บทที่ 3
วิธีการดำเนินการ

เพื่อประเมินถึงคุณสมบัติของ urease test ที่ผลิตขึ้นเองและ CLO test ®ในแง่ของความไว ความจำเพาะและความแม่นยำในการตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหารโดยเทียบกับการตรวจมาตรฐานคือ การตรวจทางวิทยาฮิสโต

รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยหาคุณสมบัติของ Diagnostic test คือ urease test ที่ผลิตขึ้นเองและ CLO test ®

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย คือ ผู้ป่วยที่มารับการส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหารทุกราย

ประชากรตัวอย่าง คือผู้ป่วยที่มารับการส่องกล้องที่ห้องส่องกล้องสาขาวิชา โรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้วตรวจพบว่ามีข้อบ่งชี้ในการตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori*

คุณสมบัติของผู้ป่วยที่เข้าในการวิจัย

ผู้ป่วยทุกรายที่มารับการส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหารที่ห้องส่องกล้องสาขาวิชาโรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้คือ

1. ผลการส่องกล้องพบข้อบ่งชี้ที่จะตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* ดังต่อไปนี้คือ
   1.1 ผู้ป่วยแผลในกระเพาะอาหาร (GU) หรือแผลในลำไส้เล็กส่วนต้น (DU)
   1.2 ผู้ป่วยมะเร็งในกระเพาะอาหาร (gastric carcinoma)
   1.3 ผู้ป่วยที่มีกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis)
2. ผู้ป่วยยินยอมให้ศึกษาโดยลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมศึกษา

คุณสมบัติของผู้ป่วยที่ไม่เข้าในการวิจัย

1. ผู้ป่วยที่เคยได้รับยาปฏิชีวนะหรือได้รับยาลดกรดกลุ่มต้านโปรตอนปั๊ม (proton pump inhibitor) ภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 เดือนก่อนร่วมโครงการวิจัย (การที่ไม่เลือกผู้ป่วยที่เคยได้รับยาปฏิชีวนะ หรือ ได้ยาลดกรด กลุ่มโปรตอนปั๊มมานานไม่เกิน 4 สัปดาห์เพราะยาปฏิชีวนะอาจทำให้เชื้อมีจำนวนน้อยลง, เปลี่ยนเป็น coccoid form หรือกระจายเป็นหย่อมๆ ทำให้การตรวจด้วยวิธี rapid urease test ทั้ง CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง หรือการตรวจทางวิทยาฮิสโตได้ผลลบปลอมได้ ส่วนการได้ยากลุ่มโปรตอนปั๊มนั้น ยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งurease enzymeทำให้ urease test ทั้ง 2 วิธีได้ผลลบปลอม รวมทั้งหลังได้รับยาเชื้อจะลดลงบริเวณ antrum ทำให้การตรวจทั้งวิธี urease test และ วิทยาฮิสโต มีโอกาสได้ผลลบปลอม)
2. ผู้ป่วยที่มีประวัติเคยได้รับการรักษาหรือกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* มาก่อนเนื่องจากจะทำให้ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษามีผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* มากกว่าความเป็นจริง
3. ผู้ป่วยที่อาจมีภาวะเลือดออกผิดปกติซึ่งถือเป็นข้อห้ามในการทำการตัดชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหารมาตรวจได้แก่
   - 3.1 มีเกร็ดเลือดต่ำกว่า 70,000 ต่อลบ.มิลลิลิตร
   - 3.2 มีการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ คือค่า prothrombin time มากกว่าค่า control 3 วินาที

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

คำนวณขนาดตัวอย่างในการศึกษาหาคุณสมบัติของ diagnostic test

จากสูตร $$n = \frac{Z_{\alpha}^{2} P(1-P)}{d^{2}}$$

n = จำนวนขนาดตัวอย่างของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori*

Z_{α} = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐานที่ alpha error 5% = 1.96

P = ความไวของการตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิทยาฮิสโต = 0.90 หรือ ร้อยละ 90

d = ความแตกต่างของผลการตรวจทั้ง 2ชนิด กำหนดให้ไม่เกิน 0.1 หรือ 10%

จากการแทนค่าตามสูตร จะได้ขนาดตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ดังนี้

$$n = \frac{(1.96)^2\ (0.9)\ (0.1)}{(0.1)^2} = 34.75 \text{ ราย}$$

จากข้อมูลความชุกของการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในผู้ป่วยที่ได้รับการส่องกล้องที่ห้องส่องกล้องตึกพร้อมพันธ์ เท่ากับร้อยละ 55

ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยที่จะเข้าการศึกษาทั้งสิ้นเท่ากับ

$$\frac{100 \times 34.57}{55} = 62.85 = 63 \text{ ราย}$$

การรวบรวมข้อมูล

ผู้ทำการวิจัยจะอธิบายผู้ป่วยให้เข้าใจถึงความสำคัญของการวิจัยนี้ และยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมการรักษาแล้วจึงทำการซักประวัติ ศึกษาข้อมูลจากแฟ้มประวัติ และส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหารแล้วจึงบันทึกข้อมูลลงในแบบรายงานผู้ป่วย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ผู้ป่วยที่มารับการส่องกล้องตรวจจะได้รับการแจ้งให้ทราบถึงวิธีการวิจัย ที่อาจจะมีการตัดชิ้นเนื้อในกระเพาะเพิ่มขึ้นจากปกติ 4 ชิ้น ในกรณีที่ถูกเลือกเข้าโครงการวิจัย ซึ่งการหายของแผลที่เกิดขึ้นจากการตัดชิ้นเนื้อ จะเกิดขึ้นเร็วมากและมีภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้นน้อยมาก
2. ผู้ป่วยที่ได้รับการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหาร และพบพยาธิสภาพที่มีข้อบ่งชี้ในการตัดชิ้นเนื้อตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* ตามหลักเกณฑ์การคัดเลือกเข้าและคัดออก จะรับเข้าไว้ในโครงการวิจัย
3. ผู้ป่วยจะได้รับการส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหาร โดยจะทำการตรวจเหมือนกับการตรวจตามปกติ ของห้องส่องกล้องสาขาวิชาทางเดินอาหารดังต่อไปนี้คือ
   3.1 ผู้ป่วยจะได้รับการแนะนำให้อดน้ำและอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมง. ก่อนทำการตรวจ
   3.2 ผู้ป่วยจะได้รับการอธิบายถึงวิธีการตรวจก่อนทำการตรวจ

3.3 ผู้ป่วยที่มีฟันปลอม, แว่นตา จะได้รับการแนะนำให้ถอดออกก่อนทำการตรวจ

3.4 ให้ผู้ป่วยนอนลงบนเตียงตรวจโดย นอนตะแคงซ้ายหันหน้าเข้าหาแพทย์ผู้ตรวจ

3.5 ผู้ป่วยจะได้รับการพ่นยาชาที่คอโดยใช้ Xylocaine spray จนรู้สึกชาบริเวณลำคอ

3.6 ผู้ป่วยจะได้รับการใส่ mouth guard ให้อยู่ระหว่างฟันบนและฟันล่างของผู้ป่วย เพื่อป้องกันความเสียหาย ที่จะเกิดกับกล้องส่องจากการถูกฟันผู้ป่วยกัด

3.7 ศีรษะของผู้ป่วยและ mouth guard จะได้รับการจับประคอง โดยผู้ช่วยพยาบาล เพื่อให้ศีรษะผู้ป่วยก้มลงเล็กน้อย เพื่อความสะดวกในการใส่กล้องตรวจและเพื่อป้องกันการเลื่อนของ mouth guard

3.8 แพทย์ผู้ทำการส่องกล้องตรวจจะใช้มือซ้ายจับกล้องในส่วนที่ใช้ควบคุม การเคลื่อนไหวปลายกล้อง ส่วนมือขวาจับสายกล้องเพื่อสอดเข้าหรือดึงออกจากตัวผู้ป่วย

3.9 ก่อนใส่สายกล้องเข้าภายในปากผู้ป่วยจะทำการหล่อลื่นปลายสายด้วยเจล เพื่อให้กล้องเคลื่อนผ่านลำคอของผู้ป่วยได้โดยสะดวก

3.10 หลังจากนั้นแพทย์จะทำการใส่สายกล้องตรวจดูภายในลำคอ หลอดอาหาร . กระเพาะอาหาร, หูรูดกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้นตามลำดับ โดยดูจากจอทีวี

4. ผู้ป่วยที่ตรวจพบความผิดปกติที่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* จะได้รับการตัดชิ้นเนื้อ จากกระเพาะอาหาร เพื่อตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* รวม 6 ชิ้น โดยตัดที่ antrum 3 ชิ้น (บริเวณห่างจาก pylorus ไม่เกิน 2 ซม.) และที่ body อีก 3 ชิ้น โดยใช้ biopsy forcepการที่ต้องตัดชิ้นเนื้อตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* ทั้งที่ antrum และ body นั้นเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจ เนื่องจากในกรณีที่ผู้ป่วยเคยได้รับยาลดกรดมาก่อน เชื้อบริเวณ antrum จะน้อยลงจนอาจตรวจไม่พบ แต่บริเวณ body จะยังคงมีเชื้ออยู่

5. หลังจากตัดชิ้นเนื้อแล้วจะใส่ชิ้นเนื้อจากบริเวณ antrumและ body อย่างละ 1 ชิ้นลงใน CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง ก่อน โดยใช้ปลายเข็มปราศจากเชื้อ เขี่ยชิ้นเนื้อจากที่ตัดชิ้นเนื้อใส่ลงไปใน gel ของ CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง ตามลำดับโดยจะทำการเปลี่ยนเข็มทุกครั้ง ส่วนชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจทางวิทยาฮิสโต จะใช้เข็มเขี่ยใส่ลงไปในภาชนะส่งบรรจุ ฟอร์มาลิน (formalin) เป็นอันดับสุดท้าย การที่ต้องใช้เข็มปลอดเชื้อเขี่ยชิ้นเนื้อออกจากที่ตัดชิ้นเนื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจมีคุณสมบัติสร้างurease enzymeได้ทำให้เกิดผลบวกปลอม และการที่ต้องตัดชิ้น

เนื้อแล้วใส่ลงใน CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง ก่อนใส่ชิ้นเนื้อลงในขวดฟอร์มาลิน เพื่อส่งตรวจทางวิทยาฮิสโตนั้น ก็เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนฟอร์มาลินของชิ้นเนื้อที่ใส่ลงใน CLO test® หรือ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง ซึ่งจะทำให้เชื้อตาย และให้ผล CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง ลบปลอมได้

6. หลังจากใส่ชิ้นเนื้อลงใน CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง แล้วจะอ่านผลที่ 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลที่ได้รับจะบันทึกไว้ในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูล โดยการเปลี่ยนสีของ CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง จากสีเหลืองเป็นสีชมพู หรือแดงภายใน 24 ชั่วโมง ถือว่าได้ผลบวก ในกรณีที่ไม่เปลี่ยนสีภายใน 24 ชั่วโมง ถือว่าได้ผลลบ และในกรณีที่ได้ผลลบผู้ทำการวิจัยจะเก็บไว้ดูการเปลี่ยนสีต่ออย่างน้อยจนครบ 72 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนสีดังกล่าวจะสามารถแยกได้อย่างชัดเจนระหว่างผลบวกและลบซึ่งทำให้ไม่มีปัญหาในการแปลผล
7. ชิ้นเนื้อจาก antrum และ body อย่างละ 1 ชิ้น จะบรรจุลงในภาชนะส่งตรวจทางวิทยาฮิสโต ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทำการตรวจโดยการย้อมด้วย Hematoxylin and Eosin และ Giemsa stain แล้วทำการอ่านผลโดยพยาธิแพทย์คนเดียวกันซึ่งไม่ทราบผลของ CLO test®, urease test ที่ผลิตขึ้นเอง และผลรายงานอย่างเป็นทางการทางวิทยาฮิสโตของแผนกพยาธิวิทยา การพบแบคทีเรียติดสีแกรมลบโดยการย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and Eosin หรือติดสีน้ำเงินเข้ม (dark blue) ในใต้ชั้น mucus ของกระเพาะ อาหารเหนือต่อเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร หรือบริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ถือว่าได้ผลบวก

การเตรียม urease test ที่ผลิตขึ้นเอง

สำหรับ urease test ที่ผลิตขึ้นโดยภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดัดแปลงมาจาก urease test ที่ใช้ทดสอบ *Proteus spp.* ประกอบด้วย urea agar base (BBL®) ผลิตโดยบริษัท Becton Dickinson(Microbiology Systems Cookey sville M D. 21030,USA.) โดยผสม urea agar base 29 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง(filtration) หลังจากนั้นนำมาผสมกับ agar ซึ่งเตรียมโดยการผสม agar 5 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที (รอจนอุณหภูมิเย็นลงเหลือ 50 °C จึงผสมกับสารละลาย urea agar base) ปรับ pH เหลือประมาณ 6.0 แล้วแบ่งใส่ในหลอดพาสติกใสขนาดเล็ก หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร มีฝาปิดมิดชิด ส่วนผสมของ urea agar base ที่ผสมแล้ว 1,000 มิลลิลิตร จะมีส่วนประกอบดังนี้

Pancreatic Digest Gelatin	1	gm
Dextrose	1	gm
Sodium Chloride	5	gm
Potassium Phosphate	2	gm
Urea	20	gm
Phenol red	0.012	gm

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผู้ทำการวิจัยจะทำการซักประวัติโดยเฉพาะประวัติการรับประทานยาในอดีต รวมทั้งการศึกษาจากแฟ้มประวัติผู้ป่วย และบันทึกประวัติที่สำคัญรวมทั้งข้อมูลที่ได้จากการส่องกล้อง, ผล CLO test®, urease test ที่ผลิตขึ้นเอง และผลการตรวจทางวิทยาฮิสโต ลงในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูล

2. การวิเคราะห์ข้อมูลจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS 7.5 for Window ดังต่อไปนี้

2.1 วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐาน เช่น อายุ เพศ ข้อบ่งชี้ในการส่องกล้องตรวจภายในกระเพาะอาหาร ผลการตรวจด้วยการส่องกล้อง โดยใช้ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย

2.2 คำนวณ ค่าความไว,ความจำเพาะ ,positive predictive value,negative predictive value, และ ความแม่นยำของ CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง เทียบกับการตรวจมาตรฐาน คือการตรวจโดยวิทยาฮิสโต โดยใช้ 2x2 table

3. วิเคราะห์เปรียบเทียบผลการตรวจด้วยวิธี urease test ชนิด CLO test® และ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง กับการตรวจทางวิทยาฮิสโต และระหว่าง CLO test® กับurease test ที่ผลิตขึ้นเองโดยดู degree of agreement ที่ได้จากการคำนวณโดยวิธี Kappa analysis

การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน

ขั้นตอนดำเนินงาน	พ.ศ. 2540		พ.ศ. 2541							
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
1. ขั้นเตรียมการ										
- ศึกษาค้นคว้า, หาข้อมูล	—	—								
- ทำ pilot study	—	—	—							
- เสนอโครงการ		—	—							
2. ขั้นปฏิบัติการ										
- คัดเลือกผู้ป่วย		—	—	—	—	—	—			
- ตรวจทางห้องปฏิบัติการ		—	—	—	—	—	—			
- เก็บข้อมูล		—	—	—	—	—	—			
3. ขั้นวิเคราะห์และแปรผล						—	—	—	—	
4. สรุปผลและเขียนรายงาน								—	—	—

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตราการในการแก้ไข

ปัญหาด้านการเตรียม urease test ที่ผลิตขึ้นเองแก้ไขโดยการประสานงานกับภาควิชาจุลชีววิทยาซึ่งจะช่วยผลิตและควบคุมคุณภาพของ urease test ที่ผลิตขึ้นเอง ซึ่งการผลิตและควบคุมคุณภาพมีปัญหาน้อยเนื่องจาก urease test ดังกล่าวเป็นสารเคมีสำเร็จรูปมาจากบริษัทผู้ผลิตแล้วเพียงแต่นำมาทำละลายและผสมใน agar แล้วปรับ pH ให้เหมาะสมเท่านั้น

ปัญหาทางด้านจริยธรรม

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีปัญหาทางด้านจริยธรรมน้อยเนื่องจากผู้ป่วยทุกรายที่เข้ารับการศึกษามีข้อบ่งชี้ในการส่องกล้องตรวจและการตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* อยู่แล้วเพียงแต่ทำการตัดเพิ่มขึ้นเพียง 2 ชิ้นในรายที่มีข้อบ่งชี้อื่นในการตรวจทางวิทยาฮิสโตอยู่แล้ว เช่น แผลในกระเพาะอาหารหรือมะเร็งในกระเพาะอาหาร ส่วนรายที่ไม่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจทางวิทยาฮิสโตจะตัด

เพิ่มขึ้นเป็น 4 ชิ้น ซึ่งการตัดชิ้นเนื้อดังกล่าวมีขนาดเล็กมาก แทบไม่มีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนเลยในผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดและการแข็งตัวของเลือดปกติ

งบประมาณ

ค่าตรวจทางฮิสโตวิทยา รายละ 300 บาท เป็นเงิน 63x300 =18,900 บาท
ค่าวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้เตรียม urease test ที่ผลิตขึ้นเอง = 1,000 บาท
ค่ากระดาษและวัสดุอื่นๆที่ใช้ประกอบการทำวิจัย = 1,000 บาท
รวมเป็นเงินทั้งสิ้น =20,900 บาท