

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

4.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ประชากรเป้าหมาย (Population) คือผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคติดเชื้อเดงกี

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคติดเชื้อเดงกีที่มาทำการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

4.2.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยที่จะเข้าสู่การวิจัยต้องมีคุณสมบัติครบทุกข้อดังต่อไปนี้

- ผู้ป่วยที่มีอาการไข้เฉียบพลันมากกว่า 37.8°C (ภายในระยะเวลาไม่เกิน 4 วัน) ที่ได้เข้ารับการตรวจรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทั้งแผนกผู้ป่วยเด็กและแผนกผู้ป่วยผู้ใหญ่
- ไม่พบสาเหตุของการติดเชื้อ (source of infection) ที่แน่นอนจากอาการ

4.2.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการวิจัย (Exclusion Criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีอาการแสดงจำเพาะของอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งหรือมีการติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อระบบทางเดินอาหาร
2. ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น โรคเอดส์ หรือ ผู้ป่วยที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน
3. ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวเป็นโรคเลือด เช่น เม็ดเลือดขาวต่ำ หรือ เกร็ดเลือดต่ำ เป็นต้น

4.2.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample Size Determination)

N	= $(Z^2 pq/d^2)/\text{incidence}$
Z	= ค่า Z จากตารางแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อระดับความเชื่อมั่น เท่ากับ 95% = 1.96 (two-tailed)
d	= ค่าความคลาดเคลื่อน 10% = 0.10
p	= sensitivity = 0.80
q	= 1-p = 0.20
incidence	= 0.4 (40%)
N	= 62

4.2.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง (Sample Techniques)

ผู้ป่วยทุกรายที่มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ (Consecutive cases)

4.3 วิธีและขั้นตอนการทำวิจัย (Study Methods)

- ถามประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจทางห้องปฏิบัติการ และรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ตามแบบบันทึกข้อมูล
- อธิบายให้ผู้ป่วย และ/หรือ ญาติเข้าใจถึงวัตถุประสงค์และรายละเอียดของวิธีการทำวิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยจนเข้าใจดีแล้ว จึงให้ผู้ป่วยหรือญาติลงนามในใบยินยอมผู้เข้ารับการศึกษา (informed consent)
- เก็บ EDTA blood 5 ลบ.มม. ในระยะไข้สามวันแรก วันที่สี่ของไข้ ระยะหลังไข้แล้ว (หลังจากไข้ลง 1-2 วันและ หลังจากไข้ลง 1-4 สัปดาห์) ดังตาราง
- เก็บน้ำลาย 2 ลบ.มม. ใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อ โดยให้ผู้ป่วยบ้วนเอง หรือใช้เครื่องดูดเสมหะในกรณี que ผู้ป่วยไม่สามารถบ้วนน้ำลายเองได้ โดยเก็บในระยะไข้สามวันแรก วันที่สี่ของไข้ ระยะหลังไข้แล้ว (หลังจากไข้ลง 1-2 วันและ หลังจากไข้ลง 1-4 สัปดาห์) ดังตาราง

- เก็บเซลล์เยื่อปนุกระพุงแก้มใสหลอดพลาสติกที่มีสารละลาย buffer 20 ลบ.มม. โดยเจ้าของโครงการวิจัย ใช้แปรงสีฟันดูเบา ๆ ที่กระพุงแก้มทั้งสองข้าง ข้างละ 5 ครั้ง แล้วจุ่มลงในสารละลาย buffer ทันที ได้ โดยเก็บในระยะใช้สามวันแรก วันที่สี่ของใช้ ระยะหลังใช้แล้ว (หลังจากใช้ลง 1-2 วันและ หลังจากใช้ลง 1-4 สัปดาห์) ดังตาราง
- สิ่งส่งตรวจทุกชนิดจะถูกนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่สามารถส่งถึงห้องปฏิบัติการได้ภายในเวลาดังกล่าว เช่น วันหยุดราชการ จะแช่สิ่งส่งตรวจไว้ในตู้เย็น
- สิ่งส่งตรวจจะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมเพื่อทำ RT-PCR และตรวจหา dengue antibody ด้วยวิธี ELISA ในวันเดียวกัน หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในกรณีที่ยังไม่ได้ทำการตรวจในวันนั้น
- ผู้ป่วยอาจถูกส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ตามแต่แพทย์เจ้าของผู้ป่วยเห็นสมควร
- ตัวอย่างหรือสารพันธุกรรมที่เหลือจากการศึกษาจะถูกเก็บไว้เป็นเวลา 5 ปี เพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต หรือเพื่อทำการตรวจซ้ำเพื่อยืนยันในกรณีที่ผลการตรวจมีความขัดแย้ง
- ในกรณีที่ผล PCR ของสิ่งส่งตรวจชนิดเดียวกันของแต่ละวันมีความขัดแย้งกัน จะมีการทบทวนผลทางห้องปฏิบัติการสำหรับวันนั้น ๆ และอาจนำสารพันธุกรรมที่สกัดไว้ซึ่งยังเหลืออยู่มาทำการตรวจซ้ำเพื่อยืนยันความถูกต้อง

ตารางแผนการดำเนินงาน

	วันที่มารพ. (ภายใน 72 hr แรก)	วันที่ 4	หลังจากไข้ลง 1-2 วัน (d+1 - d+2)	หลังจากไข้ลง 1-4 สัปดาห์ (d+7 - d+30)
ไม่ได้นอนรพ. หรือนอนรพ.	<ul style="list-style-type: none"> ● CBC และ lab อื่นๆ ▼ เซ็นโบบิยนิยชม ● Dengue titer (ELISA) ● Blood, urine, saliva and buccal mucosa for RT PCR 	<ul style="list-style-type: none"> ● Dengue titer (ELISA) ▼ blood, urine, saliva and buccal mucosa for RT PCR 	<ul style="list-style-type: none"> ● Dengue titer (ELISA) ▼ blood, urine, saliva and buccal mucosa for RT PCR 	<ul style="list-style-type: none"> ● Dengue titer (ELISA) ▼ blood, urine, saliva and buccal mucosa for RT PCR

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)

Descriptive data (demographic data)

- Categorical data : percent
- Continues data : mean \pm SD
- Diagnostic data
 - Sensitivity : percent
 - Specificity : percent
 - Positive predictive value : percent
 - Negative predictive value : percent
 - Accuracy : percent

4.7 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

ผู้ป่วยและ/หรือญาติของผู้ป่วย ที่จะเข้ารับการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ จะได้รับคำอธิบายที่ชัดเจน และสามารถตัดสินใจเข้าร่วมหรือปฏิเสธการเข้าร่วมในโครงการ โดยไม่มีผลต่อการดูแลรักษาแต่อย่างใด หลังจากได้รับคำอธิบาย และได้รับคำตอบข้อซักถามอย่างแจ่มแจ้งแล้ว ผู้ป่วยหรือญาติที่ตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัย จะลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ความเสี่ยงหรือความไม่สบายที่เกิดขึ้น จากการเข้าร่วมโครงการฯ คือ การตรวจเลือด ซึ่งอาจเป็นการเจาะเลือดเพิ่มเติมจากปกติ หรือร่วมไปกับการเจาะตรวจวินิจฉัยอื่นๆ ตามปกติ แต่ใช้ปริมาณเลือดมากขึ้น คือประมาณ 10-15 ซีซี สำหรับการวิจัยนี้ ซึ่งไม่เป็นผลเสียต่อสุขภาพของท่าน

4.8 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

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

4.9 อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

อุปสรรค

ผู้ป่วยไม่มาตรวจติดตามภายหลังจากจำหน่ายออกจากโรงพยาบาลแล้ว ทำให้ไม่มี paired serum ในการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA ทำให้ไม่ทราบการวินิจฉัยที่แน่นอน ในกรณีที่ผลการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีจากซีรัมแรกยังไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีทำให้ผู้ป่วยบางส่วนถูกคัดออกจากการศึกษาจำนวนผู้ป่วยจึงไม่ครบตามเป้าที่คำนวณ

มาตรการในการแก้ไข

- โทรศัพท์เตือนผู้ป่วยหรือญาติของผู้ป่วยก่อนถึงวันนัด

4.10 การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time Schedule)

การดำเนินงาน	2549			2550												2551				
	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)

ค่าใช้จ่ายทั่วไป	5,000 บาท
ค่า RT-PCR ชุดละ 600 บาท จำนวน 496 ชุด คิดเป็น	297,600 บาท
ค่า ELISA ชุดละ 100 บาท จำนวน 496 ชุด คิดเป็น	49,600 บาท
งบประมาณทั้งหมด	<u>352,200 บาท</u>