บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 หลอดเก็บเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง

3.1.2 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10 ไมโครลิตรพร้อม pipette tip

3.1.3 หลอดทดลองขนาด 10x75 มิลลิเมตร พร้อมจุกยาง

3.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.1.5 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

3.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electronic balance)

3.1.8 ชุดแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า (eletrophoresis set ;Helena Laboratory; U.S.A.)

3.1.9 เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (electronic cell counter ;Coulter Max M; Coulter, U.S.A.)

3.2 สารเคมี

3.2.1 boric acid

3.2.2 blood cell control

3.2.3 carbontetra chloride (CCl_4)

3.2.4 cellulose acetate membrane

3.2.5 ethylene diamine tetra acetate (EDTA)

3.2.6 glacial acetic acid

3.2.7 methanol

3.2.8 Ponceau S staining

3.2.9 potassium cyanide (KCN)

3.2.10 sodium chloride (NaCl)

3.2.11 trichoroacetic acid

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เลือดจากสายสะดือเด็กทารกที่มาคลอดที่โรงพยาบาลนครนายกระหว่างเดือนมิถุนายนถึงธันวาคม 2541 จำนวน 490 ราย โดยเก็บเลือดจำนวน 3 มิลลิลิตรใช่หลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตรที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

3.4 วิธีเตรียมน้ำยา

ก. tris-EDTA-borate buffer pH 8.6

tris base	10.3 กรัม
EDTA (disodium salt)	0.6 กรัม
boric acid	3.4 กรัม
เติมน้ำให้ครบ	1 ลิตร

ข. Ponceau S staining (0.5% w/v)

Ponceau S powder	0.5 กรัม
trichloroacetic acid	5 กรัม
เติมน้ำให้ครบ	100 มิลลิลิตร

ค. destaining solution (5% v/v)

acetic acid	5 มิลลิลิตร
เติมน้ำให้ครบ	100 มิลลิลิตร

ง. clearing solution

methanol	800 มิลลิลิตร
glacial acetic acid	200 มิลลิลิตร

จ. normal saline solution

NaCl	9 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1 ลิตร

3.5 การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน (hemolysate)

นำเลือดจากสายสะดือจำนวนประมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิลิตรมาปั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วย normal saline solution ในอัตราส่วน 1:10 ครั้งสุดท้ายดูดเอาน้ำละลายส่วนใส (supernatant) ทิ้งไปให้เหลือเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก โดยเติมน้ำกลั่นในปริมาตร 1.5 เท่าของเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย เสร็จแล้วเติม CCl_4 ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ ปิดด้วยจุกยางให้แน่น เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสารละลายประมาณ 5 นาที หลังจากนี้นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาทีเสร็จแล้วดูดเอาสารละลายส่วนบนที่เป็นน้ำละลายฮีโมโกลบินไปตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis

3.6 การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี Hb electrophoresis

นำแผ่น cellulose acetate membrane แช่ใน tris-EDTA-borate buffer pH 8.6 นาน 10 นาทีแล้วนำ cellulose acetate membrane ดังกล่าวมาซับด้วยกระดาษกรองเสร็จแล้วหยดน้ำละลายฮีโมโกลบินลงบนแผ่น cellulose acetate membrane ด้วยอุปกรณ์สำหรับหยดน้ำละลายฮีโมโกลบิน (sample application) โดยให้ห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 1 นิ้ว นำไปวางลงในกล่องที่ใส่ tris-EDTA-borate buffer pH 8.6 ไว้เรียบร้อยแล้ว และมีตัวนำไฟฟ้าซึ่งปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ใน tris-EDTA-borate buffer pH 8.6 หลังจากนี้ปล่อยกระแสไฟฟ้าขนาด 255 โวลต์ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีแล้วนำแผ่น cellulose acetate membrane มาย้อมด้วยสี Ponceau S โดยแช่ลงในกล่องย้อมสีนาน 5 นาที นำไปแช่ใน destaining solution เพื่อล้างสีส่วนเกินออกจนกระทั่งสะอาดแล้วนำไปแช่ต่อใน clearing solution นาน 30 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่ใน clearing solution นาน 30 นาที แล้วนำไปอบให้แห้งที่ 55°ซ อ่านผล Hb electrophoresis เพื่อหา Hb Bart's[24]

3.7การตรวจเพื่อหาค่าชี้วัดทางโลหิตวิทยา

นำตัวอย่างเลือดที่จากสายสะดือเด็กที่ใส่ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (Coulter Max M; Coulter, U.S.A.) เพื่อหาค่า Hb, Hct, RBC count, MCV, MCH, MCHC และ RDW

3.8 การจำแนกกลุ่มโดยใช้ค่าชี้วัดทางโลหิตวิทยา

3.8.1 ชนิดของกลุ่มที่ทำการศึกษา

ในการศึกษาได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มตาม Hb ดังนี้ กลุ่มทารกปกติ (ไม่เป็นพาหะของธาลัสซีเมีย) หมายถึงทารกที่มีผล Hb electrophoresis เป็น "FA" และกลุ่มทารกที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา(α thalassemia trait) หมายถึงทารกที่มีผล Hb electrophoresis เป็น "FABart's"

3.8.2 หลักการของการจำแนกกลุ่ม

ในการศึกษาประสิทธิภาพของข้อมูลทางโลหิตวิทยาทำโดยคำนวณหาความน่าจะเป็นของการกระจายตัวปกติ (normal distribution) ของข้อมูลทางโลหิตวิทยาที่ต้องการศึกษาโดยคำนวณจากสมการ

$$f(i) = \frac{1}{SD\sqrt{2\pi}} e^{-(Xi-mean)^2/2SD^2}$$

เมื่อ Xi = ค่าที่ต้องการหาค่าความน่าจะเป็น

mean = ค่ากลางเลขคณิต

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน[25]

วิธีการทำโดยใช้ ข้อมูลทางโลหิตวิทยาที่ต้องการศึกษา เข้าสูตรดังกล่าวเพื่อคำนวณหาค่าความน่าจะเป็นของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เปรียบเทียบความน่าจะเป็นของแต่ละกลุ่มตัวอย่างเมื่อใช้ข้อมูลทางโลหิตวิทยาชนิดนั้นๆ คำนวณ สรุปความน่าจะเป็นว่าจะจัดอยู่กลุ่มใดโดยดูจากความน่าจะเป็นสูงสุดที่คำนวณได้ว่าตรงกับกลุ่มใด และคำนวณประสิทธิภาพของ ประสิทธิภาพของข้อมูลทางโลหิตวิทยาโดยเปรียบเทียบผลที่สรุปได้จากการคำนวณกับผลที่ได้จาก Hb electrophoresis ออกมาในรูปของ

ก. ความไว(sensitivity) หมายถึง ความถูกต้องในการทำนายผลบวกของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis

ข. ความจำเพาะ(specificity) หมายถึง ความถูกต้องในการทำนายผลลบของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis

ค. ค่าทำนายผลบวก(positive predictive value) หมายถึง ความน่าจะเป็นของผลบวกจากการทำนายผลบวกของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis

ง. ค่าทำนายผลลบ(negative predictive value) หมายถึง ความน่าจะเป็นของผลลบจากการทำนายผลลบของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis

จ. ผลบวกปลอม(false positive) หมายถึง ความไม่ถูกต้องในการทำนายผลบวกของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis

ฉ. ผลลบปลอม(false negative) หมายถึง ความไม่ถูกต้องในการทำนายผลลบของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis

ช. ประสิทธิภาพ (efficiency) หมายถึง ความถูกต้องในการทำนายผลบวกและผลลบของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับ Hb electrophoresis[26]

ตารางที่ 3 แสดงวิธีคำนวณหาประสิทธิภาพของข้อมูลทางโลหิตวิทยาเมื่อเทียบกับผล Hb electrophoresis

ผลจากข้อมูลทางโลหิตวิทยา	ผลจาก Hb electrophoresis		
	ผลบวก	ผลลบ	รวม
ผลบวก	TP	FP	TP+FP
ผลลบ	FN	TN	TN+FN
รวม	TP+FN	FP+TN	TP+FP+TN+FN

ความไว = (TP/(TP+FN))x100

ความจำเพาะ = (TN/(FP+TN))x100

ค่าทำนายผลบวก = (TP/(TP+FP))x100

ค่าทำนายผลลบ = (TN/(TN+FN))x100

ผลบวกปลอม = (FP/(TP+FP+TN+FN))x100

ผลลบปลอม = (FN/(TP+FP+TN+FN))x100

ประสิทธิภาพในการจำแนก = (TP+TN)/(TP+FP+TN+FN)x100

3.8.3 วิธีการวิเคราะห์

ก. single parameter analysis เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของข้อมูลทางโลหิตวิทยาทีละชนิดทั้ง 7 ชนิดคือ RBC count, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC และ RDW ในการจำแนกทารกปกติ และทารกที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา โดยรายงานผลออกมาในรูปของความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ ผลบวกปลอม ผลลบปลอมและประสิทธิภาพของการจำแนก

ข. multi parameter analysis เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของข้อมูลทางโลหิตวิทยาร่วมกันตั้งแต่ 2 ชนิดเพื่อจำแนกทารกปกติ และทารกที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา โดยรายงานผลออกมาในรูปของความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ ผลบวกปลอม ผลลบปลอมและประสิทธิภาพของการจำแนก

ค. Discrimination index (DI) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของ DI ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณในรูปของสมการ และนำค่า DI เหล่านั้นมาใช้จำแนกทารกปกติและทารกที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา โดยรายงานผลออกมาในรูปของความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ ผลบวกปลอม ผลลบปลอมและประสิทธิภาพของการจำแนก สมการที่ใช้ใน

การคำนวณในการศึกษานี้เป็นสมการที่เคยมีการใช้ในการจำแนกระหว่างพาหะของธาลัสซีเมีย (thalassemia trait) กับภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งสมการที่นำมาใช้ได้แก่

- DI = Hb / RBC count [27]
- DI = Hct / Hb [27]
- DI = MCV / RBC count [28]
- DI = MCH / RBC count [27]
- DI = MCV^2 x MCH [26]
- DI = (MCVxRDW)/(Hbx100) [28]
- DI = MCV-RBC count-(5xHb) [29]

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學