

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยแบบการสังเกตเชิงวิเคราะห์แบบไปข้างหน้า (Observational Analytic Design ; Prospective study)

#### ระเบียบวิธีวิจัย

- ประชากรและตัวอย่าง

- \* ประชากรเป้าหมาย

- มารดาที่มีกลุ่มเลือดโอ ซึ่งมาคลอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

และทารก

- \* กฎเกณฑ์ที่คัดเลือกเข้ามาศึกษา

- เด็กทารกทุกรายที่เกิดจากมารดากลุ่มเลือดโอ ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเป็นทารกที่คลอดครบกำหนด (อายุครรภ์มากกว่าหรือเท่ากับ 37 สัปดาห์) หรือน้ำหนักแรกคลอดมากกว่าหรือเท่า 2,500 กรัม และผู้ปกครองยินยอมให้ทำการศึกษา

- \* กฎเกณฑ์การตัดออกจากศึกษา

- 1. ทารกที่ตรวจพบภาวะพ่วงเอนไซม์จี6พีดี, Rh incompatibility ภาวะติดเชื้อ (Neonatal sepsis), Cephalhematoma
    - 2. น้ำหนักน้อยกว่า 2,500 กรัม
    - 3. มีภาวะแทรกซ้อนระหว่างคลอด เช่น รกลอกก่อนกำหนด (abruptio placentae), รกเกาะต่ำ (placentae previa), ขาดออกซิเจน (perinatal asphyxia)
    - 4. ทารกที่ต้องจำหน่ายกลับบ้านก่อน 48 ชม.

- \* กลุ่มควบคุม (Control group)

- เด็กในกลุ่มควบคุม คือ ทารกกกลุ่มเลือดโอ ที่คลอดจากมารดากลุ่มเลือดโอ ซึ่งไม่เกิดภาวะ ABO incompatibility

- \* เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง

- เป็นการเลือกตัวอย่างตามความสะดวกของผู้ที่ทำการเก็บเลือดรก ของหญิงตั้งครรภ์ที่มาคลอดที่โรงพยาบาล (วิธี convenient sampling)

\* การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ในงานวิจัยประเภทที่ต้องการหาความสัมพันธ์ข้อมูลชนิดนับ

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

$$Z_\alpha = Z_{0.05} = 1.96 \text{ (two tailed)}$$

$$Z_\beta = Z_{0.1} = 1.28$$

$P_0$  = โอกาสที่กลุ่มควบคุม (ไม่มีภาวะบิลิรูบินสูงผิดปกติ) มี

ปัจจัยเสี่ยง

$$P_1 = P_0 R / [1 + P_0 (R - 1)]$$

$$P = (P_1 + P_0) / 2$$

$$Q = 1 - P$$

(ยอมรับ  $\alpha$  error = 0.05,  $\beta$  error = 0.10, power 0.90)

เนื่องจากยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษาในลักษณะนี้มาก่อน ทำให้ไม่สามารถทราบค่า  $P$ ,  $Q$  ได้ จึงกำหนดจำนวนผู้ป่วยที่จะศึกษาในขั้นต้น กลุ่มละ 26 ราย หรือจำนวน  $n$  ที่เก็บได้ภายในเวลาที่กำหนด คือ เดือนกันยายน ถึงธันวาคม พ.ศ. 2544

• การสังเกตและการวัด

1. น้ำหนัก (กรัม)

ชั่งน้ำหนักทารกที่ไม่ใส่เสื้อผ้า โดยใช้ตาชั่งเป็นแบบ balance scale ชื่อ detecto doctor's infant scale ผลิตโดย บริษัท detecto scale ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เมือง WEBB CITY มลรัฐ MO มีความละเอียดในการวัดถึง 10 กรัม เลขเครื่อง TP0012-27 ทำการวัดโดยพยาบาลประจำห้องคลอด

2. เพศ

3. อายุครรภ์ (สัปดาห์) โดยดูจากประวัติการฝากครรภ์

4. กลุ่มเลือดเอบีโอ

4.1 ของทารก ทำโดยวิธี cell grouping test tube method<sup>22</sup> โดยใช้น้ำยา anti-A, anti-B, anti-A,B ที่ผลิตโดยสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย อ่านผลด้วยตาเปล่าที่ 2 นาที

4.2 ของมารดา ทำโดยวิธี cell grouping test tube method<sup>22</sup> โดยใช้น้ำยา anti-A, anti-B, anti-A,B ที่ผลิตโดยสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย อ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) ด้วยตาเปล่าภายใน 2 นาที และ serum grouping โดยใช้น้ำยา

cell A, B และ O ที่ผลิตโดยสภากาชาดไทย อ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า

5. หมู่เลือด อาร์ เอช (ดี แอนติเจน)

โดยวิธี slide method<sup>22</sup> โดยใช้น้ำยา anti-D ที่ผลิตโดยสภากาชาดไทย

6. ระดับแอนติบอดีเอบีโอ ในมารดา

โดยใช้เทคนิค titration แบบ two fold serial dilution ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในปัจจุบันในคลังเลือด<sup>23</sup> โดยใช้น้ำยา anti-A, anti-B ที่ผลิตโดยสภากาชาดไทย อ่านผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (X10) อ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

7. DCT ในเลือดจากรก

วิธีตรวจอ้างอิงตามวิธีการตรวจ Direct Antiglobulin test ในคู่มือการปฏิบัติงานธนาคารเลือด โดยกองโรงพยาบาลภูมิภาค<sup>24</sup> อ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยตาเปล่า และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (10X)

ผลบวกคือ มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง อ่านระดับ grade เป็น 4+, 3+, 2+, 1+ หรือ w+

ผลลบคือ ไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

8. แอคทิวิตีของเอนไซม์จี6พีดี

โดยใช้เครื่องมือ Sigma Diagnostics Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase<sup>25</sup> ซึ่งใช้หลักการวัดอัตราการเพิ่มของการดูดซับ (absorbance) ของสาร NADPH (ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา  $G-6-P + NADP^+ \xrightleftharpoons{G-6-PDH} 6-PG + NADPH + H^+$ ) ที่ความยาวแสง 340 nm. ( $=\Delta A$ ) โดยใช้ G-6-PDH reagent แล้วนำมาคำนวณหา G6PDH enzymatic activity Enzymatic activity ที่ต่ำสุดที่เครื่องอ่านได้ (sensitivity) = 10.8 U/10<sup>12</sup>Rbc และมี specificity สูง เนื่องจาก reagent ที่ใช้ สามารถยับยั้งการเกิด NADPH เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารอื่น และจากการตรวจใน 27 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวัด activity เปรียบเทียบกับวิธีการของ Marks (method of Marks)<sup>26</sup> พบว่าค่า correlation coefficient = 0.908 ในการศึกษาที่กำหนดว่า G6PDH activity < 80 U/100Rbc ถือว่ามีภาวะ G6PD deficiency

### 9. ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin)

ได้จากการวิเคราะห์ Complete Blood Count โดยวิธี automated electrical impedance analyzer โดยเครื่อง Technicon H●3 System<sup>27</sup> ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ Complete Blood Count โดยใช้หลักการดัดแปลงจากการวัด cyanmethemoglobin โดยวิธี manual ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาโดย International Committee for Standardization in Hematology<sup>28,29</sup> โดยค่า specification ของค่าฮีโมโกลบินที่อยู่ในช่วง 1 ถึง 26.5 g/dl มีค่าเบี่ยงเบนสูงสุด = 0.2 ค่าความแม่นยำในการวัด (accuracy) เปรียบเทียบกับ Technicon H●1 System 50 ตัวอย่างที่ปรกติ ซึ่งทำการ calibrate ทุกครั้งตามคู่มือการใช้ พบว่าค่า  $r = 0.996$  และเปรียบเทียบกับ Technicon H●2 100 ตัวอย่าง ค่า  $r = 0.996$

### 10. ระดับบิลิรูบิน (มก./ดล.)

วัดระดับบิลิรูบินโดยผู้ทำวิจัย โดยใช้เครื่องมือ BiliCheck™ device ผลิตโดยบริษัท SPECT Rx, เมือง NORCROSS, USA ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้วัดระดับบิลิรูบินผ่านทางผิวหนัง โดยใช้หลักการ analyze multi-wavelength spectral reflectance และ set ค่าให้ได้สัมพันธ์กับระดับบิลิรูบินในเลือดให้ได้มากที่สุด เครื่องมือนี้ได้ผ่านการศึกษาคความแม่นยำ (Clinical accuracy) ในการตรวจระดับบิลิรูบิน เปรียบเทียบกับ HPLC ซึ่งเป็น Gold standard พบว่าค่า correlation ( $r$ ) = 0.929, SE = 1.18 มก./ดล.,  $P < 0.0001$ <sup>30</sup> (ภาคผนวก ง)

### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องซั่งน้ำหนักในห้องคลอด
2. น้ำยาตรวจกลุ่มเลือดเอบีโอ, อาร์ เอช
3. น้ำยาตรวจจี6พีดีแอนด์ทิวตี้
4. น้ำยาในการตรวจระดับแอนติบอดีเอบีโอ
5. น้ำยาตรวจ Direct Coombs Test
6. หลอดทดลองเก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 200 ตัวอย่าง
7. เครื่องมือ transcutaneous bilirubinometer

### การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เจ้าหน้าที่ห้องคลอดจะทำกรเก็บตัวอย่างเลือดจากรกหลังจากทำการคลอดรกแล้ว โดยใช้เข็มเจาะดูดเลือดจากเส้นเลือดดำที่ที่ทำการคลอดรก จำนวน 11 มล. แบ่งเก็บเลือด 5 มล. ในหลอดทดลองผสมน้ำยา EDTA, เลือด 3 มล. ในขวดน้ำยา ACD และเลือดในหลอดเปล่า 3 มล. และส่งห้องปฏิบัติการหลังจากเด็กคลอดภายใน 24 ชม. โดยตัวอย่างเลือดจะได้รับ

การติดชื่อชัดเจน ถ้าไม่สามารถส่งตรวจได้ภายในกำหนด จะเก็บตัวอย่างเลือดจากรกในตู้เย็น และส่งตรวจภายใน 48 ชั่วโมง

2. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจะนำตัวอย่างเลือดจากรก ทำการตรวจกลุ่มเลือด เอบีโอ, Direct Coombs test, อาร์ เอช (ดี) แอนติเจน และแอกทิวิตี้ของจี6พีดี ทันทีที่ได้รับตัวอย่างเลือดหรืออย่างช้าภายใน 48 ชั่วโมงหลังเด็กคลอด และบันทึกข้อมูล

3. ผู้วิจัยจะทำการซักประวัติการเจ็บป่วยของมารดา และชี้แจงแก่มารดาที่มาคลอดถึงจุดประสงค์ วิธีการทำวิจัย ผลดีและผลเสียที่ผู้ป่วยจะได้รับ ถ้ามารดาที่มาคลอดยินดีเข้าร่วมการศึกษา จะให้ผู้มาคลอดเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย หลังจากนั้นจึงทำการเจาะเลือดมารดาที่ยินยอมเข้าการศึกษาโดยเก็บเป็นเลือดจำนวน 3 –5 มล. เพื่อนำไปตรวจกลุ่มเลือดเอบีโอ, อาร์ เอช (ดี) แอนติเจน และระดับแอนติบอดีต่อกลุ่มเลือดเอบีโอ ที่จำเพาะต่อกลุ่มเลือดทารก และบันทึกข้อมูล

4. ผู้วิจัยจะทำการตรวจร่างกายทารกและตรวจข้อมูลระหว่างคลอด ว่าไม่มี hematoma หรือ ภาวะแทรกซ้อนระหว่างคลอด เช่น รกลอกตัวก่อนกำหนด ก็จะมีการตรวจระดับบิลิรูบินในเด็ก โดยใช้เครื่องมือวัดผ่านทางผิวหนัง (Transcutaneous bilirubinometer) ขณะเด็กอายุ 0-24, 24-48 ชั่วโมง และบันทึกข้อมูล

5. ผู้วิจัยจะทำการรวบรวมข้อมูลพื้นฐาน เช่น อายุครรภ์ เพศ น้ำหนัก และภาวะแทรกซ้อนระหว่างคลอด เช่น ภาวะรกลอกตัวก่อนกำหนด, รกเกาะต่ำ จากแฟ้มประวัติคนไข้ ซึ่งแพทย์ประจำห้องคลอดเป็นผู้บันทึก และข้อมูลที่ต้องการศึกษา เช่น แอกทิวิตี้ของเอนไซม์จี6พีดี, กลุ่มเลือดเอบีโอ, อาร์ เอช (ดี) แอนติเจน, Direct Coombs test, และระดับแอนติบอดีต่อกลุ่มเลือดเอบีโอ ที่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเป็นผู้บันทึก และผลการตรวจร่างกายเด็ก ลงในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูล แล้วนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์

### การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่าง เช่น อายุครรภ์ น้ำหนักแรกคลอด ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือดจากรก, ระดับบิลิรูบิน ขณะอายุ 0-24 ชม. และอายุ 24-48 ชม. คำนวณเป็นค่าเฉลี่ย

2. เปรียบเทียบข้อมูล ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือดจากรก, ระดับบิลิรูบิน ขณะทารกอายุ 0-24 ชม. และอายุ 24-48 ชม. ระหว่างทารกกลุ่มเลือดเอหรือบี กับกลุ่มทารกกลุ่มเลือดโอ โดยใช้ T test

3. คำนวณอุบัติการณ์การเกิดภาวะระดับบิลิรูบินสูงผิดปกติของกลุ่มทารกกลุ่มเลือดเอหรือบี และทารกกลุ่มเลือดโอ คิดเป็นร้อยละ

4. คำนวณค่าความเสี่ยงสัมพัทธ์ (Relative Risk, R.R.) และ ค่าความเชื่อมั่น 95% (95% CI of R.R.) ของทารกกลุ่มเลือดเอหรือบี ต่อการเกิดภาวะระดับบิลิรูบินสูงผิดปกติ เทียบกับทารกกลุ่มเลือดโอ โดยใช้ programme Epi Info Version 6

5. คำนวณค่าความเสี่ยงสัมพัทธ์ (Relative Risk, R.R.) และ ค่าความเชื่อมั่น 95% (95% CI of R.R.) ของทารกกลุ่มเลือดเอหรือบี ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะระดับบิลิรูบินสูงผิดปกติ เทียบกับทารกกลุ่มเลือดเอหรือบี ที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงโดยใช้ programme Epi Info Version 6

6. นำเสนอข้อมูลเป็นตาราง