

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษเชิงพรรณนาแบบตัดขวาง ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (Cross-Sectional Descriptive Study)

ประชากรและตัวอย่าง (Population and Sample)

ประชากรเป้าหมาย ได้แก่ หญิงตั้งครรภ์ทุกคนที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลแม่และเด็ก ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพ เขต 6 ขอนแก่น

ตัวอย่าง ได้แก่ หญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลแม่และเด็กดังกล่าวทุกคน ในช่วงเวลาที่ศึกษา โดยมีเกณฑ์คัดเลือกการเข้าร่วมในการศึกษาและเกณฑ์คัดออกจากการศึกษา ดังนี้

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมในการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ไม่เคยได้รับยาเสริมธาตุเหล็กมาก่อน
2. ยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

เกณฑ์คัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. หญิงมีครรภ์ที่ให้ประวัติว่า เคยได้รับยาเสริมธาตุเหล็ก ก่อนการฝากครรภ์ครั้งนี้
2. เป็นไข้ ปวดท้อง หรือวิงเวียน เพราะไม่สามารถให้ข้อมูลได้
3. หญิงมีครรภ์ที่มีอาการเจ็บครรภ์ มาก่อนเข้าโครงการวิจัย
4. ไม่ยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ขนาดตัวอย่าง คำนวณขนาดตัวอย่าง โดยใช้สูตร (59)

$$n = Z^2 pq/d^2$$

กำหนดให้

$$n = \text{ขนาดตัวอย่าง}$$

$$p = \text{สัดส่วนความชุกของภาวะโลหิตจาง ในหญิงตั้งครรภ์}$$

เท่ากับ ร้อยละ 20 (60)

$$q = 1-p = 1-0.2 = 0.8$$

$$d = \text{ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้} = 0.04$$

$$Z = \text{ค่ามาตรฐานภายใต้โค้งปกติ ที่ } \alpha = 0.5 = 1.96$$

แทนค่าในสูตร

$$n = (1.96)^2 \times 0.2 \times 0.8 / (0.04)^2$$

$$= 384$$

เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นได้ในตัวอย่างที่ศึกษา ผู้วิจัยได้เพิ่มขนาดตัวอย่าง
อีก ร้อยละ 20

ดังนั้นขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ เท่ากับ 460 ราย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ใช้แบบสอบถามที่ผู้วิจัยสร้างขึ้นมีความสอดคล้อง
กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา เก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์ และตรวจทางห้องปฏิบัติการ ราย
ละเอียด ดังนี้

แบบสอบถาม แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

ส่วนที่ 2 ข้อมูลทางชีวภาพและประวัติการตั้งครรภ์

ส่วนที่ 3 ข้อมูลสุขภาพ

แบบบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเจ้าหน้าที่เป็นผู้บันทึกข้อมูลวิจัยด้าน

สุขภาพ

การตรวจสอบคุณภาพของเครื่องมือ

1. ทหาความตรงตามเนื้อหาของแบบสอบถาม (Content validity) โดยการนำแบบสอบถามที่สร้างขึ้นไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิตรวจสอบ รายละเอียดของข้อความและนิยามเนื้อหาของคำถามทุกข้อว่าถูกต้องเหมาะสมหรือไม่
2. นำแบบสอบถามไปทดสอบ โดยใช้สัมภาษณ์หญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลแม่และเด็ก ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพ เขต 1 กรุงเทพมหานคร จำนวน 20 ชุด และได้นำกลับมาแก้ไขก่อนที่จะนำไปใช้จริง

ระยะเวลาดำเนินการศึกษา

ตั้งแต่เดือนกันยายน 2539 ถึงเดือนธันวาคม 2539

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ผู้วิจัยทำหนังสือจากบัณฑิตวิทยาลัยถึงผู้อำนวยการโรงพยาบาลแม่และเด็ก ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพ เขต 6 ขอนแก่น เพื่อขออนุญาตประสงค์และขอความร่วมมือในการเข้าไปดำเนินการวิจัย
2. ผู้วิจัยดำเนินการอบรมผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ พยาบาลวิชาชีพ พยาบาลเทคนิค และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 คน เพื่อให้มีความเข้าใจตรงกันในเรื่อง เกณฑ์ในการรับเข้าโครงการของประชากรตัวอย่าง คำถามในแบบสอบถาม การลงคำตอบ การตรวจทางห้องปฏิบัติการและการลงผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
3. ผู้วิจัยร่วมกับผู้ช่วยวิจัย ดำเนินการเก็บข้อมูล ในหญิงตั้งครรภ์ทุกคนที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลแม่และเด็ก ซึ่งมีคุณสมบัติตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ และได้รับเลือกให้เป็นประชากรตัวอย่างในช่วงระยะเวลาการศึกษา โดยมีขั้นตอน ดังนี้

3.1 ชักประวัติ

3.2 ตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อค้นหาภาวะโลหิตจาง โดยการเจาะเลือดจาก

เส้นเลือดดำ และตรวจหาระดับฮีมาโตคริต โดยปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

3.4 หญิงตั้งครรภ์ที่มีระดับฮีมาโตคริต ต่ำกว่าร้อยละ 33 ทุกคน จะได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยละเอียด ดังนี้

- Complete Blood Count ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดโดยอัตโนมัติ
- Mean corpuscular volume ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดโดยอัตโนมัติ
- Serum ferritin โดยวิธี Enzymelinked immunosorbent assay
- Hemoglobin typing โดยวิธี High Performance liquid Chromatography
- Stool Examination โดยวิธี Direct smear Technique

4. ตรวจสอบความถูกต้องครบถ้วนของข้อมูลในแต่ละวัน

5. แปลงข้อมูลที่ได้เป็นรหัส (Coding) ตามคู่มือการลงรหัสที่จัดเตรียมไว้ และบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS/PC+ ดังนี้

1. ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics)

- ข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative Data) ใช้สถิติค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ในการสรุปข้อมูล

- ข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative Data) โดยหาค่าร้อยละ (percentage) นำเสนอเป็นตาราง (Table)

2. ใช้สถิติเชิงอนุมาน (Inferential Statistics)

- ทดสอบความสัมพันธ์หรือความแตกต่างของข้อมูล โดยใช้ Chi-square test หรือ t-test ตามความเหมาะสม

การวินิจฉัยภาวะโลหิตจางทางห้องปฏิบัติการ

การวินิจฉัยภาวะโลหิตจางด้วยสาเหตุต่าง ๆ ทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้กล่าวมาแล้ว ผู้วิจัยได้รวบรวมจากตำราและเอกสาร ซึ่งมีแนวทางและวิธีการในการวินิจฉัยได้มาก สำหรับในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำหลักการและวิธีการในการวินิจฉัยภาวะโลหิตจางในหญิงตั้งครรภ์ ดังนี้

1. Complete Blood Count และ Red blood cell indices ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดโดยอัตโนมัติ

เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดโดยอัตโนมัติ เป็นเครื่อง Sysmex CA-1000 โดยมีหลักการว่า เซลล์เม็ดเลือดมีดัชนีการหักเหแสง (refractive index) มากกว่าสารละลายที่เซลล์ลอยแขวนอยู่ เมื่อฉายลำแสงที่ปรับให้เล็กลงบนเซลล์ เซลล์จะหักเหแสงให้กระจายและบานออกไป ลำแสงที่กระจายโดยเซลล์นี้จะสร้างสัญญาณทางไฟฟ้าขึ้นมา จำนวนและขนาดของสัญญาณดังกล่าวสามารถบอกจำนวนและปริมาตรของเซลล์ได้ เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดโดยอัตโนมัตินี้จะดำเนินการเองทุกอย่างตั้งแต่ได้รับเลือดเข้าไปตลอดจนการแสดงผล ให้ผลการวิเคราะห์เม็ดเลือดได้หลาย ๆ ค่าพร้อมกัน

Complete Blood Count ที่ศึกษา ได้แก่

- Hb หมายถึง ปริมาณฮีโมโกลบินหรือความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ในเลือด 100 มิลลิลิตร มีหน่วยเป็นกรัมเปอร์เซ็นต์

ค่าปกติในผู้หญิง 12-16 กรัมเปอร์เซ็นต์ (gm %)เฉลี่ยประมาณ 14 gm % (61)

- Hct หมายถึง ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรของเลือด ค่าปกติปกติในผู้หญิง เท่ากับ 37 - 47 % (42 ± 5) (61)

- wbc หมายถึงจำนวนของเม็ดเลือดขาวใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ลบ.มม.) ค่าปกติในผู้ใหญ่ มีจำนวนประมาณ 5,000 -10,000 เม็ด/ลบ.มม. (38)

- Differential count ได้แก่ (38)

- Neutrophil (Polymorphonuclear neutrophils : PMN)
มีจำนวนร้อยละ 60-70 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด
- Eosinophil มีประมาณร้อยละ 1-5 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด
- Basophil มีประมาณร้อยละ 0-1 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด
- Monocyte มีประมาณร้อยละ 1-5 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด
- Lymphocyte มีประมาณร้อยละ 20-30 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

Red Cell Indices ได้แก่

- Mean Corpuscular Volume (MCV) หมายถึง ปริมาตรโดยเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงแต่ละเม็ด มีหน่วยเป็นลูกบาศก์ไมครอน

ค่าปกติเท่ากับ 87 ± 5 ลูกบาศก์ไมครอน หรือ Femtoliter (fl) (61)

Red blood cell morphology จาก Blood smear ได้แก่ (61)

ขนาด (Size)

- Normocyte หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่ปกติ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-9 ไมครอน
- Microcyte หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีขนาดเล็กกว่าปกติ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 6 ไมครอน
- Macrocyte or Megalocyte หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 9 ไมครอน
- Anisocytosis หมายถึง เม็ดเลือดแดงมีขนาดไม่เท่ากัน จะมีขนาดใหญ่บ้างเล็กบ้างปนกันอยู่

รูปร่าง (Shape)

เม็ดเลือดแดงที่ปกติจะมีรูปร่างกลมคล้ายจาน และเมื่อดูด้านข้างจะมีรูปร่างเป็น

Biconcave

- Poikilocytosis หมายถึง เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติ และมีรูปร่างแปลก ๆ แตกต่างกันหลายแบบ เช่นรูปร่างรี ๆ คล้ายหยดน้ำตา หรือคล้ายเคียว
- Ovalocyte หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างรี
- Spherocyte หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างกลมตรงกลางป่อง
- Target cell หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างบางกว่าปกติ ขอบของเม็ดเลือดแดงติดสีเข้ม ตรงกลางมีจุดของฮีโมโกลบินแต่ชัดเหมือนเป้าดำขาว
- Fragmented red cell (Schistocyte) หมายถึง ชิ้นเล็ก ๆ ของเม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างได้หลาย ๆ แบบ เช่น รูปรี รูปสามเหลี่ยม ฯลฯ
- Burr cell หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างคล้ายรูปสามเหลี่ยมหรือดวงจันทร์ครึ่งซีกและมีส่วนยื่นยาวออกไป
- Teardrop cell (Dacryocyte) หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ

ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hemoglobin content)

- Normochromia หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินปกติ
- Hypochromia (Hypochromasia or achromia) หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีปริมาณฮีโมโกลบินน้อยกว่าปกติ

การติดสี (Staining property)

เม็ดเลือดแดงปกติ เมื่อย้อมด้วยสี Wright ส่วนขอบของเม็ดเลือดแดงจะติดสีเข้ม ส่วนตรงกลางจะมีสีจางหรือไม่ติดสีเลย

- Polychromasia (Polychromatophilia) หมายถึง เม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ และส่วนกลางของเม็ดเลือดเหล่านี้ไม่มีสีจางเหมือนเม็ดเลือดแดงปกติ

โครงสร้างของเม็ดเลือดแดง (Structure)

ปกติในผู้ใหญ่จะไม่พบเม็ดเลือดแดงอ่อนที่มี Nucleus ในกระแสเลือด แต่จะมีอยู่ใน Bone marrow และจะมีเม็ดเลือดแดงที่มี Nucleus เข้าไปอยู่ในกระแสเลือดในภาวะที่เกิดโรคขึ้นเท่านั้น

- Nucleated red cell (NRC) หมายถึงเม็ดเลือดแดงอ่อนที่มี Nucleus เป็นเม็ดเลือดแดงที่มีการเจริญปกติ คือ ตั้งแต่ระยะ Pronormoblast จนถึงระยะ Orthochromatic normoblast

2. Hemoglobin typing and hemoglobin quantitation ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (62)

HPLC หรือ High Pressure liquid Chromatography เป็นเครื่องมือที่สามารถแยกชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ได้ดี รวดเร็ว มีความละเอียด ความถูกต้อง ความแม่นยำ และมีความไวในการตรวจวัดสูง โดยมีหลักการ คือ แยกสารโดยอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสารระหว่าง 2 เฟส โดยเฟสหนึ่งเป็นตัวสำหรับดูดซับ (absorbent) ซึ่งเรียกว่า เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนอีกเฟสหนึ่งจะเป็นตัวทำละลายที่ผ่านไปบนเฟสอยู่กับที่ เรียกว่า เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารที่จะแยก (ฮีโมโกลบิน) จะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และมีความสามารถในการดูดซับในตัวดูดซับต่างกัน ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดต่างกันโดยสารที่ละลายได้ดีและถูกดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วทำให้ถูกชะออกมาก่อน ในทางตรงกันข้ามสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้าจึงถูกชะออกมาก็หลัง จากคุณสมบัติเฉพาะดังกล่าวทำให้สามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินได้ สำหรับการวัดปริมาณของฮีโมโกลบิน (hemoglobin quantitation) ทำโดยการวัดการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด โดยมี photometer เป็นตัววัดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเป็นร้อยละ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด

Hemoglobin typing and hemoglobin quantitation ที่ศึกษา ได้แก่

- Hb A เป็น Hb ปกติ
ค่าปกติในผู้ใหญ่ มีปริมาณร้อยละ 95-97
- Hb A₂ เป็น Hb ปกติ
ค่าปกติในผู้ใหญ่ มีปริมาณร้อยละ 2-3

- Hb F เป็น Hb ปกติ
ค่าปกติในผู้ใหญ่ มีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1
- Hb E เป็น Hb ผิดปกติ
- Hb CS เป็น Hb ผิดปกติ
- Hb H เป็น Hb ผิดปกติ
- Hb Bart's เป็น Hb ผิดปกติ

3. Serum ferritin โดยวิธี Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA)
ตรวจหา Serum ferritin (SF) ด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็น Sandwich
enzyme immunoassay โดยใช้ monoclonal antihuman ferritin antibodies และ
conjugate ด้วย horseradish peroxidase ค่าของ SF จะบ่งบอกถึงปริมาณของเหล็กที่
สะสมในร่างกาย (63,64)

ค่าปกติของ SF ในผู้ใหญ่ประมาณ 100 ± 60 นก./มล. (34)

4. ตรวจอุจจาระ ด้วยวิธี Direct Smear technic

ตรวจอุจจาระ เพื่อค้นหาพยาธิ ด้วย Direct Smear technic เป็นวิธีการ
ตรวจที่ง่าย ทำได้รวดเร็ว โดยมีวิธีการคือ (65)

1. หยดน้ำเกลือ 0.85 % ลงบนสไลด์ 1 หยด และใช้ไม้เขี่ยอุจจาระขนาดเท่าหัว
ไม้ขีดหรือน้อยกว่า ผสมกับน้ำยา แล้วทำเป็นฟิล์มบาง ๆ ความหนาของฟิล์มที่ทำขนาดพอดี คือ
เมื่อนำแผ่นสไลด์ไปวางบนหนังสือพิมพ์เราสามารถอ่านได้

2. ปิดด้วย Coverslip แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ กรณีที่ไม่ต้องการให้
smear ที่ทำแห้งเร็วเกินไป อาจใช้ glycerine-water แทน น้ำเกลือได้

การแปลผลIron deficiency anemia

พบ SF ต่ำกว่า 12 $\mu\text{g}/\text{dl}$. (66)

Thalassemia and Abnormalhemoglobin (31,38)

กำหนด จุดตัดของปริมาณ Hb A₂ ระหว่างคนปกติและผู้มีฮีโมโกลบินผิดปกติ β -thalassemia เท่ากับ 3.5 %

 β -thalassemia trait

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น A₂A
- Hb A₂ (%) เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 5-6 %
- Hb F (%) ไม่เพิ่มหรือเพิ่มเล็กน้อย
- MCV เท่ากับ 67 ± 9

 β^+ thalassemia /Hb E disease

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น EFA
- Hb A₂/E (%) เฉลี่ย 55
- Hb F (%) เฉลี่ย 16
- MCV ลดลง

 β^0 thalassemia /Hb E disease

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น EF
- Hb A₂/E (%) เฉลี่ย 60-70
- Hb F (%) เฉลี่ย 30-40
- MCV ลดลง

β - thalassemia disease

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น A_2F และอาจพบ Hb A ร่วมด้วย ถ้าเป็น β^+ - thal
- Hb A_2/E (%) อาจปกติ หรือเพิ่มเป็น 3-8 % และ Hb F เพิ่มอย่างชัดเจน หรือมีค่าตั้งแต่ 10-90 หรือ 100 %
- MCV ลดลง

Hb E trait

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น EA
- Hb A_2/E (%) 25-30
- Hb F (%) ปกติ
- MVC ปกติ

Hb E disease

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น EE
- Hb A_2/E (%) เท่ากับ 80-90
- Hb F (%) เพิ่มเล็กน้อย
- MCV ลดลง

Homozygous Hb CS

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น CS $A_2 A$ or CS $A_2 A$ Bart's
- Hb CS (%) 3-5
- Hb F (%) ปกติ
- Hb A_2 ปกติ
- MVC ปกติ หรือลดลงเล็กน้อย

Hb H disease (α -thal/ α -thal 2)

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น A_2 A Bart's H or A_2 A H or A_2 A Bart's
- Hb F (%) ปกติ
- Hb A_2 (%) ปกติ
- Hb H (%) 5-30
- MVC ลดลง

Hb H disease (α -thal/Hb CS)

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น CS A_2 A, or A Bart's H
- Hb F (%) ปกติ
- Hb A_2 (%) ปกติ
- Hb H (%) 5-30
- Hb CS (%) 2-5
- MVC ลดลง

AE Bart's disease (α -thal 1/ α -thal 2 / Hb E)

ผลการตรวจ พบ

- Hb Typing เป็น EA Bart's
- Hb E (%) 15
- Hb Bart's (%) 4-6
- Hb A_2 (%) ปกติ
- Hb F (%) ปกติหรือสูงเล็กน้อย
- MCV ลดลง

AE Bart's disease (α -thal 1/Hb CS/Hb E)

ผลการตรวจ พบ

- Hb typing เป็น CS A Bart's
- Hb E (%) 15
- Hb CS (%) 1-2
- Hb Bart's (%) 4-6
- Hb A₂ (%) ปกติ
- Hb F (%) ปกติ