Winkelhoff และคณะ (2001) ทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และพบว่าคนที่สูบบุหรี่มีจำนวนตำแหน่งที่ตรวจพบเชื้อ *Prevotella intermedia*/nigrescens มากกว่า และมีปริมาณเชื้อ *Fusobacterium nucleatum* และ *Micromonas (Peptostreptococcus) micros* สูงกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ Haffajee และ Socransky (2001) ทำการตรวจหาเชื้อก่อโรคปริทันต์ด้วยวิธี checkerboard DNA-DNA hybridization พบว่าคนที่สูบบุหรี่มีเปอร์เซนต์ของตำแหน่งที่ตรวจพบเชื้อก่อโรคปริทันต์บางชนิด เช่น *P. gingivalis, T. forsythia* และ *Treponema denticola* สูงกว่าในคนที่ไม่สูบบุหรี่ เมื่อพิจารณาเฉพาะตำแหน่งที่มีร่องเหงือกลึกไม่เกิน 4 มิลลิเมตร Eggert และคณะ รายงานผลการศึกษาในปีเดียวกัน โดยใช้ Commercial immunoassay ในการตรวจหาเชื้อและพบว่าคนที่สูบบุหรี่มีปริมาณเชื้อ *P. gingivalis* และ *P. intermedia* มากกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ในตำแหน่งที่มีร่องเหงือกลึกไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

การศึกษาผลของการสูบบุหรี่ต่อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก ที่ได้กล่าวมาข้างต้นส่วนใหญ่ทำในประเทศตะวันตก มีการศึกษาส่วนน้อยที่ทำในประเทศทางแถบเอเชีย และยังไม่มีการศึกษาที่ทำในประชากรไทยเลย ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเหล่านี้ มีข้อจำกัดในการนำไปอ้างอิงกับกลุ่มประชากรไทย ที่ผ่านมาทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระยะยาวเพื่อหาสาเหตุของการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ และความสัมพันธ์กับโรคทางระบบ ในกลุ่มพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (Electrical Generating Authority of Thailand, EGAT) โดยเป็นความร่วมมือระหว่างภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ในการศึกษาดังกล่าวได้มีการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก พร้อมกับการตรวจสภาวะปริทันต์ของผู้เข้าร่วมโครงการ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อักเสบ 3 ชนิด ได้แก่ *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis* และ *T. forsythia* ในผู้ที่สูบบุหรี่ เปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ในกลุ่มพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย โดยใช้วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

วิธีการวิจัย

1. <u>การตรวจสภาวะปริทันต์</u>

การตรวจสภาวะปริทันต์ได้ทำไปแล้วปีพ.ศ. 2546-2547 ในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 2,000 คน โดยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.) กล่าวโดยย่อการตรวจสภาวะปริทันต์ทำโดยการวัด probing depth 6 ตำแหน่งต่อฟัน 1 ซี่ โดยใช้ 15 mm

North Carolina probe (UNC-15) ค่า probing depth เป็นการวัดความลึกของร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) ซึ่งเกิดจากการทำลายของอวัยวะปริทันต์จากการเป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยวัดจากขอบเหงือก ถึงตำแหน่งลึกสุดของร่องเหงือกที่ probe หยั่งถึง

ในการตรวจ ใช้ทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง (periodontists) จำนวน 6 คน ซึ่งได้รับการปรับมาตรฐานการตรวจ โดยพบว่า ผู้ตรวจแต่ละคนมีผลการตรวจความลึกของร่องลึกปริทันต์สอดคล้องกันเป็นอย่างดี (weighted kappa coefficients อยู่ในช่วง 0.77 – 0.94) เช่นเดียวกับความแม่นยำของการตรวจซ้ำในผู้ตรวจแต่ละคน (weighted kappa coefficients อยู่ในช่วง 0.86 – 0.95)

กลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรขึ้นไปอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง จะจัดว่าเป็นโรคปริทันต์อักเสบ (Papapanou et al., 2002)

2. <u>การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก</u>

การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกได้ทำไปแล้วร่วมกับการตรวจสภาวะปริทันต์ วิธีการเก็บตัวอย่างทำโดยเช็ดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกบริเวณที่จะเก็บตัวอย่างออก หลังจากนั้นใช้เครื่องมือคิวเรตต์ชนิดแกรซี (gracey curette) สอดเข้าไปในร่องเหงือกจนถึงตำแหน่งลึกสุดของร่องเหงือก และตักคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากฟันทุกซี่มาใส่รวมกัน (pooled) ในหลอดเก็บตัวอย่าง ที่บรรจุสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ สาลาย (phosphate buffer saline) 1 มิลลิลิตร (ml) ที่มี 0.01% Thimerosal เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. <u>การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง</u>

คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ที่สูบบุหรี่อย่างน้อย 10 มวนต่อวันและปัจจุบันยังคงสูบบุหรี่อยู่ (Tomar & Asma, 2000) พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 244 คน และคัดเลือกผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่ที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกันจำนวน 244 คน

4. <u>การเตรียม DNA</u>

การเตรียม bacterial DNA จากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก ทำโดยใช้ QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany)

5. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* และ *T. forsythia* ในตัวอย่างของคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ (primer) และ Taqman probe ที่ใช้สำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นดังตาราง

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และ Taqman probe ที่ใช้สำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นดังตาราง

เชื้อจุลินทรีย์	PCR products (คู่เบส)
P. gingivalis (Boutaga et al., 2003) Forward primer: 5'-GCG CTC AAC GTT CAG CC-3' Reverse primer: 5'-CAC GAA TTC CGC CTG C-3' Probe: 5'-FAM-CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA-TAMRA-3'	68
A. actinomycetemcomitans (Boutaga et al., 2005) Forward primer: 5'-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3' Reverse primer: 5'-TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC-3' Probe: 5'-FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG-TAMRA-3'	80
T. forsythia (Saygun et al., 2008) Forward: 5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3' Reverse: 5'-CCGTTACCTCACCAACTACCTAATG-3' Probe: 5'-FAM-AGGGATAACCCGGCGAAAGTCGGA-TAMRA-3'	149

ปฏิกิริยาพอลิเมอเรสลูกโซ่ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย bacterial DNA 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการหา 0.25 ไมโครโมล (pmol) Taqman probe 0.25 ไมโครโมล LightCycler480 Probes Master 10 ไมโครลิตร นำ multi-well plate ที่ได้ผสมสารต่างๆไว้แล้วใส่ในเครื่อง LightCycler480 system โดยตั้งค่าอุณหภูมิเริ่มแรก (initial denature step) ที่ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ตามด้วย 45 รอบของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที (denature step) และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1นาที