

### บทที่ 3

## วิธีการวิจัย

### รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาวิจัยเชิงพรรณนา (Cross sectional descriptive study)

### ระเบียบวิธีการวิจัย

#### ประชากรที่ศึกษา

ประชากรเป้าหมาย (Population) ผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อ H.pylori และผู้ป่วยที่มีอาการของแผลในกระเพาะอาหาร แต่ไม่พบแผลจากการส่องกล้อง (NUD)

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) . ผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อ H.pylori และผู้ป่วยที่มีอาการของแผลในกระเพาะอาหาร แต่ไม่พบแผลจากการส่องกล้อง (NUD) และมารับการส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหารที่หน่วยทางเดินอาหารโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

#### หลักเกณฑ์การเลือกผู้ป่วยเข้าโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยทุกรายที่มารับการส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหาร ที่ห้องส่องกล้องตึกพร้อมพันธ์์โดยผลการส่องกล้องมีข้อบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อ H.pylori ได้แก่ ผู้ป่วยแผลในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็กส่วนต้น ผู้ป่วยที่มีอาการของแผลในกระเพาะอาหาร แต่ไม่พบแผลจากส่องกล้อง (NUD)

#### หลักเกณฑ์คัดแยกผู้ป่วยออกก่อนเข้าโครงการวิจัย (exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่เคยได้ยาปฏิชีวนะ bismuth หรือยาลดกรดกลุ่ม proton pump inhibitor หรือ H2 blocker ภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 เดือน ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
2. ผู้ป่วยที่มีประวัติเคยได้รับการรักษาหรือกำจัดเชื้อ H.pylori มาก่อน

3. ผู้ป่วยที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำ ( $< 100,000$ ) หรือมีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด (Prothrombin time  $>$  control 3 seconds)

4. ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องจากภาวะต่างๆ รวมทั้งการได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

#### การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

$$\text{ใช้ } N = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{D^2}$$

$$D = \text{Acceptable error} = 0.1$$

$$P = \text{Sensitivity} = 0.7 \text{ (จากข้อมูลเดิมของญี่ปุ่น เมื่อ ค.ศ. 1997)}$$

$$Z = 1.96 \text{ (CI = 95\%); } Z_{0.5} = 1.96$$

และอุบัติการณ์ของการตรวจพบ *H. pylori* ในผู้ป่วยที่มาส่งกล้องในหน่วยทางเดินอาหาร รพ. จุฬาลงกรณ์ เท่ากับร้อยละ 60

$$\text{คำนวณแล้วได้ขนาดตัวอย่าง} = \frac{(1.96)^2 \times 0.7(1 - 0.7)}{(0.1)^2} \times \frac{100}{60}$$

จำนวนผู้ป่วยอย่างน้อยในการศึกษาครั้งนี้ = 130 ราย

#### การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการส่องกล้องในกระเพาะอาหาร และพบพยาธิสภาพ ที่มีข้อบ่งชี้ตาม inclusion criteria และไม่เข้ากับ exclusion criteria จะได้รับการสอบถามความสมัครใจเพื่อลงนามในใบยินยอมและเข้าร่วมโครงการวิจัย

2. ผู้ป่วยจะได้รับการแจ้งให้ทราบถึงวิธีการวิจัย ซึ่งอาศัยการตัดชิ้นเนื้อในกระเพาะจำนวน 6 ชิ้นโดยตัดที่ antrum 3 ชิ้น (ระยะห่างไม่เกิน 2 ซม. จาก pylorus) และที่ body 3 ชิ้น โดยแบ่งชิ้นเนื้อบริเวณละ 1 ชิ้น ส่งตรวจ CLO test ส่งตรวจพยาธิวิทยา และส่งเพาะเชื้อ

3. การอ่านผล CLO test จะอ่านผลที่ 30 นาที 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ
4. ชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจทางพยาธิวิทยา จะได้รับการย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and Eosin และหรือ Giemsa stain โดยพยาธิแพทย์คนเดียวกันที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจโดยการเพาะเชื้อ จะส่งตรวจที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้ COMLUMBIA BAGE MEDIA (ที่อุณหภูมิ 37°C, MICROAEROPHILLIC-STATE), อ่านผลที่วันที่ 3, 5, 7
6. เก็บตัวอย่างน้ำคั่งหลังกระเพาะอาหารของผู้ป่วยเพื่อตรวจ PCR for H. pylori ใช้สาย Duodenal tube สอดผ่านรูกลองเข้าไปแล้วดูดย่อยกระเพาะอาหารเข้าสู่กระบอกฉีดยาแล้วบรรจุใส่ small test tube ส่งไปยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาแล้วผ่านกรรมวิธีตามขั้นตอนของ PCR assay ดังต่อไปนี้

#### DNA Extraction

Gastric juice ประมาณ 1.5 ml ปั่นตกตะกอนที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือประมาณ 200  $\mu$ l เติม lysis buffer 400 $\mu$ l (10 mM Tris-Cl pH 8.3 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, proteinase K 10 mg/ $\mu$ l) incubate ที่ 56 °C 1 ชั่วโมง เติม Saturated Phenol 600  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการใช Vortex mixer ปั่นที่ 14000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เอาเฉพาะส่วนใสข้างบนมา extract ต่อด้วย Phenol: Chloroform : ISO amyl alcohol (25: 24: 1) ตกตะกอน DNA ด้วย 2.5 เท่า (V/V) ของ Absolute ethanol ปั่นที่ 14000 รอบ/นาที 15 นาที ล้างด้วย 70% Ethanol ปั่นที่ 14000 รอบ/นาที 5 นาที ทำให้แห้งด้วย Speed vac เติม TE 50 $\mu$ l (10 mM Tris 1 mM EDTA) ใช้ 10  $\mu$ l สำหรับ PCR amplification

#### Primer

Primer สำหรับ H pylori ใช้ Primer จาก Urease gene (Ure C) (Accession no. m 60398) Primer 3 ในการออกแบบและสร้างโดยเครื่อง Gene Assembler Plus (Pharmacia) และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี OPC Cartridge (ABI, Foster City Calif.)

ตารางแสดง primers ที่ใช้ในการ amplify H. Pylori

Ure C 1 5' = AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T-3'

Ure C 2 5' = AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC -3'

Ure C 3 5' = ATT GTC GCT ACA AAC ATG AGC A -3'

Ure C 4 5' = CTA ACA CTA ACG CGC TCA CTT G-3'

เพื่อเพิ่มความจำเพาะและความไวในการทดลองนี้จะใช้วิธี Nested-PCR โดย PCR product ในรอบ Nested PCR จะได้ DNA fragment ยาว 222 bp.

### Amplification of H. Pylori DNA

PCR reaction ประกอบด้วย 10 mm. Triscl pH 8 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> 200 μm ของ dNTP primer Ure C 1 และ Ure C 2 50 pindle 2.5 unit Tag DNA polymerase (Promega, ) ใช้ DNA 10 μl ใช้เครื่อง Thermal Cycler 2400 (Pulcin Emer, Narwalk Conn) โดย amplify ที่ 35 รอบของ 94 °C 30, second 55 °C 30 sec, 72 °C 30 sec.

นำ 2 μl จาก First PCR มาทำต่อโดยใช้ primer Ure C3 และ Ure C4 ใช้ thermal profile เดิมลดเหลือ 30 รอบทำ PCR product 10 μl มาตรวจสอบด้วยวิธี agorose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ดูขนาดของ PCR product ด้วย UV tranisilluminater ถ้า Positive จะได้ DNA ขนาด 222 bp. ในการทดลองจะต้องมี Negative Control และ Positive Control ด้วย ดังรูป

## รวบรวมข้อมูล (Data Collection)

เก็บรวบรวมลงใน Case Report Form โดยแพทย์ผู้ทำการวิจัย

## การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐาน เช่น อายุ เพศ ผลการตรวจด้วยการส่องกล้อง โดยใช้ค่าร้อยละค่าเฉลี่ย
2. คำนวณ Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, post-test likelihood test positive, post-test likelihood if test negative, และ accuracy ของ PCR for H. pylori จากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยเทียบกับ gold standard คือ แปรผลว่ามีการติดเชื้อเมื่อผลการตรวจให้ผลบวก โดยการตรวจด้วยการตรวจโดยวิธีพยาธิวิทยา และของ CLO test หรือการเพาะเชื้อขึ้นเชื้อ H. pylori

## ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)

ผู้ป่วยที่เข้าโครงการวิจัยทุกคนจะได้รับการอธิบายถึงขั้นตอน และวิธีการในการวิจัย และให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (informed consent) ส่วนผลที่จะเกิดจากการตัดชิ้นเนื้อเพิ่มเติม อาจมีผลแทรกซ้อนซึ่งไม่แตกต่างจากการตรวจวินิจฉัยทั่วไป ที่พบได้คือการมีเลือดซึมออกจากบริเวณที่ตัดชิ้นเนื้อแต่สามารถหยุดได้เองหรือให้การรักษาด้วยวิธีฉีดยา adrenaline บริเวณรอยแผล

## อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to solve the problems)

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้น

อุปกรณ์ส่งกล้องชำรุด

