บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. การตรวจทางคลินิกและเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก
2. การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

โดยการศึกษาในส่วนแรกได้ถูกดำเนินการจนเสร็จสิ้นโดยอาจารย์จากภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 6 ท่าน ร่วมกับนิสิตหลังปริญญา ส่วนการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ เป็นการดำเนินการศึกษาในส่วนที่สอง คือ การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้ประกอบด้วยพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย โดยทำการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างตามความสะดวกของผู้ป่วย (convenience samples) จำนวน 453 คน การศึกษาได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม (Ethical Review Committee) คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ซึ่งกลุ่มตัวอย่างได้ลงชื่อรับทราบในหนังสือยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ (informed consent)

<u>หลักเกณฑ์ในการคัดกรองผู้ป่วย</u>

กลุ่มตัวอย่างต้องไม่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงที่ต้องได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการตรวจสภาวะปริทันต์ตามเกณฑ์ของสมาคมโรคหัวใจแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (Tong และคณะ, 2000) ดังนี้

1. ไม่มีประวัติต้องรับประทานยาปฏิชีวนะก่อนการรักษาทางทันตกรรม
2. ไม่เป็นโรคหัวใจพิการแต่กำเนิด หรือความผิดปกติของลิ้นหัวใจ
3. ไม่มีประวัติการเป็นโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial endocarditis) หรือ ไข้รูมาติก (rheumatic fever)

4. ไม่มีประวัติการผ่าตัดเปลี่ยนข้อต่อกระดูกในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา หรือไม่มีประวัติการติดเชื้อของข้อต่อกระดูกเทียม
5. ไม่มีโรคไตที่ต้องได้รับการล้างไต

การตรวจทางคลินิก

ผู้ป่วยทุกคนจะได้รับการสัมภาษณ์และการตอบแบบสอบถามในเรื่องของสถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคม พฤติกรรมสุขภาพ เช่น การสูบบุหรี่ และประวัติทางการแพทย์ จากนั้นจะได้รับการตรวจร่างกาย ซึ่งประกอบด้วย การตรวจเลือดและปัสสาวะ การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (EKG) การถ่ายภาพรังสีของปอด และการวัดขนาดของร่างกาย โดยเจ้าหน้าที่จากโรงพยาบาลรามาธิบดี

<u>การปรับมาตรฐานผู้ตรวจทางทันตกรรม</u>

ก่อนการตรวจทางทันตกรรมได้ทำการปรับมาตรฐานการวัดของผู้ตรวจก่อน โดยค่าที่ต้องทำการปรับมาตรฐานการวัดประกอบด้วย

1. ระดับของร่องลึกปริทันต์ (probing depth) วัดระยะจากขอบเหงือกถึงปลายสุดที่เครื่องมือหยั่งถึง ด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์แบบ พีซีพี-ยูเอ็นซี 15 (PCP-UNC 15)
2. ค่าระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level) ได้จากการคำนวณ โดยทำการตรวจวัดระดับการร่นของเหงือก (recession) ก่อน โดยวัดระยะจากรอยต่อของเคลือบฟันและเคลือบรากฟันถึงขอบเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์แบบพีซีพี-ยูเอ็นซี 15 หลังจากนั้นทำการคำนวณค่าระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ โดยรวมค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์และระดับเหงือกร่นเข้าด้วยกัน

ในการตรวจ มีผู้ตรวจจำนวน 6 คน ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับการปรับมาตรฐานการวัดทั้งในส่วนตัวของผู้ตรวจและระหว่างผู้ตรวจทั้ง 6 คน (Intra- and Inter-examiner calibrations) โดยทำในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 40 คน แล้วคำนวณค่าความสอดคล้องของการวัดระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ไม่เกิน $\pm$ 1 มิลลิเมตร และการวัดระดับร่องลึกปริทันต์ไม่เกิน $\pm$ 1 มิลลิเมตร ด้วยสถิติ Kappa

ผลการปรับมาตรฐานการตรวจพบว่า ผู้ตรวจแต่ละคนมีผลการตรวจระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์สอดคล้องกันเป็นอย่างดี (weighted kappa coefficients อยู่ในช่วง

0.69 – 0.79) เช่นเดียวกับความแม่นยำของการตรวจซ้ำในผู้ตรวจแต่ละคน (weighted kappa coefficients อยู่ในช่วง 0.80 – 0.97) ส่วนผลการตรวจระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์พบว่าผู้ตรวจแต่ละคนมีผลการตรวจระดับความลึกของร่องลึกประทันต์สอดคล้องกัน (weighted kappa coefficients อยู่ในช่วง 0.77 – 0.94) เช่นเดียวกับการตรวจซ้ำในผู้ตรวจแต่ละคน (weighted kappa coefficients อยู่ในช่วง 0.86 – 0.95)

การตรวจทางทันตกรรม

การตรวจทางทันตกรรมทำในเก้าอี้สนามที่มีไฟส่องปาก โดยประกอบด้วย การนับจำนวนฟันที่เหลือในช่องปากรวมทั้งรากฟันที่ตกค้าง (retained roots) การตรวจทางปริทันต์ และ การประเมินความจำเป็นในการรักษาทางทันตกรรม การตรวจสภาวะปริทันต์ ทำในฟันทุกซี่ในช่องปากยกเว้นฟันกรามซี่ที่ 3 และรากฟันที่ตกค้าง ค่าที่ตรวจประกอบด้วยระดับของร่องลึกปริทันต์และระดับการร่นของเหงือก โดยตรวจซี่ละ 6 ตำแหน่ง ได้แก่ ด้านใกล้กลางด้านแก้ม ด้านแก้ม ด้านไกลกลางด้านแก้ม ด้านใกล้กลางด้านลิ้น ด้านลิ้น และ ด้านไกลกลางด้านลิ้น ด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์แบบ พีซีพี-ยูเอ็นซี 15

การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

ตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจะเก็บก่อนการทำการตรวจวัดสภาพปริทันต์ โดยใช้เครื่องมือคิวเรตต์ชนิดเกรซี (gracey curette) โดยทำการเก็บที่ตำแหน่ง ใกล้กลางด้านแก้มของฟันบนและล่างด้านขวา และเก็บที่ตำแหน่งใกล้กลางด้านลิ้นของฟันบนและล่างด้านซ้าย ในการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกนั้น จะทำการกั้นน้ำลาย แล้วเช็ดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกออกด้วยสำลี จากนั้นจึงใช้เครื่องมือคิวเรตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสอดเข้าไปในร่องเหงือกในบริเวณตำแหน่งที่กำหนดจนถึงปลายสุดของร่องลึกปริทันต์ แล้วจึงตักคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่บรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาย (phosphate buffer saline) ที่ผสมด้วย 0.01% thimerosal ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากฟันทุกซี่ของกลุ่มตัวอย่างหนึ่งคนจะถูกนำมารวมในหลอดเดียวกัน (pooled sample) จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างของคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก โดยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (Qiagen, CA, USA) ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิต โดยรายละเอียดดังต่อไปนี้

สารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. ATL buffer, AL buffer, Proteinase K: เป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์
2. AW1, AW2 buffer: เป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติในการชะล้างสิ่งปนเปื้อนต่างๆ เช่น เอนไซม์, โปรตีน ที่ปนเปื้อนมากับดีเอ็นเอ
3. AE buffer: เป็นสายละลายที่มีคุณสมบัติในการนำดีเอ็นเอที่ยึดติดกับ siliga gel membrane ให้หลุดออกมา

ขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย จากนั้นทำการเขย่าจนตะกอนของคราบจุลินทรีย์กระจายในสารละลายทั่วกัน
2. ดูดตัวอย่างสารละลายของคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกออกมาปริมาตร 200ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ที่มีความจุ 1.5 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10,000 g (11,000 rpm) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
4. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เหลือแต่ส่วนตะกอนไว้ จากนั้น เติมบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้ตะกอนกระจายอย่างสม่ำเสมอ
5. เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้เข้ากัน
6. นำไปบ่มด้วยกล่องควบคุมอุณหภูมิ (heat box) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ระหว่างนั้น นำสารละลายออกมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex ทุก 10 นาที

7. เมื่อครบ 1.5 ชั่วโมงแล้ว เติมบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex จะเกิดเป็นสารแขวนลอยสีขาวขึ้น
8. นำไปบ่มด้วยกล่องควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนสีขาวจะจางหายไป
9. เติมเอทานอล (absolute ethanol) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex
10. ดูดสารละลายทั้งหมดที่ได้ใส่ลงใน mini spin column ซึ่งวางอยู่ในหลอดทดลองที่มีความจุ 2 มิลลิลิตร (collection tube)
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g (8,000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำ mini spin column เปลี่ยนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่
12. เติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน mini spin column
13. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g (8,000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำ mini spin column เปลี่ยนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่
14. เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน mini spin column
15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 g (14,000 rpm) เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้น นำ mini spin column เปลี่ยนใส่ในหลอดทดลองที่มีความจุ 1.5 มิลลิลิตร
16. เติมบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
17. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g (8,000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที
18. สารละลายที่ได้จะประกอบด้วยดีเอ็นเอของตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่พร้อมจะนำไปวิเคราะห์ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไป

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* และ *Tannerella forsythia* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

<u>การเตรียมรีแอคชั่น มิกเจอร์ (reaction mixture)</u>

รีแอคชั่น มิกเจอร์ ประกอบด้วย

1. ไพรเมอร์เฉพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์
2. QIAgen buffer ซึ่งประกอบด้วย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์
3. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
4. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq polymerase) ความเข้มข้น 1.25 ยูนิต

นำรีแอคชั่น มิกเจอร์ที่เตรียมได้ปริมาตร 45 ไมโครลิตร มาผสมกับดีเอ็นเอของตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการทั้ง 3 ชนิด คือ *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* และ *T. forsythia* เป็นตัวควบคุมว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นจริง (positive control) และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมกรณีไม่พบเชื้อแบคทีเรีย (negative control)

<u>การดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส</u>

นำหลอดทดลองที่ประกอบด้วย รีแอคชั่น มิกเจอร์ ผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาใส่ในเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยทำการตั้งค่าอุณหภูมิตามชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งอ้างอิงตามการศึกษาของ Ashimoto และคณะ (1996) ดังนี้

A. actinomycetemcomitans

อุณหภูมิเริ่มแรก (initial denaturation) 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วย 36 รอบของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส (denaturation) 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (primer annealing step) 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (extension step) 1 นาที และเมื่อครบ 36 รอบแล้ว ตั้งอุณหภูมิสุดท้าย (final step) ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

P. gingivalis* และ *T. forsythia

อุณหภูมิเริ่มแรก 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วย 36 รอบของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และเมื่อครบ 36 รอบแล้ว ตั้งอุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที

ในส่วนของไพรเมอร์เฉพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษานั้น ได้ใช้ยีนในส่วนของ 16S rRNA เป็นส่วนที่นำมาขยายเพื่อทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการ ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Ashimoto และคณะ (1996) ดังแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4: แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่งของเบส (ความยาวในคู่เบส)
A. actinomycetemcomitans AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	487-1,034 (557)
P. gingivalis AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	729-1,132 (404)
T. forsythia GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	120-760 (641)

การตรวจหาแบคทีเรีย

ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา เมื่อได้รับการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว สามารถตรวจวัดได้โดยวิธี Electrophoresis บน agarose gel เข้มข้น 1.2% ที่ผสม ethidium bromide ปริมาณ 0.5 μg/ml แถบดีเอ็นเอที่ถูกแยกชั้นออกมาด้วยวิธี Electrophoresis จะมองเห็นได้ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ซึ่งสามารถเทียบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอตัวอย่าง กับ 1 kb DNA ladder (KiloBase™, NJ, USA) การตรวจดูดีเอ็นเอจะทำภายใต้เครื่อง SynGene® รุ่น Gene Genius Bio Image System ร่วมกับโปรแกรม Gene Snap version 6.07 (SynGene®, Cambridge, England)

สถิติที่ใช้ในการศึกษา

ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจจะถูกบันทึกโดยใช้โปรแกรม EpiData version 2.1a ซึ่งข้อมูลชุดเดียวกันจะถูกบันทึกแยกกันเป็น 2 ชุด โดยผู้บันทึก 2 คน เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการบันทึกข้อมูล

กลุ่มตัวอย่างจะได้รับการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามสภาวะปริทันต์ โดยใช้เกณฑ์ของ Papapanou และคณะ (2002) ดังนี้

1. กลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์ คือ กลุ่มที่ตรวจพบร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป อย่างน้อย 3 ตำแหน่ง
2. กลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ คือ กลุ่มที่ตรวจไม่พบร่องลึกปริทันต์ หรือมีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป น้อยกว่า 3 ตำแหน่ง

กลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่จะถูกจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Shizukuishi และคณะ, 1998) ดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างที่ไม่เคยสูบบุหรี่ และกลุ่มตัวอย่างที่เคยสูบบุหรี่ในอดีต
2. กลุ่มตัวอย่างที่ยังคงสูบบุหรี่อยู่ในปัจจุบัน

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

1. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปและผลการตรวจสภาพช่องปากและสภาวะปริทันต์โดยใช้ความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้แก่ เพศ อายุ จำนวนฟันที่เหลือในช่องปาก ค่าเฉลี่ยความลึกของร่องลึกปริทันต์ ค่าเฉลี่ยการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์
2. วิเคราะห์ค่าความชุกของแบคทีเรียที่ตรวจพบด้วยค่าความถี่ และร้อยละ
3. วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลทั่วไป ผลการตรวจสภาพช่องปาก สภาวะปริทันต์ และค่าความชุกของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ทั้ง 3 ชนิด ด้วยสถิติไคสแควร์สำหรับตัวแปรเชิงกลุ่ม (เพศ พฤติกรรมการสูบบุหรี่ ค่าความชุกของแบคทีเรีย) และใช้สถิติ independent t-test สำหรับตัวแปรเชิงปริมาณ (อายุ จำนวนฟันที่เหลือในช่องปาก ค่าเฉลี่ยความลึกของร่องลึกปริทันต์ ค่าเฉลี่ยการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์)
4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียกับสภาวะปริทันต์ โดยมีการควบคุมอิทธิพลของตัวแปรรบกวนอื่นๆ ได้แก่ อายุ และการสูบบุหรี่ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความถดถอยโลจิสติค (logistic regression analysis)

การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5 (SPSS Inc.,Chicago, IL, USA)