

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

การเลือกอาสาสมัคร

1. กลุ่มประชากรและเกณฑ์การเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ

- 1.1. ประชากรที่ศึกษาเป็นผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 60 คน ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุกรานทั่วไป (generalized aggressive periodontitis) จำนวน 20 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังทั่วไประดับรุนแรง (generalized severe chronic periodontitis) จำนวน 20 คน และผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ จำนวน 20 คน โดยใช้เกณฑ์การจำแนกโรคปริทันต์ ตามเกณฑ์ของบัณฑิตยสภาสาขาปริทันตวิทยาแห่งประเทศไทย สหรัฐอเมริกา (American Academy of Periodontology; AAP) ปี 2542
- 1.2. การศึกษานี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภัยอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 1.3. ผู้ป่วยทุกคนรับทราบคำชี้แจงในการวิจัยและยินดียใจเข้าร่วมโครงการวิจัยอย่างเต็มใจ โดยลงลายมือชื่อในหนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (consent form)

2. เกณฑ์การแยกอาสาสมัครออกจากโครงการ

กลุ่มตัวอย่างต้องไม่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงที่ต้องได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการตรวจสภาวะปริทันต์ ตามเกณฑ์ของสมาคมโรคหัวใจแห่งประเทศไทยสหรัฐอเมริกา⁽⁴²⁾ ดังนี้

- 2.1. ไม่มีประวัติต้องรับประทานยาปฏิชีวนะก่อนการรักษาทางทันตกรรม
- 2.2. ไม่เป็นโรคหัวใจพิการแต่กำเนิด หรือความผิดปกติของลิ้นหัวใจ
- 2.3. ไม่มีประวัติการเป็นโรคเยื่อหูหัวใจอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial endocarditis) หรือ ไข้รูมาติก (rheumatic fever)
- 2.4. ไม่มีประวัติการผ่าตัดเปลี่ยนข้อต่อกระดูกในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา หรือไม่มีประวัติการติดเชื้อของข้อต่อกระดูกเทียม
- 2.5. ไม่มีโรคไตที่ต้องได้รับการล้างไต

นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างต้องไม่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่

- 2.6 กลุ่มผู้สูบบุหรี่
 - 2.7 ผู้ป่วยที่มีโรคทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบรุกราน
- โดยกลุ่มตัวอย่างต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะในช่วงก่อนการศึกษานาน้อย 3 เดือน

3. เกณฑ์การให้เลิกการศึกษา

3.1. เมื่ออาสาสมัครปฏิเสธที่จะร่วมโครงการ

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ซักประวัติผู้ป่วยเพื่อให้ได้ข้อมูลทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย ชื่อ อายุ เพศ ประวัติทางการแพทย์ และ ประวัติการรักษาทางทันตกรรม
2. เมื่อผู้ป่วยถูกจัดไว้ในกลุ่มที่อยู่ในเกณฑ์การคัดเลือกเป็นอาสาสมัคร ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจฟัน เพื่อเก็บข้อมูลทางปริทันต์ซึ่งประกอบด้วย
 - 2.1. การวัดระดับบ่อนามัยช่องปากของผู้ป่วย โดยการตรวจ Plaque Index (PI) ด้วยดัชนีการตรวจคราบจุลินทรีย์ของ Ainamo and Bay⁽⁴³⁾
 - 2.2. การวัดระดับการอักเสบของเหงือก โดยการตรวจ Bleeding Index (BI) โดยตรวจการมีเลือดออกของเหงือกหลังการหยั่งร่องเหงือกของฟันแต่ละซี่ด้วยอุปกรณ์ตรวจปริทันต์ (periodontal probe) โดยใช้ดัชนีของ Ainamo and Bay⁽⁴³⁾
 - 2.3. การวัดระยะความลึกของร่องลึกปริทันต์ (probing pocket depth; PPD) โดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe) สอดเข้าไปในร่องลึกปริทันต์ที่ต้องการวัดจนปลายอุปกรณ์ตรวจปริทันต์สัมผัสถึงก้นของร่องลึกปริทันต์ และทำการอ่านค่าระยะความลึกบนอุปกรณ์ตรวจปริทันต์ในระดับที่อยู่พอดีขอบเหงือก โดยบันทึกค่าเป็นจำนวนเต็มหน่วยมิลลิเมตร เศษของการวัดให้ปัดขึ้นเป็นจำนวนเต็ม
 - 2.4. การวัดระยะการร่นของเหงือก (gingival recession) ทำการวัดระยะจากรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) ถึงขอบเหงือก โดยจะวัดในตำแหน่งเดียวกับที่ทำการวัดความลึกของร่องลึกปริทันต์ โดยบันทึกค่าเป็นจำนวนเต็มหน่วยมิลลิเมตร เศษของการวัดให้ปัดขึ้นเป็นจำนวนเต็ม
 - 2.5. การคำนวณระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ทางคลินิก (clinical attachment level; CAL) เป็นค่าที่ได้จากการรวมค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์กับค่าระยะการร่นของเหงือก
 - 2.6. ทำการวัด 6 ตำแหน่งต่อฟัน 1 ซึ่งได้แก่ ด้านใกล้กลางด้านแก้ม ด้านแก้ม ไกลกลางด้านแก้ม ไกลกลางด้านหลัง ด้านหลัง และใกล้กลางด้านหลัง
3. หลังการตรวจทางปริทันต์ 1 สัปดาห์ จะทำการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก โดยทำการเขี่ยคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกด้วย sterile cotton pellet จากนั้นใช้กระดาษซับปลายแหลมที่ปราศจากเชื้อ (sterile paper point) เก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากด้านใกล้กลางด้านแก้มของฟันทุกซี่ในช่องปาก ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาย (phosphate buffer saline) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเก็บที่ -80 °C เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่อไป

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจหาเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเรีย จากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของผู้ป่วย
 - 1.1. ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างของคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAmp DNA mini kit (Qiagen, CA, USA) ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิต
 - 1.2. ตรวจหาเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเรีย จากดีเอ็นเอที่แยกได้จากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพื้นฐาน (Conventional PCR) และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเนสต์เต็ด โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) ต่อส่วน LKTA ของเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์⁽⁴⁴⁾ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเรีย⁽⁴⁵⁾ รายละเอียดลำดับไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1
 - 1.3. ดีเอ็นเอของเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเรีย เมื่อได้รับการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) บนวุ้นนอกาโรส (agarose gel) เข้มข้นร้อยละ 1.2 ที่ผสมเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แถบดีเอ็นเอที่ถูกแยกชั้นออกมาด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส จะมองเห็นได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งสามารถเทียบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอตัวอย่างกับ 1 kb DNA ladder (O'RangeRuler™, Fermentas, Lithuania) การตรวจดูดีเอ็นเอจะทำภายใต้เครื่อง ChemiDoc XRS system (Bio-rad, CA, USA) ร่วมกับโปรแกรม Quantity one 1-D analysis software (Bio-rad, CA, USA)
2. การตรวจหา ยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเรีย
 - 2.1. ตรวจหา ยีนกำหนดการสร้างไซโตลิต์ลิตสเทนดิงท็อกซินของเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพื้นฐาน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนซีดีทีเอ ซีดีทีบี และซีดีทีซีของเชื้อ แอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์⁽³⁸⁾ รายละเอียดลำดับไพรเมอร์ แสดงในตารางที่ 1 โดยมีเชื้อแอกกรีเกรทีแบคทีเรีย แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33384 เป็นตัวควบคุมกรณีตรวจพบเชื้อและยีนกำหนดการสร้างไซโตลิต์ลิตสเทนดิงท็อกซิน และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมกรณีไม่พบแบคทีเรีย
 - 2.2. ตรวจหา ยีนที่กำหนดการสร้างฟิมเบีย (*fimA* gene) และคอลลาจีเนส (*prtC* gene) ของเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส โดยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์⁽²⁵⁾ รายละเอียดลำดับไพรเมอร์ แสดงในตารางที่ 1 โดยมีเชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33277 เป็นตัวควบคุมกรณีตรวจพบเชื้อและยีน

กำหนดการสร้างพริมาเบรียและคอลลาจีเนส และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมกรณีไม่พบแบคทีเรีย

- 2.3. ตรวจสอบยีนกำหนดการสร้างซิสเทอีน โปรติเอส (*prtH* gene) ของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย โดยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพื้นฐาน⁽⁴¹⁾ รายละเอียดลำดับไพรเมอร์ แสดงในตารางที่ 1 โดยมีเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43037 เป็นตัวควบคุมกรณีตรวจพบเชื้อและยีนกำหนดการสร้างซิสเทอีน โปรติเอส และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมกรณีไม่พบแบคทีเรีย
- 2.4. ดีเอ็นเอของยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อแอกริเกรทีแบคเทอร์ แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย เมื่อได้รับการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนวุ้นนอกาโรส เข้มข้นร้อยละ 1.2 ที่ผสมเอซีเดียม โบรไมด์ ปริมาณ 0.5 µg/ml แถบดีเอ็นเอที่ถูกแยกชั้นออกมาด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส จะมองเห็นได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งสามารถเทียบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอตัวอย่างกับ 1 kb DNA ladder (O'RangeRuler™, Fermentas, Lithuania) การตรวจดูดีเอ็นเอจะทำภายใต้เครื่อง ChemiDoc XRS system (Bio-rad, CA, USA) ร่วมกับโปรแกรม Quantity one 1-D

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา รายงานผลความชุกในการพบเชื้อแอกริเกรทีแบคเทอร์ แอคทีโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเซีย เปรียบเทียบความสัมพันธ์ในการพบยีนที่กำหนดความรุนแรงในผู้ป่วยโรคปริทันต์กลุ่มต่างๆ ในแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 1 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primers	Sequence	Product size (bp)
LKTA	LKT2 5'-CTA GGT ATT GCG AAA CAA TTT G-3' LKT3 5'-CCT GAA ATT AAG CTG GTA ATC-3'	262
16S rDNA <i>P. gingivalis</i>	Pg-F 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG -3' Pg-R 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT -3'	404
16S rDNA <i>T. forsythia</i>	Tf-F 5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA -3' Tf-R 5'-TGC TTC ACT GTC ACT TAT ACC T -3'	641
cdtA	cdtA-F 5'-GGG GGA CTA GTG GAT GGA TCT AAG GAG AGA TAT AAT G -3' cdtA-R 5'-GGG GGA GCT CTT AAT TAA CCG CTG TTG CTT CTA ATA CAG -3'	694
cdtB	cdtB-F 5'-GGG GGA ATT CTA AGG AGT TTA TAT GCA ATG GGT AAA G -3' cdtB-R 5'-GGG GGG AGC TCT TAG CGA TCA CGA ACA AAA CTA ACA G -3'	863
cdtC	cdtC-F 5'-GGG GGG AAT TCT AGT TTT GTT CGT GAT CGC TAA GGA G -3' cdtC-R 5'-GGG GGA CTA GTT AGC TAC CCT GAT TTC TTC GCA CCG -3'	593
fim A	fimA-F 5'-ATA ATG GAG AAC AGC AGG AA -3' fimA-R 5'-TCT TGC CAA CCA GTT CCA TTG C -3'	131
prtC	prtC-F 5'-ACA ATC CAC GAG ACC ATC -3' prtC-R 5'-TTC AGC CAC ACC GAG ACG -3'	584
prtH	prtH-F 5'-ATG AAG ATG CTT GAA GGC TTC -3' prtH-R 5'-TTA CAA ATC TAC TCT CAA TTG G -3'	1,443

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงโพลีเมอเรส

อุณหภูมิ	Start	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Hold	Cycles
Primers							
LKTA	96 °C, 2 min.	94 °C, 15 sec.	55 °C, 30 sec.	72 °C, 1 min	72 °C, 7 min	4 °C	36
cdt A, B, C	96 °C, 2 min.	94 °C, 2 min.	65 °C, 1 min.	72 °C, 2 min	72 °C, 7 min	4 °C	28
16S rDNA, fimA, prtC (Multiplex PCR)	94 °C, 5 min.	94 °C, 1 min.	50 °C, 1 min.	72 °C, 1.5 min	72 °C, 7 min	4 °C	35
Tf_16S rDNA	95 °C, 2 min.	95 °C, 30 sec.	60 °C, 1 min.	72 °C, 1 min	72 °C, 2 min	4 °C	26
prtH	95 °C, 2 min.	94 °C, 60 sec.	58 °C, 40 sec.	72 °C, 90 sec	72 °C, 10 min	4 °C	35