

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### ระเบียบวิธีการวิจัย

#### 1. ประชากรที่ศึกษา (Population)

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ทำการศึกษาในผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 15 ปี ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี

กฎเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้ารับการศึกษ ( Inclusion Criteria )

1. อายุน้อยกว่า 15 ปี
2. เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยอาการไข้
3. ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกเข้าได้กับการติดเชื้อไวรัสเดงกีและมีผลการตรวจทาง

ห้องปฏิบัติการเบื้องต้นเข้าได้กับการติดเชื้อไวรัสเดงกี

กฎเกณฑ์การคัดเลือกรอกจากการศึกษ ( Exclusion Criteria )

1. มีโรคประจำตัวที่อาจมีผลต่อ coagulation factor
2. ผล serology พบว่าไม่สามารถยืนยันว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี
3. ผู้ปกครองไม่ยินยอมให้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย

#### 2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

จากการศึกษาของ กิตติยา เศรษฐไกรสิงห์ เป็นการศึกษาระยะยาวของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน D-dimer สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ในผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสเดงกี พบว่าผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน D-dimer สัมพันธ์กับไข้เลือดออกคือมีความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น ODD ratio = 5.71 และ ทราบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของ DD ใน DHF = 0.74

ดังนั้นในการคำนวณขนาดตัวอย่างกำหนดให้

$$\begin{aligned} \alpha &= 0.05 \\ \beta &= 0.10 \\ Z_{\alpha/2} &= Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)} \\ Z_{\beta} &= Z_{0.10} = 1.28 \end{aligned}$$

$$n/\text{group} = \frac{(Z_{\alpha/2} \sqrt{2PQ} + Z\beta \sqrt{(P_1Q_1 + P_0Q_0)})^2}{(P_1 - P_0)^2}$$

P0	=	อัตราการเพิ่มขึ้นของDDในDHF	= 0.74
R	=	ODD ratio	= 5.71
P <sub>1</sub>	=	P <sub>0</sub> R / (1 + P <sub>0</sub> (R-1))	= 0.94
P	=	(P <sub>1</sub> + P <sub>0</sub> ) / 2	= 0.84
Q	=	1 - P	= 0.16
N	=	ขนาดตัวอย่าง	

N = 68 คน

ทำการศึกษาในประชากรเป้าหมายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยกำหนดจำนวนผู้ป่วยที่จะศึกษาเป็นจำนวน 90 คน

### 3. การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

การเก็บตัวอย่าง (Sample collection and storage)

การเจาะเก็บเลือดทำโดยแพทย์ประจำหอผู้ป่วย

การเจาะเลือดทำการเจาะเลือดบริเวณมือหรือแขนบริเวณเส้นเลือดดำ

1. clot blood จำนวน 2 ซี.ซี. ในวันรับเข้าอนโรงพยาบาล และในวันก่อนออกจากโรงพยาบาล เพื่อส่งตรวจยืนยันชั้นการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคไข้เลือดออก (Dengue Antibody Titer) โดยการตรวจด้วยวิธี ELISA และ แยกซีโรทัยป์ โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ทำการตรวจโดยสถาบันวิจัยแพทย์ทหาร Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS)
2. การตรวจวัดค่าโปรตีนดีไคเมอร์ จะนำเลือด whole blood มาตรวจโดยวิธี Semiquantitative System (Simpli Red, AGEN Biomedical Limited; Brisbane, Australia) ถ้ามีโปรตีนดีไคเมอร์ การตรวจนี้จะเกิดเม็ดเลือดแดงตกตะกอน ในการตรวจแต่ละครั้ง เราจะใส่เลือดอย่างน้อย 10 ไมโครกรัม

- (ประมาณ 1 หยดจากปลายเข็ม) ในแอ่งทดสอบ แล้วผสมกับน้ำยา 2 นาที ตามคู่มือจากผู้ผลิตชุดทดสอบ ถ้าไม่มีการตกตะกอน แสดงว่าไม่มีโปรตีนดีไคเมอร์ โดยยืนยันได้จากการทดสอบแบบควบคุมผลลบ โดยหยดเลือดลงในแอ่งติดกันที่มีน้ำยาอีกชนิดหนึ่งอยู่ ถ้ามีการตกตะกอนก็แสดงว่ามีโปรตีนดีไคเมอร์ ค่าต่ำสุดที่ชุดทดสอบโปรตีนดีไคเมอร์แบบ Simpli Red นี้จะตรวจวัดได้ คือ 120 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งค่านี้เป็นค่าสูงสุดของระดับโปรตีนดีไคเมอร์ปกติ งานวิจัยในอดีตที่ใช้ระบบนี้ มีความแปรปรวนจากผู้สังเกตการณ์ภายในน้อยมาก
- การอ่านผลการตรวจปริมาณโปรตีนดีไคเมอร์ (DD) ผลที่ได้มี 2 แบบ
- 1) ไม่มีการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง แปลผลว่า ไม่มีโปรตีน D-dimer (DD negative , DD -)
  - 2) มีการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง แปลผลว่า มีโปรตีน D-dimer เพิ่มมากกว่าค่าปกติ (DD positive , DD +)

น้ำยาที่ใช้ทดสอบ DD ต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่ได้มาตรฐาน (อุณหภูมิ 2 – 6 องศาเซลเซียส)

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

- แบบสอบถามข้อมูลพื้นฐาน
- อุปกรณ์การเก็บเลือด
- SimpliRed DD testing

#### 4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

- ผู้ป่วยและ/หรือผู้ปกครองจะได้รับคำชี้แจงถึงความสำคัญและที่มาของการวิจัยและยินยอม ให้ผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยครั้งนี้
- บันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยเมื่อแรกรับโดยผู้วิจัยสอบถามจากผู้ป่วย บิดามารดา/ผู้ปกครองและข้อมูลจากเวชระเบียนผู้ป่วย บันทึกอาการทางคลินิก รวมทั้งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในวันแรกรับและวันที่จำหน่ายออกจากรพ. โดยการตรวจด้วยวิธี ELISA และ แยกซีโรทัยป์ โดยวิธี PCR ทำการตรวจโดยสถาบันวิจัยแพทยทหาร Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS)

- แบ่งเลือดจากตัวอย่างเลือดวันที่รับผู้ป่วยเข้าอนโรพยาบาลเพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณ D-dimer
- บันทึกการวินิจฉัยสุดท้ายโดยแบ่งตามความรุนแรงของโรคตาม WHO Criteria 1997 (ตารางที่ 1)<sup>6</sup>

ตารางที่ 1 WHO Criteria for classification of severity of dengue infection

<p>Criteria for dengue fever</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Headache , retroorbital pain, myalgia/ arthralgia, Rash</li> <li>▪ Hemorrhagic manifestation (petechiae and tourniquet test positive) leukopenia</li> </ul>
<p>Criteria for Dengue Hemorrhagic Fever</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Clinical: Positive tourniquet test, petechiae, ecchymosis or purpura, bleeding from mucosa injection sites or other sites ,hematemesis or melena</li> <li>▪ Lab: Thrombocytopenia (&lt; 100,000/mm<sup>3</sup>) <ul style="list-style-type: none"> <li>-Evidence of plasma leakage by one or more <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hemoconcentration (&gt; 20 % increase in hematocrit level or &gt; 20 % drop in hematocrit following treatment with fluids as compared to baseline)</li> <li>-Sign of plasma leakage ( pleural effusion , ascites or hypoproteinemia)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p>Criteria for dengue shock syndrome (DSS)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ All of DHF criteria plus sign of circulatory failure rapid and weak pulse ,narrow pulse pressure (&lt; 20 mmHg), Hypotension for age – cold and clammy skin and restlessness</li> </ul>

และแบ่งความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก Dengue Hemorrhagic Fever ออกเป็น 4 เกรด โดยอาศัยอาการเลือดออกและภาวะช็อก

เกรด 1 ไม่พบอาการเลือดออก การทดสอบทูนิเกตให้ผลบวก

เกรด 2 มีเลือดออกบริเวณผิวหนังหรืออวัยวะอื่น

เกรด 3 ชีพจรเบาเร็ว ความดันโลหิตต่ำหรือมี pulse pressure แคบ

เกรด 4 วัดความดันโลหิตไม่ได้ หรือค่าชีพจรไม่ได้

ข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยจะถูกบันทึกลงในแบบฟอร์มและทำการเก็บข้อมูลทั้งหมดลงในคอมพิวเตอร์เพื่อนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่อไป

## 2. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ( Mean  $\pm$  SD ) , ร้อยละ ( Percent ) , พิสัย ( range ) ความสัมพันธ์ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ได้แก่ เพศ อายุ ภาวะทางโภชนาการ การติดเชื้ออย่างปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ ชนิดซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกี การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนดีไคเมอร์ และความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกโดยใช้วิธี Chi-square การวิเคราะห์ทางสถิติจะเสร็จสมบูรณ์โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.5 ถ้า p ทั้งหมดที่  $\leq 0.05$  จะสันนิษฐานว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

## 3. งบประมาณ

งบประมาณที่จำเป็นต้องใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยประมาณ

- ค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวัดระดับไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยแพทยทหาร Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS)
- ค่าใช้จ่ายเก็บรวบรวมซีรัม (Sample collection) ประมาณ 100 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง ประมาณ 10,000 บาท
- ค่าใช้จ่ายในงานเอกสารและการพิมพ์ ประมาณ 5,000 บาท
- คิดเป็นค่าใช้จ่ายรวมประมาณ 15,000 บาท