

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

4.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

4.2.1 ประชากร (Population)

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ประชากรผู้ใหญ่ทั่วไปที่เคยติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกมาก่อน

ประชากรตัวอย่าง (Sample Population)

ผู้ป่วยโรคเลือดที่เป็นผู้ใหญ่ ที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในการช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา และมีข้อบ่งชี้ในการเจาะไขกระดูกเพื่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษา

4.2.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยที่จะเข้าสู่การวิจัยต้องมีคุณสมบัติครบทุกข้อดังต่อไปนี้

มีอายุมากกว่า 15 ปี

- ผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจเจาะไขกระดูกเพื่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษา

4.2.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการวิจัย (Exclusion Criteria)

ผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติอย่างน้อย 1 ข้อดังต่อไปนี้จะถูกตัดออกจากการวิจัย

ผู้ป่วยที่มีอาการของไข้เฉียบพลันในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนที่มีการเจาะไขกระดูก ตัวอย่างที่ได้จากการทำ bone marrow aspiration มีปริมาณน้อยกว่า 5 ml. ซึ่งไม่สามารถตรวจหาไวรัสทางชีวโมเลกุลได้

4.2.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample Size Determination)

จำนวนตัวอย่างคือผู้ป่วยทั้งหมดที่มารับการเจาะไขกระดูกในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา ซึ่งรวมผู้ป่วยที่เป็นโรคเลือดและผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเฮดส์ จำนวน 50 ราย

4.2.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง (Sample Techniques)

ผู้ป่วยทุกรายที่มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ (Consecutive cases)

4.3 วิธีและขั้นตอนการทำวิจัย (Study Methods)

- **ถามประวัติและตรวจร่างกาย** บันทึกรวบรวมข้อมูลต่างๆตามแบบบันทึกข้อมูล เก็บตัวอย่างไขกระดูกจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการเจาะตรวจไขกระดูกที่หน่วยโลหิตวิทยาโลหิตวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์โดยใช้ syringe ดูดทำ bone marrow aspiration ปริมาณ 5 ml. และเก็บเลือด EDTA blood 5 ml. โดยที่ผู้ป่วยได้รับการอธิบายวิธีการศึกษาและลงนามยินยอม
- **การเก็บตัวอย่าง** เป็น consecutive case
- **สิ่งส่งตรวจ** ทุกชนิดจะถูกนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชม. ในกรณีที่ไม่สามารถส่งถึงห้องปฏิบัติการได้ภายในระยะเวลาดังกล่าวก็จะเก็บสิ่งส่งตรวจ ไว้ในตู้เย็น
- **ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี** จากไขกระดูกโดยวิธี RT-nested PCR โดยไขกระดูกจะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมตาม protocol
- **การตรวจหา dengue antibody** จะทำในวันเดียวกับการทำ RT-nested PCR ในไขกระดูก หรือเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสกรณีที่ไม่ได้ทำการตรวจในวันนั้น
- **บันทึกผลการตรวจพบลงในแบบบันทึกการทำศึกษาวิจัย**
- **เก็บเลือด EDTA blood** เพื่อนำมาตรวจ serology โดยวิธี HAI และ ELISA
- **ตัวอย่างที่เหลือจากการศึกษา** จะถูกเก็บไว้เป็นเวลา 5 ปีเพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต หรือตรวจซ้ำในกรณีที่กรณีผลการตรวจมีความขัดแย้ง

4.4 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

การวัดผล (Outcome) คือ การตรวจพบ dengue virus โดยวิธี RT-PCR และการวินิจฉัยการติดเชื้อเดงกีไวรัสของประชากรที่ศึกษาโดยวิธี การหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA และ HAI

4.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลทั้งหมด ประวัติ ผลการตรวจร่างกาย ผลทางห้องปฏิบัติการต่างๆ จะได้รับการลงบันทึกในแบบเก็บข้อมูลของผู้ป่วย โดยผู้ทำการวิจัยเป็นผู้รวบรวม

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เนื่องจากการศึกษาเป็น descriptive study จึงใช้การหาอัตราการตรวจพบและการพรรณนาผลของการวิจัยในการวิเคราะห์ข้อมูล

4.7 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

การลดปัญหาด้านจริยธรรมผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการทุกคนได้รับข้อมูลโดยละเอียดถึงวิธีการตรวจ และได้ส่งรายละเอียดให้คณะกรรมการพิจารณา เพื่อขอความเห็นและต้องได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent) จากผู้ป่วยก่อน

4.8 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

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

4.9 อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัยและมาตรการในการแก้ไขอุปสรรค

- เนื่องจากการตรวจหาไวรัสโดยเทคนิคการทำ RT-nested PCR เป็นการตรวจที่ต้องใช้ประสบการณ์และทักษะในการทำ ดังนั้นผู้ทำการวิจัยต้องฝึกปฏิบัติทำการตรวจในสิ่งส่งตรวจอื่นๆนอกเหนือไปจากไขกระดูก เช่นใน buffy coat, serum
- ผู้ป่วยไม่มาตรวจติดตามภายหลังจากจำหน่ายออกจากโรงพยาบาลแล้ว ทำให้ไม่มี paired serum ในการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA ทำให้ไม่ทราบการวินิจฉัยที่แน่นอน เพื่อที่จะยืนยันว่าในช่วงที่ผู้ป่วยมารับการเจาะไขกระดูกไม่ได้มีการติดเชื้อเดงกีนำมาก่อนในช่วงระยะเวลาไม่นาน

มาตรการในการแก้ไข

โทรศัพท์เตือนผู้ป่วยหรือญาติของผู้ป่วยก่อนถึงวันนัด 1 วัน

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. รวบรวมข้อมูล และทดสอบทางห้องปฏิบัติการ		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
3. วิเคราะห์ข้อมูล														*	*	*	*		
4. สรุปและเขียนรายงาน																*	*	*	
5. รายงานผล																			*

4.11 งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)

- งบประมาณ (Budget) หมวดค่าใช้สอย
- ค่าอุปกรณ์และเครื่องใช้สำนักงาน, ค่าเจ้าหน้าที่พิมพ์เอกสาร 2000 บาท
- หมวดหัตถการ - ค่าตรวจ RT-nested PCR ครั้งละ 600 บาท จำนวน 50 ครั้ง เป็นเงิน 30000 บาท
- ค่าตรวจเลือด ELISA 200 บาทต่อครั้ง ทยอย 2 ครั้ง 50 ทย เป็นเงิน 20000 บาท
- หลอดแก้ว EDTA หลอดละ 4 บาทจำนวน 100 หลอด เป็นเงิน 400 บาท
- ค่าพิมพ์เจาะเลือดเบอร์ 22 จำนวน 100 อันเป็นเงิน 100 บาท
- ค่าจ้างเจ้าหน้าที่ 5000 บาทต่อเดือน จำนวน 12 เดือน เป็นเงิน 60000 บาท
- รวมเป็นเงิน 135000 บาท