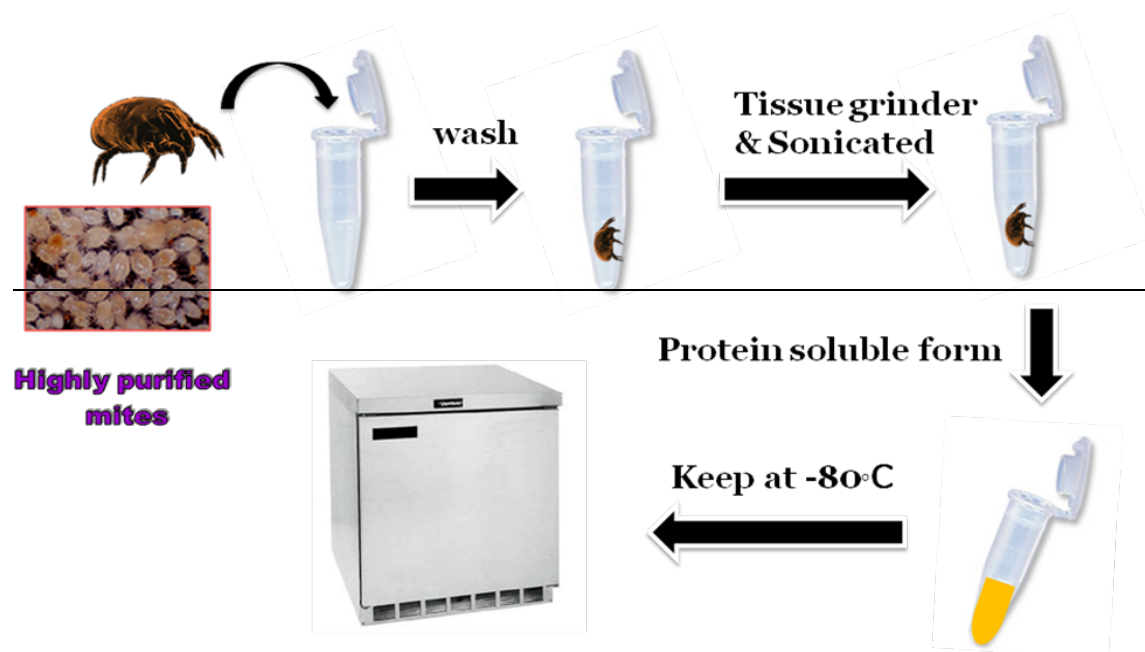
2.3. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size calculation)

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษานำร่อง (pilot study) จึงกำหนดประชากรที่เข้ารับการศึกษากลุ่มเป้าหมายจำนวนอย่างน้อย 30 ราย และกลุ่มควบคุมอย่างน้อย 5 ราย

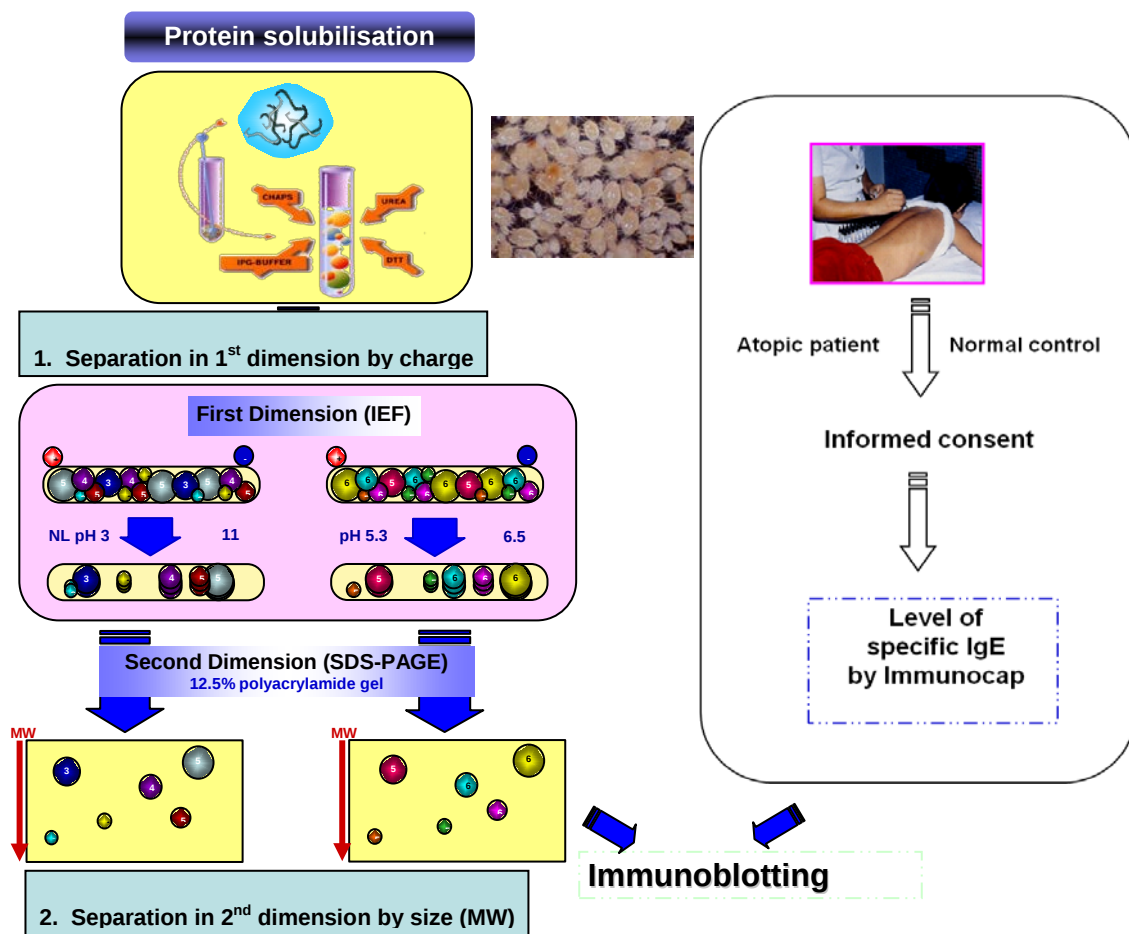
3. จัดหาไรฝุ่นบริสุทธิ์สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่มีความบริสุทธิ์ 99% (99% purity) เพื่อใช้ในการเตรียม crude extract โดยสกัดโปรตีนจากตัวไรฝุ่นโดยใช้ที่บด บดตัวไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ในไนโตรเจนเหลว ต่อจากนั้น solubilize โปรตีนใน lysis buffer ซึ่งมี proteinase inhibitors (รูปที่ 3.2)
4. ทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* นำสารสกัดโปรตีนข้างต้นมาทำการแยกแบบสองทิศทางด้วยวิธี two dimensional gel electrophoresis (2DE) โดยโปรตีนจะถูกแยกในทิศทางแรก โดยความแตกต่างกันของ *pI* ในแต่ละโปรตีน ด้วยวิธี isoelectric-focusing (IEF) ต่อจากนั้นทำการแยกในทิศทางที่สอง โดยความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุลของแต่ละโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยทำเป็น duplicate
5. นำโปรตีนที่ผ่านการแยกแบบสองทิศทาง จากเจลแผ่นแรกมาย้อมด้วยสีย้อมโปรตีนเพื่อให้เห็น protein spots ส่วนเจลแผ่นที่สองนำมา transfer โปรตีนลงบนแผ่น membrane นำแผ่น membrane ที่ blot ด้วยโปรตีนไว้แล้วไปทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยแต่ละราย แล้วตรวจหาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น (รูปที่ 3.3) โดยใช้ second antibody เป็น anti-human IgE (2 DE-IgE immunoblotting)
6. ทำการตัดเจลที่มี protein spots ตรงกับ protein spots ที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นจากเจลแผ่นแรก
7. ทำการ identify โปรตีนในเจล ด้วยวิธี mass spectrometry และเปรียบเทียบกับ peptide mass maps ที่ generate ได้กับข้อมูลใน database
8. ได้ allergenome ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และทราบว่าโปรตีนใดใน allergenome เป็นสารก่อภูมิแพ้สำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทยที่ทำการศึกษา
9. การคัดเลือกชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่จะผลิต
10. การผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography

11. การผลิตสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (recombinant protein) ผลิตด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม
 - 11.1. สกัด total RNA จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* และเตรียม first strand cDNA
 - 11.2. ทำการเพิ่มปริมาณ gene(s) ด้วยวิธี PCR
 - 11.3. ทำการ clone เข้าสู่ cloning vector หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของ gene sequence(s) แล้ว clone gene(s) ดังกล่าวเข้าสู่ protein expression vector ที่เหมาะสม
 - 11.4. ทำการ transfect *E. coli* ด้วย vector จากข้อ 5 และคัดเลือก transformant(s) ที่เหมาะสม
 - 11.5. ทำการ express protein(s) จาก transformant(s) และทำการ purify โปรตีน (recombinant allergens)
12. นำ native allergen และ recombinant protein(s) ไปทดสอบความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenicity) โดยการทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ด้วยวิธี IgE-ELISA
13. รวบรวมผล วิเคราะห์ข้อมูล และเขียนรายงานการวิจัย และ manuscript

HDM EXTRACTION



รูปที่ 3.2 Process of house dust mite extraction



รูปที่ 3.3 Conceptual framework