บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย ตัวอย่างซีรั่มทางคลินิกที่ได้จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และตัวอย่างที่เป็นสารควบคุมคุณภาพที่ให้ผลบวกในโรคไวรัสตับอักเสบบี โดยมีรายละเอียด ดังนี้

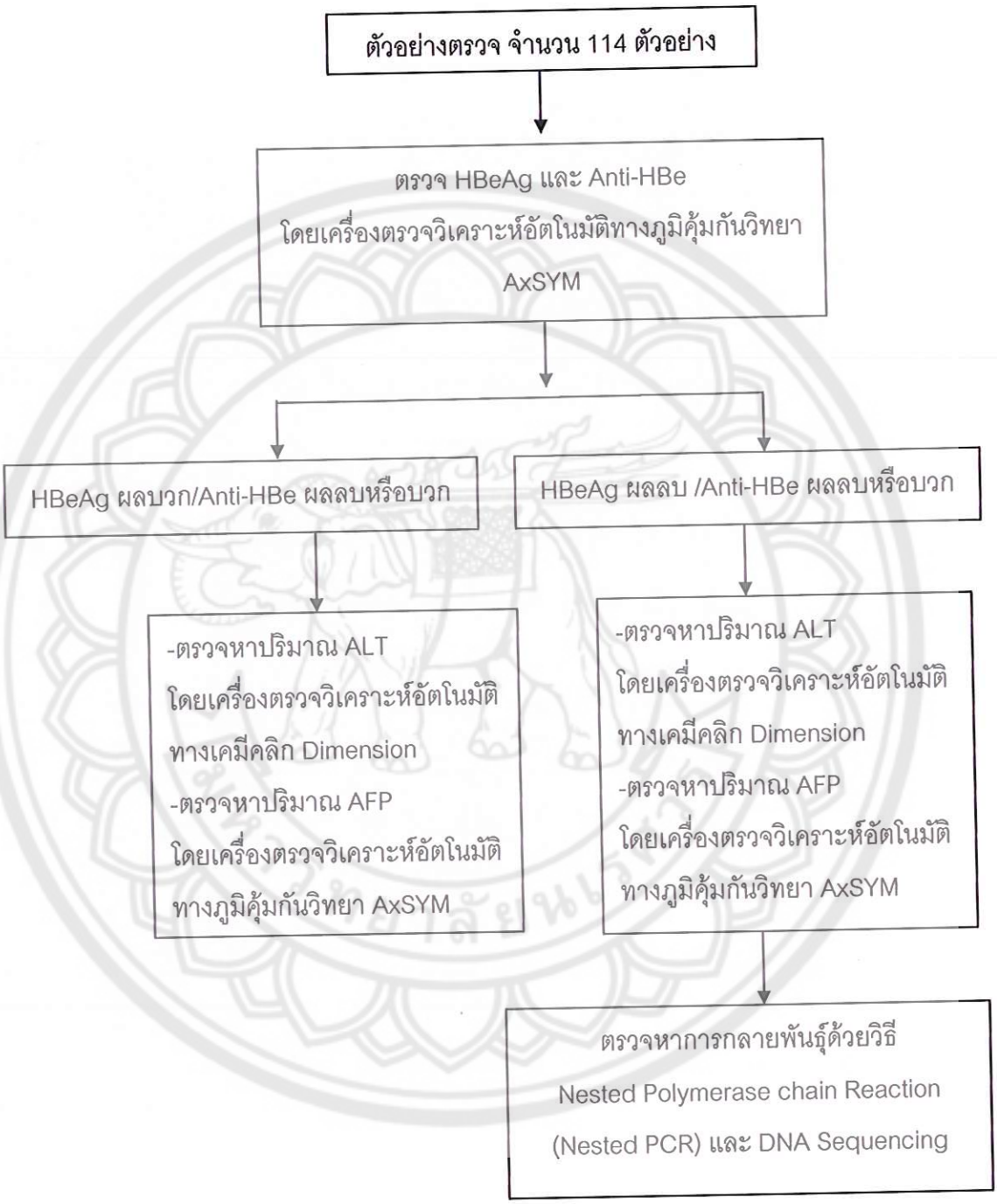
1. **ตัวอย่างทางคลินิก**

ตัวอย่างซีรั่มทางคลินิกจำนวน 114 ตัวอย่าง ได้รับจากห้องปฏิบัติการงานภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลเลิดสิน ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จากผู้ป่วยที่มีช่วงอายุระหว่าง 27-73 ปี ประกอบไปด้วย ตัวอย่างจากเพศชายจำนวน 64 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างจากเพศหญิงจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจหา HBsAg ด้วยหลักการ microparticle enzyme immunoassay (MEIA) เป็นบวกมากกว่า 6 เดือน ซึ่งการเก็บตัวอย่างนี้เก็บในช่วงระหว่างเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 โดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างซีรั่มเพื่อตรวจหา HBeAg, Anti-HBe, AFP และ AFP และแบ่งซีรั่มที่เหลือเก็บใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ที่คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. **ตัวอย่างซีรั่มควบคุมคุณภาพ**

ตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลการตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นบวก ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอณูชีววิทยา โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการหน่วยไวรัสวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อนำมาทำการสกัด DNA และนำมาใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี PCR

แผนงานขั้นตอนการปฏิบัติการวิจัย

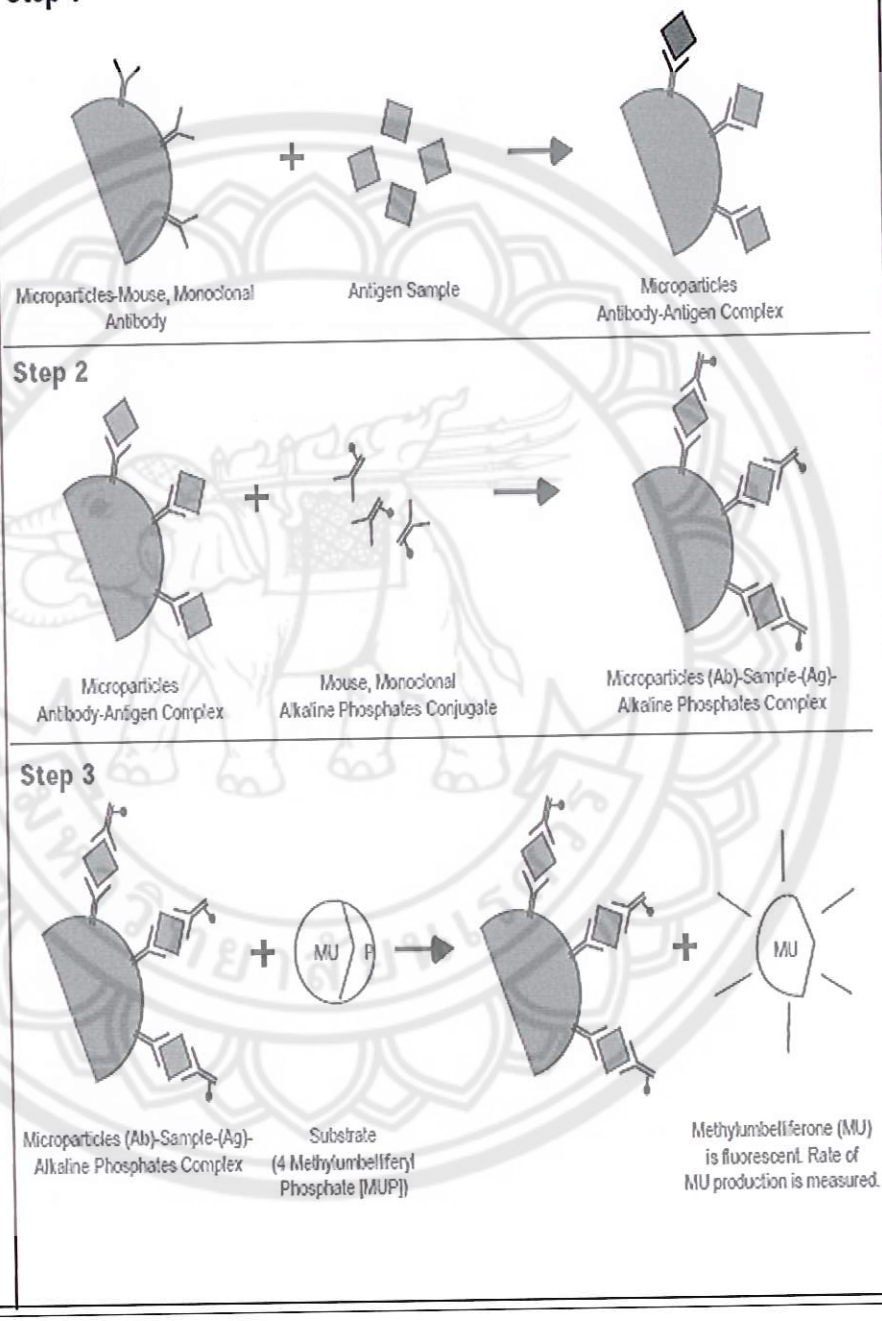


ภาพ 3 แผนภูมิสรุปขั้นตอนการวิจัย

มีรายละเอียด ดังนี้

1. การตรวจหา HBeAg ในซีรั่ม ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา AxSYM โดยหลักการ Microparticle enzyme immuno assay (MEIA) โดยมีขั้นตอนคือดูดตัวอย่างตรวจปริมาณ 150 ไมโครลิตรใส่ถ้วยแบ่งตรวจสารพร้อมทั้งระบุเลขที่ตัวอย่างตรวจที่ถ้วยแบ่งตรวจสาร นำถ้วยแบ่งตรวจสารใส่ที่เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (AxSYM) version 6.1 ทำการป้อนข้อมูลสั่งตรวจ HBeAg และกด run ที่เครื่องตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างตรวจ และน้ำยา Microparticle ที่เคลือบด้วย Anti-HBe และ Sample Diluent จะถูกดูดเข้าสู่ Reaction Vessel (RV) แอนติเจนในตัวอย่างตรวจจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิวของ Microparticle เกิดเป็น แอนติบอดี-แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ ส่วนผสมส่วนหนึ่งซึ่งมีแอนติบอดี-แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ จะถูกส่งต่อไปที่ Matrix Cell ซึ่ง Microparticle จะติดแน่นอยู่กับ Matrix cell แอนติบอดีต่อ HBe Ag ที่ coat ด้วย แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Anti-HBe-Alkalinephosphatase Conjugate) จะถูกจ่ายเข้ามาทำปฏิกิริยากับ แอนติบอดี-แอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพลกส์ บน Microparticle ที่เกาะอยู่บน Matrix Cell และที่ Matrix cell นี้ Microparticle จะถูกล้างเอาส่วนที่เกินที่ไม่ได้เกาะติดอยู่กับ Microparticle ออกไป จากนั้นสับสเตรท 4-Methylumbelliferyl Phosphate จะถูกเติมเข้าไปทำปฏิกิริยากับ แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต ซึ่ง แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต จะเป็นตัวเร่งให้เกิดการปล่อย Phosphate group จากสับสเตรทเกิดการเรืองแสง (fluorescence) คือ 4-Methylumbelliferone สารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะถูกวัดโดยชุดอุปกรณ์สำหรับตรวจวัด MEIA โดยค่าที่วัดได้คือ sample rate และนำไปแปลผลโดยนำไปหารกับค่า cutoff rate ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทำการสอบเทียบน้ำยาด้วยสารสอบเทียบมาตรฐาน หากผลการคำนวณมากกว่าหรือเท่ากับ 1.00 แปลผลว่าเป็นบวก หากผลการคำนวณได้น้อยกว่า 1.00 แปลผลว่าเป็นลบ

AxSYM® HBe 2.0 (LN 7D52)
MEIA Assay

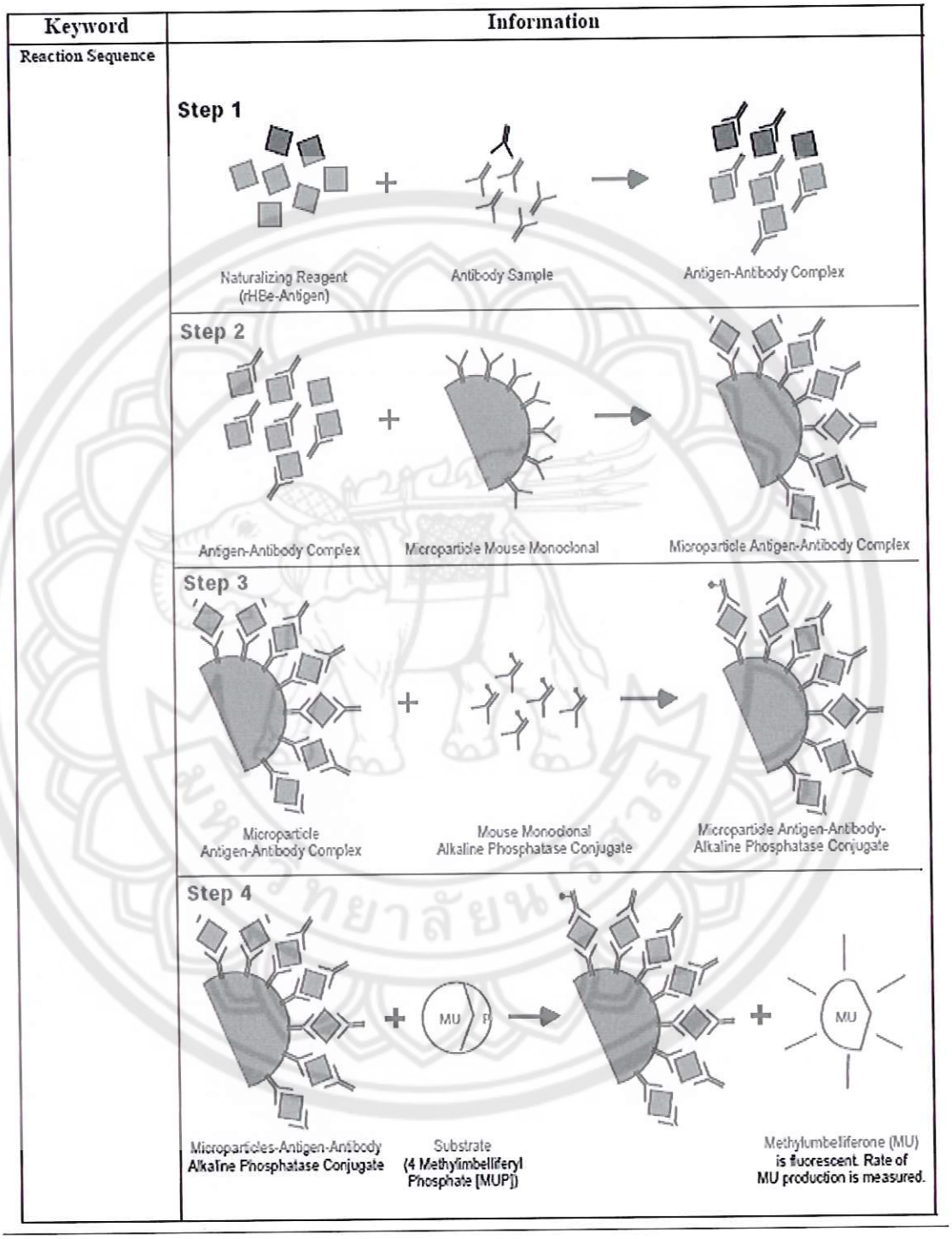
Keyword	Information
Reaction Sequence	

ภาพ 4 การเกิดปฏิกิริยาในการตรวจหา HBeAg

ที่มา: Assay trouble shooting HBeAg, AxSYM, Abott, n.d.

2. **การตรวจหา Anti-HBe ในซีรั่ม** ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา AxSYM โดยอาศัยหลักการ MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) และ หลักการ Competitive Binding ในการตรวจหา Anti-HBe โดยมีขั้นตอน คือ ดูดตัวอย่างตรวจปริมาณ 150 ไมโครลิตรใส่ถ้วยแบ่งตรวจสารพร้อมทั้งระบุเลขที่ตัวอย่างตรวจที่ถ้วยแบ่งตรวจสาร นำถ้วยแบ่งตรวจสารใส่ที่เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (AxSYM) version 6.1 ทำการป้อนข้อมูลสั่งตรวจ Anti-HBe และกด run ที่เครื่องตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างตรวจ และ Neutralizing Reagent (recombinant HBeAg) ถูกเติมผสมในหลุมหนึ่งของ RV Anti-HBe ในสิ่งส่งตรวจจะทำปฏิกิริยากับ rHBeAg เกิดเป็น antibody-antigen complex เครื่องจะดูดตัวทำละลายตัวอย่างตรวจ (Sample diluent) และ microparticle ซึ่งเคลือบด้วย anti-HBe ถูกเติมผสมกันใน RV อีกหลุม ส่วนผสมของ microparticle ที่เจือจางแล้วจะถูกนำมาผสมกับ antibody-antigen complex ส่วนของ rHBeAg ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเป็น complex จะทำปฏิกิริยากับ anti-HBe ของ microparticle ส่วนผสมสุดท้ายนี้จะถูกเติมลงบน Matrix Cell ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ microparticle แล ะConjugate ซึ่งเป็น anti-HBe ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase จะถูกเติมลงใน matrix cell และ ทำปฏิกิริยากับ rHBeAg ที่ติดอยู่กับ microparticle Matrix cell นี้จะถูกล้างด้วย Matrix Cell Wash เพื่อขจัดส่วนเกินและเติม Substrate (4-Methylumbelliferyl phosphate) ลงไปใน matrix cell นั้น phosphatase ในคอนจูเกต จะย่อย phosphate ทำให้เกิดสารเรืองแสง 4-Methylumbelliferone ซึ่งสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะถูกวัดโดยชุดอุปกรณ์สำหรับตรวจวัด MEIA โดยค่าที่วัดได้ คือ sample rate และนำไปแปลผลโดยนำไปหารกับค่า cutoff rate ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทำการสอบเทียบน้ำยาด้วยสารสอบเทียบมาตรฐาน หากผลการคำนวณมากกว่าหรือเท่ากับ 1.00 แปลผลว่าเป็นลบ หากผลการคำนวณได้น้อยกว่า 1.00 แปลผลว่าเป็นบวก

AxSYM® Anti-HBe 2.0 (LN 7D27)
MEIA Assay

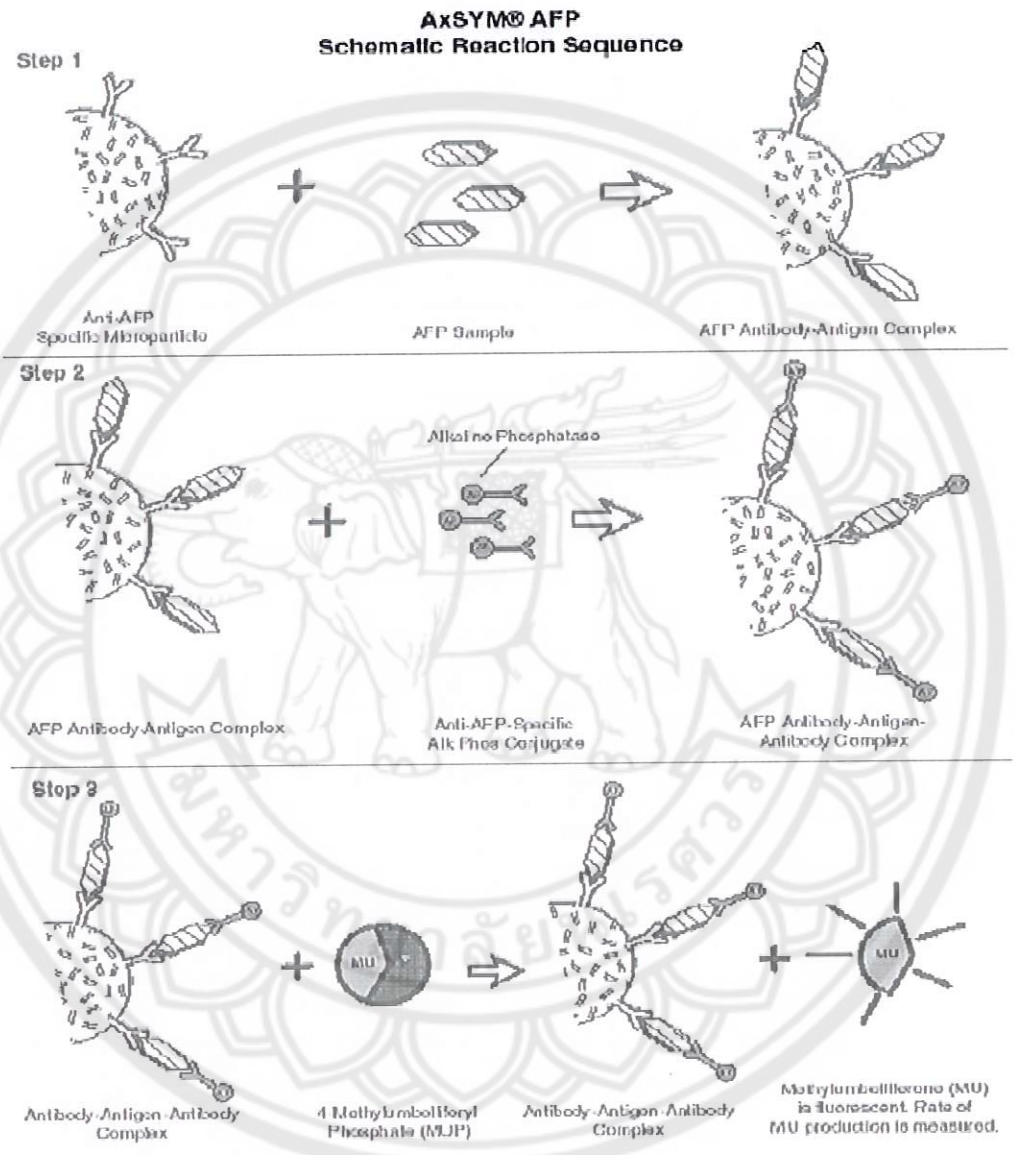


ภาพ 5 การเกิดปฏิกิริยาในการตรวจหา Anti- HBe

ที่มา: Assay trouble shooting Anti-HBe, AxSYM, Abott, n.d.

3. การตรวจหาระดับ AFP ในซีรั่ม ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา AxSYM โดยอาศัยหลักการ MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) โดยมีการใช้ Mouse Monoclonal Anti-AFP เคลือบบน Microparticle โดยมีขั้นตอนคือดูดตัวอย่างตรวจปริมาณ 150 ไมโครลิตรใส่ถ้วยแบ่งตรวจสารพร้อมทั้งระบุเลขที่ตัวอย่างตรวจที่ถ้วยแบ่งตรวจสาร นำถ้วยแบ่งตรวจสารใส่ที่เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (AxSYM) version 6.1 ทำการป้อนข้อมูลสั่งตรวจ HBeAg และกด run ที่เครื่องตรวจวิเคราะห์ สารตัวอย่างตรวจและตัวทำละลายตัวอย่างตรวจและน้ำยา Microparticle ที่เคลือบด้วย Anti-AFP จะถูกดูดเข้าสู่ Incubation Well ของ Reaction Vessel แอนติเจนในตัวอย่างตรวจจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิวของ Microparticle เกิดเป็น แอนติบอดี-แอนติเจน คอมเพลกซ์ ส่วนผสมส่วนหนึ่งซึ่งมีแอนติบอดี-แอนติเจนคอมเพลกซ์อยู่ จะถูกส่งต่อไปที่ Glass Fiber Matrix ซึ่ง Microparticle จะติดแน่นอยู่กับ Glass Fiber Matrix และที่ Matrix Cell นี้ Microparticle จะถูกล้างเอาส่วนที่เกินที่ไม่ได้เกาะติดอยู่กับ Microparticle ออกไป Anti-AFP: แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต (Anti-AFP –Alkalinephosphatase Conjugate) จะถูกจ่ายเข้ามาทำปฏิกิริยากับ แอนติบอดี-แอนติเจนคอมเพลกส์ บน Microparticle ที่เกาะอยู่บน Glass Fiber Matrix อีกชั้นหนึ่ง หลังจากนั้น Microparticle จะถูกล้างเอาส่วนที่เกินที่ไม่ได้เกาะติดอยู่กับ Microparticle ออกไป และสับสเตรท 4-Methylumbelliferyl Phosphate จะถูกเติมเข้าไปทำปฏิกิริยากับแอลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต ซึ่ง แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต จะเป็นตัวเร่งให้เกิดการปล่อย Phosphate group จากสับสเตรทเกิดการเรืองแสง (fluorescence) คือ 4-Methylumbelliferone สารเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะถูกวัดโดยชุดอุปกรณ์สำหรับตรวจวัด MEIA โดยค่าที่วัดได้จะนำไปเปรียบเทียบค่าจาก standard curve ที่ได้จากการทำการสอบเทียบน้ำยามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น จำนวน 6 จุด แปลผลออกมาเป็นปริมาณ AFP โดยหน่วยวัดเป็น ng/mL

Information



ภาพ 6 การเกิดปฏิกิริยาในการตรวจหา AFP

ที่มา: Assay trouble shooting Anti-HBe, AxSYM, Abott, n.d.

4. การตรวจหาปริมาณเอ็นไซม์ ALT โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลินิก Dimension รุ่น RxL โดยใช้หลักการในการตรวจหาการทำงานของเอ็นไซม์ ALT ในการกระตุ้นการเกิด transamination ของ L-alanine ไปให้ α-ketoglutarate (α-KG) ก่อให้เกิด L-glutamate และ pyruvate โดยที่ pyruvate ที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยา lactate dehydrogenase (LDH) ที่มีโคเอ็นไซม์เป็น nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) และ Pyridoxal ร่วมด้วย ทำให้ Lactate ลดลง เมื่อมีการใช้ NADH ไปจะทำให้ค่าดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปโดยเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการใช้ NADH การตรวจวิเคราะห์นี้จะเป็นการวัดการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปด้วยวิธี Bicromatic เทคนิค ในช่วงแสง 350-700 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้จะนำไปเปรียบเทียบค่าจาก standard curve ที่ได้จากการทำการสอบเทียบน้ำยามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

5. การตรวจหาการกลายพันธุ์วิธีเทคนิค PCR และวิธี DNA Sequencing

5.1 ทำการสกัด DNA ของไวรัสตับอักเสบ บี โดยชุดสกัด (Purelink™ Viral RNA/DNA Kits; cell-free samples, Invitrogen, U.S.A.) จากตัวอย่างทางคลินิก ดังนี้

ซีรั่มปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ บัฟเฟอร์ (Lysis buffer) 200 ไมโครลิตร และเติม proteinase K 25 ไมโครลิตร ผสมโดยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 15 วินาที และนำไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแค่ให้ตก (spin down) หลังจากนั้นเติมเอทานอล 250 ไมโครลิตร ผสมโดยเครื่องผสมสาร vortex เป็นเวลา 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นแค่ให้ตก (spin down) ดูดสารละลายลงในหลอด collection tube ที่ใส่คอลัมน์ที่มากับชุดสกัด Purelink นำมาปั่นที่ 6,800 g เป็นเวลา 1 นาที นำหลอด collection tube ทิ้งและวางคอลัมน์ลงในหลอด Wash tube หลอดใหม่ นำไปล้างโดยเติมบัฟเฟอร์ (W5) 500 ไมโครลิตรนำมาปั่นที่ 6,800 g เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างซ้ำด้วยบัฟเฟอร์ (W5) แบบเดิมอีกครั้ง แล้วนำหลอด Wash tube ทิ้งและวางคอลัมน์ลงในหลอด Wash tube หลอดใหม่ และ นำไปปั่นโดยความเร็วสูงสุดเพื่อเอาบัฟเฟอร์ (W5) ที่เหลือออกให้หมด นำหลอด Wash tube ทิ้งและวางคอลัมน์ลงหลอด Recovery tube ใหม่ ทำการชะเอา DNA ออกจากคอลัมน์โดยใส่ RNase-free water 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นโดยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์ออกจากหลอด Recovery tube และ DNA ในหลอดจะถูกเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียลเพื่อนำไปทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่ต้องการศึกษาโดยวิธี Nested PCR

5.2 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี Nested PCR เทคนิคในการศึกษานี้ PCR ถูกใช้ในเพิ่มปริมาณไวรัสในส่วนยีนส่วนที่ต้องการศึกษาการกลายพันธุ์ PCR ถูกปรับให้เหมาะสมกับสภาพของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมยีนเป้าหมายที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของไวรัส ยีนเป้าหมายที่

ต้องการเพิ่มปริมาณอยู่ในส่วนของ pre core ยีนและ promoter ของcore ยีน คือ basal core promoter ยีนการศึกษาครั้งนี้ primer ที่ใช้เป็น primer ที่ออกแบบมาเพื่อขยายยีนเป้าหมายโดยเฉพาะดังตาราง 6

ตาราง 6 Primer ที่นำมาใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์

Primer name	Nucleotide sequence (5′ -> 3′)	genes	Product size
P1-1	GCATGGAGACCACCGTGAAC	Pre core and basal core promoter	369 bp (1606-1974)
P1-2	GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA		
P2-1	CATAAGAGGACTCTTGGACT		307 bp (1653-1959)
P2-2	GGCAAAAAAGAGAGTAACTC		

ที่มา: Takahashi, K., Aoyama, K., Ohno, N., Iwata, K., Akahane, Y., BabaK, et al., 1995

โดยใส่ DNA ต้นแบบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ PCR mixer จำนวน 15 ไมโครลิตร ในหลอด micro-centrifuge tube ซึ่งประกอบด้วย 0.25 ไมโครลิตรของ 5 U/µl *Taq* DNA polymerase, 5 ไมโครลิตรของ 10X Tris-HCl buffer, 2 ไมโครลิตรของ 20 mM $MgCl_2$, 1 ไมโครลิตรของ 2.5 mM dNTPs, 0.5 ไมโครลิตรของ ไพรเมอร์โดยไพรเมอร์คู่นอก 2.5 µM primers P1-1 and P1-2 และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 5.75 ไมโครลิตร (ตารางที่ 4) โดยทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน DNA จำนวนปฏิกิริยา 35 รอบ โดยเครื่อง GeneAmp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems) โดยเริ่มจาก Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ก่อนเข้าสู่รอบของการเพิ่มจำนวน DNA ประกอบด้วย Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 1.30 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และตามด้วย Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ปฏิกิริยาในรอบแรกจะได้ชิ้น DNA ขนาด 369 bps. ตัวอย่างจากปฏิกิริยาแรกจะถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ P2-1 and P2-2 ทำการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 30 รอบ โดยเริ่มจาก Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ก่อนเข้าสู่รอบของการเพิ่มจำนวน DNA ประกอบด้วย Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เมื่อครบ 30 รอบ ตามด้วย Final extension ที่อุณหภูมิไว้ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จะได้ชิ้น DNA ขนาด 307 bps

ตาราง 7 ส่วนประกอบของ PCR mixer

Components	Clinical specimens amplification	
	1st reaction (µl)	2nd reaction (µl)
DNA polymerase (iTaq)	0.25	0.25
10X Tris HCl buffer	5.0	5.0
20mM MgCl	2.0	2.0
dNTP	1.0	1.0
Primer sets		
P1-1	0.5	-
P1-2	0.5	-
P2-1	-	0.5
P2-2	-	0.5
Sterile distilled water	5.75	5.75
DNA template	10.0	10.0
Total volumn	25.0	25.0

5.3 การทำการตรวจสอบ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis ด้วย 2% agarose gel โดยการใช้ PCR product 10 ไมโครลิตร และนำมาย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) แล้วนำดูผลด้วยแสง UV transluminator และบันทึกภาพโดยเครื่อง gel doc

5.4 การสกัด DNAให้บริสุทธิ์ด้วยน้ำยา NucleoSpin® Extract II kit (Machery-Nagel, Pacific Sciences, Germany) นำ PCR Product ที่ให้ผลบวก ตัวอย่างตรวจมา 15 ไมโครลิตร ผสมกับ 30 ไมโครลิตรของ Buffer NT ของชุดน้ำยาใส่ใน หลอด collection tube ที่มีคอลัมน์อยู่ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 11,000 g 1 นาที เทส่วนใสทิ้งนำหลอด collection tube ใหม่มาใส่ เติม wash buffer NT 3 จำนวน 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 11,000 g 1 นาที เทส่วนใสทิ้งนำหลอด collection tube เดิมมาใส่ นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 11,000 g 2 นาที นำหลอด collection tube ทิ้งใส่ micro-centrifuge tube แล้วเติม Elution NE Buffer จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียล 5 นาที แล้วนำไปปั่นเอาของเหลว (DNA) ที่ได้ เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียล เพื่อส่งหายีนที่กลายพันธุ์ด้วยวิธี DNA sequencing

5.5 การหาลำดับเบสของยีนเพื่อหาการกลายพันธุ์ โดยนำ PCR product ที่มีการตรวจสอบแล้วว่าให้ผลบวกและนำมาสกัดแล้วนำส่ง DNA sequencing โดยผ่านทางบริษัทแปซิฟิกไซเอนซ์ จำกัด โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Applied Biosystem (ABI) รุ่น 3730 (U.S.A.) และผลการตรวจจะนำมาทำการวิเคราะห์จากฐานข้อมูล GenBank จะนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.1.3

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการศึกษาทั้งหมด ถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย±มาตรฐาน (SD) หรือร้อยละทดสอบแบบอิสระที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบ (t- test) และ ANOVA F-test หาค่าความสัมพันธ์ โดยใช้หลักทางสถิติแบบ Correlation (r)