บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การคัดเลือกประชากรที่จะทำการศึกษา</u>

เนื่องจากงานวิจัยเกี่ยวข้องกับกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน ข้อมูลที่ได้เป็นแบบไม่ต่อเนื่อง และวัดค่าผลการทดลองในรูปสัดส่วน (proportion) จึงใช้สูตรในการคำนวณขนาดตัวอย่างคือ

$$n = \frac{\left(Z\alpha\sqrt{2\bar{P}\bar{Q}} + Z\beta\sqrt{PcQc + PtQt}\right)^2}{(Pc - Pt)^2}$$

Z_{α} = ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนดความเชื่อมั่น 95% = 1.96

Z_{β} = ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนด power of the test 90% = 1.28

P_t = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มศึกษา = 0.88

P_c = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มควบคุม = 0

$Q_c = 1 - P_c = 1$, $Q_t = 1 - P_t = 0.12$

$\bar{P} = (Pc+Pt) / 2 = 0.44$

$\bar{Q} = 1-\bar{P} = 0.56$

ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม $= \frac{\left(1.96\sqrt{(0.44)(0.56)} + 1.28\sqrt{(0)(1)+(0.88)(0.12)}\right)^2}{(0-0.88)^2}$

$= 4.2 \sim 5$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้นจะต้องใช้ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม กลุ่มละ 5 คนเป็นอย่างน้อย

ผู้ทดลองจึงทำการเก็บตัวอย่างให้ได้มากที่สุดในช่วงที่กำหนดระยะเวลาการศึกษาไว้ (เมษายน 2552 – เมษายน 2553) โดยเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดในการทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้กลุ่มตัวอย่างในการศึกษา 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าตายจากการจมน้ำจำนวน 12 ศพ และ กลุ่มที่เป็นศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าตายจากสาเหตุอื่นจำนวน 24 ศพ แต่ละศพทำการเก็บตัวอย่างที่เป็นเลือดจากหัวใจโดยเทคนิคปราศจากเชื้อ และตัวอย่างที่เป็นก้านสำลีป้ายบริเวณด้านในของหลอดลม

<u>การเก็บตัวอย่าง</u>

การเก็บตัวอย่างเลือด

-ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บจากหัวใจ

-เก็บตัวอย่างเลือดโดยเทคนิคปราศจากเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างเลือดใส่หลอดในลักษณะที่เลือดไม่แข็งตัวเพื่อนำไปตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่ปนเปื้อน ได้แก่ *Streptococcus salivarius*

การเก็บตัวอย่างก้านสำลีป้ายด้านในหลอดลม

ใช้ก้านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วป้ายบริเวณด้านในหลอดลมของศพ จุ่มลงไปในหลอดที่มีน้ำปลอดเชื้อเพื่อนำไปสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Streptococcus salivarius*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การสกัดสารพันธุกรรม</u>

การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียในเลือด

ประยุกต์ใช้วิธีของ Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวช ของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ปั่นแยกเลือด ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงและเศษเซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด
2. ดูดแยกน้ำเหลืองที่อยู่ด้านบนออกใส่หลอดใหม่จำนวน 500 µl ระวังอย่าให้มีเม็ดเลือดแดงหรือเศษเซลล์ติดมาด้วย
3. นำส่วนน้ำเหลืองที่แยกออกมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้แบคทีเรียที่มีอยู่ตกสู่ก้นหลอด

   ในกรณีที่เห็นตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ให้ดูดน้ำเหลืองส่วนบนทิ้ง หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนที่ก้นหลอดได้ ให้ดูดน้ำเหลืองส่วนบนออก เหลือส่วนล่างไว้เล็กน้อย
4. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้ง ดูดน้ำชั้นบนทิ้ง เหลือแต่ตะกอนจับที่ก้นหลอด
5. เติม proteinase K (10 mg/ml) ลงไป 2 µl เขย่าให้เข้ากัน
6. เติมเม็ด chelex ลงไปให้ท่วมตะกอน และเติม 10 mM Tris pH 8.5 จำนวน 200 µl เขย่าเบาๆให้เข้ากัน
7. แช่อบที่อุณภูมิ 55ºc นาน 1 ชม. นำไปเขย่าวน 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที นาน 10 วินาที
8. แช่อบที่อุณหภูมิ 75ºc นาน 60 นาที
9. นำไปเขย่าวน 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 วินาที
10. ใช้น้ำส่วนบนเป็นแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8ºc หรือแช่แข็ง เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ ให้ดำเนินการตามขั้นตอนที่ 9 และ 10 ตามที่กล่าวมาแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียในก้านสำลีป้ายบริเวณด้านในหลอดลม

ประยุกต์ใช้วิธีของ Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวช ของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. แช่ก้านสำลีไว้ในน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml นาน 30 นาที จากนั้นนำก้านสำลีออกจะได้น้ำที่มี ตะกอนจากด้านในหลอดลมที่ป้ายมา
2. ดูดน้ำที่มีตะกอนจากข้อที่ 1 ใส่หลอดจำนวน 500 µl นำไปปั่นแยก ที่ความเร็ว 14,000 รอบ ต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้ตะกอนที่มีอยู่ตกสู่ก้นหลอด
3. ในกรณีที่เห็นตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ให้ดูดน้ำส่วนบนทิ้งเหลือตะกอนไว้ หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนที่ก้นหลอดได้ ให้ดูดน้ำส่วนบนออก เหลือส่วนล่างไว้เล็กน้อย
4. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้ง ดูดน้ำส่วนบนทิ้ง เหลือแต่ตะกอนจับที่ก้นหลอด
5. เติม proteinase K (10 mg/ml) ลงไป 2 µl เขย่าให้เข้ากัน
6. เติมเม็ด chelex ลงไปให้ท่วมตะกอน และเติม10 mM Tris pH 8.5 จำนวน 200 µl เขย่าเบาๆให้เข้ากัน
7. แช่อบที่อุณภูมิ 55ºc นาน 1 ชม. นำไปเขย่าวน 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
8. แช่อบที่อุณหภูมิ 75ºc นาน 60 นาที
9. นำไปเขย่าวน 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 วินาที
10. ใช้น้ำส่วนบนเป็นแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8ºc หรือแช่แข็ง เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ ให้ดำเนินการตามขั้นตอนที่ 9 และ 10 ตามที่กล่าวมาแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การเตรียมตัวควบคุมผลบวก(positive control) และตัวควบคุมผลลบ (negative control)</u>

ตัวควบคุมผลบวก ได้จากการนำโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus salivarius* มาสกัด โดยป้ายโคโลนีเชื้อมาจุ่มในน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml ปั่นเอาตะกอนของเชื้อไปสกัดตามวิธีการสกัดจากเลือด

ตัวควบคุมผลลบ (mock control) ตัวอย่างที่เป็นเลือดใช้น้ำเลือดของคนปกติที่ไม่เป็นโรคหรือติดเชื้อ ส่วนตัวอย่างที่เป็นก้านสำลี ใช้ก้านสำลีเปล่ามาสกัดตามวิธีการสกัดของตัวอย่างที่เป็นก้านสำลีป้ายบริเวณด้านในหลอดลม

<u>การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

ประยุกต์ใช้วิธีของ Suto et al. , 2009 โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อในส่วนของ fructosyltransferase (ftf) gene and uracil phosphoribosyltransferase and ATP-dependent protease proteolytic subunit genes ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ใช้ Forward primer : 5’-ccagcggtaccaaaggtaaa-3’

Reverse primer : 5’-gcactcatccaattgtcacg-3’

ปฏิกิริยาเกิดในส่วนผสมที่มีปริมาตร 15 µl ซึ่งประกอบด้วย น้ำ 7.5 µl, , 10X taq buffer 1.5 µl, 1 mM dNTPs 1.5 µl, 0.25 ū/µl Taq DNA polymerase 1.5 µl, 10µM primer mix 1.5 µl และ template 1.5 µl และมี PCR condition ดังนี้

- denaturation ที่ 94ºc 10 นาที
- denaturation ที่ 94ºc 30 วินาที , annealing ที่ 53ºc 30 วินาที , extension ที่ 72ºc 30 วินาที 38 รอบ
- final extension ที่ 72ºc 10 นาที

(Suto et al., 2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทดลองจะต้องทำตัวควบคุมทั้งผลบวก และผลลบทุกครั้ง เพื่อป้องกันผลบวกปลอมที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในส่วนผสมต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และผลลบปลอมที่อาจเกิดจากความผิดพลาดในส่วนของน้ำยาและขั้นตอนการทำ

การตรวจสอบผลของสารพันธุกรรมที่ได้

ทำการตรวจสอบว่ามี amplified PCR products เกิดขึ้นหรือไม่ ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis

การตรวจสอบผลต้องใส่ตัวเทียบคือ 100 bp ladder ด้วยทุกครั้ง เพื่อประเมินขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ว่าเป็นไปตามคาดการณ์ไว้ และตรงกับแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างควบคุมผลบวกหรือไม่ ซึ่งถ้าได้ผลบวกก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 223 bp ส่วนผลลบจะไม่พบแถบดีเอ็นเอ

การทำซ้ำในกรณีไม่พบแถบดีเอ็นเอ

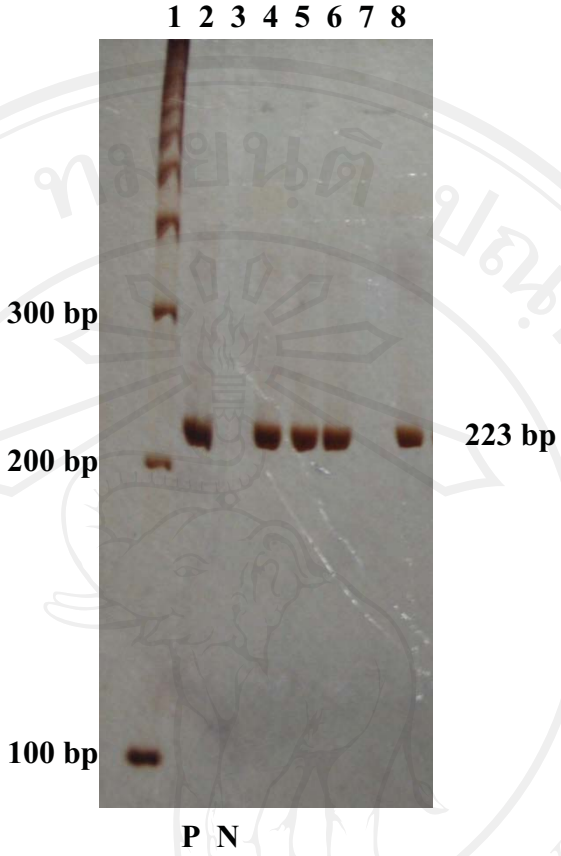
การไม่พบแถบดีเอ็นเอ เป็นไปได้ในหลายกรณีเช่น การที่ไม่มีเชื้ออยู่ในน้ำสกัดหรือมีน้อย เกิดความผิดพลาดในวิธีการทำ หรือข้อบกพร่องในส่วนของน้ำยาและสารเคมี การทำซ้ำในกรณีนี้จึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อช่วยยืนยันผลลบจริง

การทดลองนี้มีการทำซ้ำ 2 ครั้งเมื่อไม่พบแถบดีเอ็นเอ เป็นการทำซ้ำ 2 ลักษณะ ได้แก่

1. ทำซ้ำในลักษณะเดิมอีกครั้ง โดยทำตัวควบคุมทั้งผลบวกและผลลบ หากไม่มีข้อบกพร่องในส่วนของอุปกรณ์ น้ำยา สารเคมี และวิธีการ จะได้ผลที่ถูกต้องในส่วนของตัวควบคุม
2. ทำซ้ำโดยเพิ่มน้ำสกัด (template) เพราะในการสกัดแต่ละครั้งปริมาณเชื้อที่ได้อาจไม่เท่ากัน จึงทำการเพิ่มน้ำสกัดจาก 1.5 µl เป็น 2 µl และทำตัวควบคุมผลบวกและผลลบด้วย

หากทำซ้ำแล้วไม่พบแถบดีเอ็นเอ ก็คือการไม่มีเชื้อ หรือเป็นผลลบจริง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 แสดงตัวอย่างการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus salivarius* โดยเทคนิค PCR และ polyacrylamide gel electrophoresis

ช่องที่ 1 คือ ตัวเทียบ 100 bp ladder แถบล่างสุดคือตัวเทียบที่บอกขนาด 100 bp แถบที่สองถัดขึ้นมาคือแถบขนาด 200 bp แถบที่ 3 และ อื่นๆถัดขึ้นไป คือแถบที่บอกขนาด 300 bp และมากขึ้นไปที่ละ 100 bp ตามลำดับ

ช่องที่ 2 คือตัวควบคุมผลบวก (positive control, P) ต้องปรากฏแถบทุกครั้ง

ช่องที่ 3 คือตัวควบคุมผลลบ (mock control, N) ต้องไม่ปรากฏแถบทุกครั้ง

ช่องที่ 4 5 6 และ 8 คือ ผลบวก (พบดีเอ็นเอของเชื้อ *Streptococcus salivarius*)

ช่องที่ 7 คือ ผลลบ (ไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อ *Streptococcus salivarius*)

การพบแถบดีเอ็นเอ จะต้องสอดคล้องกับขนาด คือ 223 bp เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Streptococcus salivarius*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ผล

นำผลการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในเลือด และ ก้านสำลีป้ายหลอดลม จากศพที่ตายจากการจมน้ำ และศพที่ตายจากสาเหตุอื่น มาเปรียบเทียบกันว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ใช้การทดสอบสมมติฐาน โดย Chi-square test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved