บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การออกแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแบบภาคตัดขวาง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณซีอาร์พี กับสภาวะทางคลินิกของโรคปริทันต์ และความชุกของเชื้อ *P.gingivalis* โดยการจำแนกโรคปริทันต์ตามลักษณะการกระจายของร่องลึกปริทันต์ที่ลึกไม่เกิน 4 มิลลิเมตร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มอาสาสมัครปกติ มีร่องลึกปริทันต์ไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

กลุ่มที่ 2 กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังแบบเฉพาะที่ (localized periodontitis) มีร่องลึกปริทันต์ที่ลึกตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรไม่เกินร้อยละ 30 ของตำแหน่งที่ตรวจ (≤ 30% sites)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังแบบทั่วไป (generalized periodontitis) มีร่องลึกปริทันต์ที่ลึกตั้งแต่ 5 มิลลิเมตรมากกว่าร้อยละ 30 (> 30% sites)

2. ประชากรศึกษา

2.1 ข้อกำหนดในการคัดประชากรศึกษา (inclusion criteria)

2.1.1 กลุ่มคนไทยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดขอนแก่น เป็นผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบหรือมีการติดเชื้อ เช่น มีไข้ หรือภาวะที่ร่างกายมีการตอบสนองต่อการอักเสบทางระบบ จากคลินิกปริทันตวิทยาคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แผนกทันตกรรมโรงพยาบาลขอนแก่น แผนกทันตกรรมโรงพยาบาลน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น โดยผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมดยินยอมเข้าร่วมการศึกษาเป็นลายลักษณ์อักษรในแบบฟอร์มใบยินยอมให้ทำการศึกษา

2.1.2 อายุตั้งแต่ 20 ปี ขึ้นไป

2.1.3 มีฟันอย่างน้อย 18 ซี่

2.2 ข้อกำหนดในการคัดเลือกออกของประชากรศึกษา (exclusion criteria)

2.2.1 ได้รับการรักษาทางปริทันตวิทยา (periodontal therapy) ภายในระยะเวลา 6 เดือนที่ผ่านมา

2.2.2 ได้รับยาปฏิชีวนะ และ/หรือยาต้านการอักเสบ (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

2.2.3 ใช้น้ำยาบ้วนปากในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

2.2.4 หญิงตั้งครรภ์หรือระยะให้นมบุตร

2.2.5 มีอาการ และ/หรือ อาการแสดงการติดเชื้อของฟันและเนื้อเยื่อในช่องปากอย่างอื่นนอกเหนือจากโรคปริทันต์

2.2.6 มีประวัติได้รับภยันตราย (trauma) หรือถอนฟัน ในช่วง 1 เดือนที่ผ่านมา

2.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ใช้สูตรจากRosner [77]

$$\text{ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม} = \frac{(\sigma_1^2+\sigma_2^2)(Z_{1-\alpha/2}+Z_{1-\beta})^2}{\Delta^2}$$

เมื่อZ_{α} = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด type I error (α)= 0.05

Z_{β} = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด type II error (β)= 0.2

σ_n^2 = ความแปรปรวนของข้อมูลในแต่ละกลุ่ม

$\Delta = |\mu_2 - \mu_1|$

μ_n = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในประชากรในแต่ละกลุ่ม

การแทนค่าลงในสูตร ใช้ค่าอ้างอิงจากการศึกษาของ Noack และคณะ[23]

μ_{perio} = 4.06±5.55 mg/L

$\mu_{healthy}$ = 1.70±1.91 mg/L

$$= \frac{\{(1.91)^2+(5.55)^2\}(1.96+0.84)^2}{(2.36)^2}$$

$$= 48.5$$

ดังนั้นควรใช้ขนาดตัวอย่างกลุ่มละ 50 คน

3. เครื่องมือ

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในคลินิก

3.1.1 ชุดตรวจฟันประกอบด้วย กระจกส่องปาก (mouth mirror), ที่คีบสำลี (cotton plier), และเอ็กซ์พลอเรอร์ EXD 5 ของบริษัท Hu-friedy (Chicago, Illinois, USA)

3.1.2 เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe) ชนิด PCPUNC 15 ของบริษัท Hu-friedy (Chicago, Illinois, USA)

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์ สำหรับการหาค่าซีอาร์พี

3.1.3.1 กระบอกพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด

3.1.3.2 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็ม guage 21

3.1.3.3 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

3.1.3.4 เอพเพนดอร์ฟที่ปราศจากเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.3.5 เครื่องวัดค่าความเข้มข้นซีอาร์พี (Behring nephelometer, BN 100)

3.1.3.6 ชุดสำเร็จรูปสำหรับหาค่าความเข้มข้นซีอาร์พี (N High sensitivity CRP, DADE Behring, Germany) ชุดสำเร็จรูปนี้มีค่าต่ำสุดที่วัดได้ (detection limit) คือ 0.15 มิลลิกรัม/

ลิตร (จากการเจือจางที่ 1:20) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ความแปรปรวนในการสอบวิเคราะห์เดียวกัน (Intra-assay variation, n=20) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.1, 2.1, 15, 26, 62 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เท่ากับ ร้อยละ 3.1, 3.8, 3.4, 4.0, 2.3, 4.4 ตามลำดับ

ความแปรปรวนระหว่างการสอบวิเคราะห์ (Inter-assay variation, n=10) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.3, 2.1, 14, 24, 56 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เท่ากับ ร้อยละ 2.5, 3.8, 2.1, 2.6, 3.9, 5.7 ตามลำดับ

3.1.4 อุปกรณ์เก็บและตรวจหาเชื้อ *P.gingivalis*

3.1.4.1 กระดาษรูปกรวย (paper point) และสำลี

3.1.4.2 เอพเพนดอร์ฟ (eppendorf)

3.1.4.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.4 อุปกรณ์ชุดปฏิบัติการทางเซลล์และอณูชีววิทยา ชุดอุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ จากเชื้อ *P.gingivalis* ประกอบด้วยคอลัมน์สำหรับยึดดีเอ็นเอ และสารเคมีต่าง ๆ

3.1.4.5 ออโตปิเปต(autopipette)

3.1.4.6 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง

3.1.4.7 ชุดสารสำเร็จรูปสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์(Qiagen®,Valencia, USA)

3.1.4.8 สารตั้งต้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1.4.9 พีซีอาร์ทิวบ์ (PCR tube)

3.1.4.10 อากาโรสเจล (agarose gel) และชุดเครื่องมือสำหรับทำอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis)

3.1.4.11 ชุดเครื่องมือสำหรับบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 อธิบายและได้รับความยินยอมจากผู้เข้าร่วมโครงการ

ผู้ที่เข้ามารับการรักษาที่ภาควิชาปริทันตวิทยาคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แผนกทันตกรรมโรงพยาบาลขอนแก่น และแผนกทันตกรรมโรงพยาบาลน้ำพอง ทราบถึงรายละเอียดของงานวิจัยและให้ให้ตรวจในช่องปากเพื่อวัดค่าทางคลินิก

4.1.1 ประชากรศึกษาที่มีค่าทางคลินิกตามข้อกำหนดยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ และเซ็นชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการก่อนได้รับการเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ เพื่อนำมาหาปริมาณเชื้อ *P.gingivalis* และเจาะเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณซีอาร์พี

4.1.2 ประชากรศึกษาทั้งหมดได้รับการซักประวัติ ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง เพื่อนำมาคำนวณหาดัชนีมวลกาย รวมถึงประวัติการสูบบุหรี่และการดื่มสุรา ตามแบบฟอร์มการสัมภาษณ์ผู้เข้าร่วมโครงการโดยอาสาสมัครทุกคนได้รับการตรวจและสัมภาษณ์โดยผู้ทำวิจัยเพียงคนเดียวตลอดการศึกษา

4.2 การวัดค่าทางคลินิก (clinical parameter)

4.2.1 ความลึกร่องลึกปริทันต์ (probing depth, PD) วัดโดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ชนิด PCPUNC 15 เป็นค่าจากขอบเหงือกถึงจุดต่ำสุดของร่องเหงือกเป็นมิลลิเมตร โดยวัดทั้ง 6 ตำแหน่งในฟันแต่ละซี่คือ ด้านใกล้แก้มใกล้กลาง (mesio-buccal) ด้านกึ่งกลางใกล้แก้ม (mid-buccal) ด้านใกล้แก้มไกลกลาง (disto-buccal) ด้านใกล้ลิ้นใกล้กลาง (mesio-lingual) ด้านกึ่งกลางใกล้ลิ้น (mid-lingual) ด้านใกล้ลิ้นไกลกลาง (disto-lingual) วัดทุกซี่ในช่องปากยกเว้นฟันกรามแท้ซี่ที่สาม แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเป็นมิลลิเมตร

4.2.2 ระดับยึดเกาะเนื้อเยื่อปริทันต์ (clinical attachment level, CAL) วัดโดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ วัดจากรอยต่อของเคลือบฟันและเคลือบรากฟันถึงจุดต่ำสุดของร่องลึกปริทันต์ ทั้ง 6 ตำแหน่งในฟันแต่ละซี่ เช่นเดียวกันกับข้อ 4.2.1 วัดทุกซี่ในช่องปากยกเว้นฟันกรามแท้ซี่ที่สาม แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเป็นมิลลิเมตร

4.2.3 ดัชนีการมีเลือดออกของเหงือก (gingival bleeding index, GBI) โดยดูการมีเลือดออกหลังจากสอดเครื่องมือตรวจปริทันต์ลากตามร่องเหงือกเป็นเวลา 10 วินาที แล้วให้คะแนนตามเกณฑ์ดังนี้

0 = ไม่มีเลือดออก

1 = มีเลือดออก

วัดค่าโดยนับจำนวนของบริเวณที่มีเลือดออก หารด้วยจำนวนขอบเหงือกที่วัดทั้งหมด และคูณด้วย 100 เพื่อให้ค่าออกมาเป็นร้อยละ

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณซีรัมซีอาร์พี (serum CRP analysis)

4.3.1 ประชากรศึกษาทุกคน ถูกเก็บตัวอย่างเลือดคนละ 5 มิลลิลิตรในวันเดียวกันกับที่เก็บเชื้อ และวัดค่าทางคลินิก

4.3.2 ตัวอย่างเลือดถูกเก็บในกระบอกพลาสติกที่บรรจุในภาชนะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนมีการแข็งตัวของเกล็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ (complete coagulation)

4.3.3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเก็บเลือดจากประชากรศึกษา หากยังไม่สามารถปั่นเหวี่ยงเลือดได้ภายใน 1 ชั่วโมง แช่เลือดในกระติกน้ำแข็งรอจนกว่าจะเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง แต่ไม่เกิน 12 ชั่วโมง

4.3.4 ใช้ออโตปิเปตดูดเฉพาะส่วนใสของซีรัม 500 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง ประชากรศึกษา 1 คนเก็บ 2 ตัวอย่าง ใส่ในเอพเพนดอร์ฟที่ปราศจากเชื้อ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเก็บเลือดจากประชากรศึกษา จนกว่าจะถูกนำมาวิเคราะห์พร้อมกันหมดทุกตัวอย่าง

4.3.5 นำซีรัมที่เตรียมไว้ไปหาค่าความเข้มข้นของซีอาร์พี โดยวิธีพาร์ทิเคิล ลาเท็กซ์-เอนฮานซ์ อิมมูโนเนฟเฟโลเมทรี (particle latex-enhanced immunonephelometry, BN™ System) การตรวจวัดซีอาร์พีด้วยวิธีเนฟเฟโลเมทรีเป็นเทคนิคความไวสูง (high sensitivity assays) มีหลักการคือสารแขวนลอย (polystyrene particles) ซึ่งเคลือบด้วยแอนติบอดีของหนู (mouse monoclonal antibodies) ต่อซีอาร์พี จะตกตะกอนเมื่อทำปฏิกิริยากับซีอาร์พีในซีรัม ความเข้มข้นของการกระเจิงแสง (scattered light) ในเครื่องเนฟเฟโลมิเตอร์(nephelometer) จะขึ้นอยู่กับปริมาณของซีอาร์พีในซีรัม และสามารถหาความเข้มข้นของซีอาร์พีได้โดยเทียบกับค่าที่เจือจาง (dilution) ต่าง ๆของค่ามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น ผู้ที่ดำเนินการหาค่าซีอาร์พีเป็นเจ้าหน้าที่หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ไม่ทราบข้อมูล (blinding) สภาวะทางปริทันต์ของประชากรศึกษา

4.4 การวัดผลทางจุลชีววิทยา (microbiological parameter)

4.4.1 ในอาสาสมัครปกติ สุ่มเก็บเชื้อจากร่องลึกเหงือก 6 ตำแหน่งที่ด้านใกล้แก้มใกล้กลาง ของซี่ #16, 11, 24, 36, 31, 44 ใส่ในเอพเพนดอร์ฟ เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ *P.gingivalis* โดยวิธีพีซีอาร์ หากตำแหน่งดังกล่าวไม่เข้าเกณฑ์ที่ตั้งไว้ ให้เลือกเก็บเชื้อจากตำแหน่งของฟันข้างเคียง ซึ่งเป็นฟันชนิดเดียวกันก่อน จึงค่อยเลือกฟันที่เป็นคนละชนิด เช่น ถ้าไม่มีฟันซี่ # 24 ให้เลือก # 25

ถ้าไม่มีฟันซี่ # 25 ให้เลือก # 26

ถ้าไม่มีฟันซี่ # 26 ให้เลือก # 27

ถ้าไม่มีฟันซี่ # 27 ให้เลือก # 23

4.4.2 กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเลือกเก็บเชื้อจากร่องลึกปริทันต์ที่ลึกที่สุด 6 ตำแหน่งจากแต่ละเซกซ์แตนท์ (sextant)

4.4.3 วิธีการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

4.4.3.1 ซับและกั้นน้ำลายบริเวณที่ต้องการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกให้แห้ง ทำความสะอาดบริเวณเหนือเหงือกโดยคิวเรต (curette) ที่ได้รับการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว

4.4.3.2 สอดกระดาษรูปกรวย (paper point) 2 อันที่ปราศจากเชื้อ ลงในร่องเหงือกที่ได้คัดเลือกตำแหน่งไว้แล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที

4.4.3.3 นำกระดาษรูปกรวยแยกใส่ในเอพเพนดอร์ฟที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.4.4 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีปฏิกิริยาพีซีอาร์

แยกสกัดดีเอ็นเอจากคราบจุลินทรีย์ จากกระดาษรูปกรวยในเอพเพนดอร์ฟ ดังนี้

4.4.4.1 นำเอพเพนดอร์ฟไปเขย่าด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์ 1 นาที จากนั้นนำเอากระดาษรูปกรวยทิ้งไป

4.4.4.2 ปั่นเหวี่ยงเอพเพนดอร์ฟด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

4.4.4.3 นำน้ำส่วนบนทิ้งไป โดยไม่กระทบกระเทือนเพลเล็ท (pellet) ด้านล่าง แล้วเติม InstaGene matrix ลงไป 120 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอุ่นที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที

4.4.4.4 นำไปวอร์เท็กซ์ เป็นเวลา 10 วินาที และต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที

4.4.4.5 นำไปวอร์เท็กซ์ เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2-3 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.4.4.6 เตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตชุดพีซีอาร์ (Qiagen®,Valencia, USA)

4.4.4.7 เลือกคู่ไพร์เมอร์ (primer pair) เลือกอุณหภูมิและจำนวนรอบตามวิธีของ Ashimoto[78] และนำสารทดสอบเข้าเครื่องขบวนการพีซีอาร์

	Primer pairs(5'-3')	Base position (amplicon length in bp)
P. gingivalis	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	719-1,132(404)

Positive control *P. gingivalis* - ATCC 33277, W50

Negative control sterile DD water

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขบวนการพีซีอาร์ มาวิเคราะห์ในอากาโรสเจล อิเลคโตรโฟเลซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์

5. สถานที่ดำเนินการวิจัย

5.1 คลินิกภาควิชาปริทันตวิทยา และห้องปฏิบัติการเซลล์และอณูชีววิทยาภาควิชาจุลชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5.2 แผนกทันตกรรมและห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลขอนแก่น

5.3 แผนกทันตกรรมและห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลน้ำพอง

5.4 ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาโรงพยาบาลศรีนครินทร์

6. แผนผังแสดงขั้นตอนการวิจัย

อธิบายให้ผู้ที่เข้ามารับการรักษา ที่คลินิกภาควิชาปริทันตวิทยาคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แผนกทันตกรรมโรงพยาบาลขอนแก่น และแผนกทันตกรรมโรงพยาบาลน้ำพอง ทราบถึงรายละเอียดของงานวิจัยและให้ความยินยอมให้ตรวจในช่องปากเพื่อวัดค่าทางคลินิก

ยินยอม

ไม่ยินยอม → *คัดออก*

วัดค่าทางคลินิกเพื่อแยกประชากรศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม ตามข้อกำหนดในการคัดประชากรศึกษาในหัวข้อที่ 1

กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบแบบทั่วไป (generalized periodontitis) 21 คน
*มีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร มากกว่า 30% ของตำแหน่งทั้งหมด

กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบแบบเฉพาะที่ (localized periodontitis) 62 คน
*มีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร ไม่เกิน 30% ของตำแหน่งทั้งหมด

กลุ่มควบคุม (control group) 38 คน
* มีร่องลึกปริทันต์ไม่เกิน 4 มิลลิเมตรทุกตำแหน่ง

ประชากรศึกษาทั้ง 3 กลุ่มเซ็นชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ

* เก็บเชื้อจาก 6 ตำแหน่งที่ลึกที่สุดของทั้ง 6 เซกซ์แตนท์
* เก็บเลือดปริมาณ 5 ซีซี

*เก็บเชื้อจากด้าน MB ของฟันซี่ #16, 11, 24, 36, 31, 44
* เก็บเลือดปริมาณ 5 ซีซี

ซักประวัติตามแบบฟอร์มการสัมภาษณ์ผู้เข้าร่วมโครงการ ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง โดยผู้ทำวิจัยจนครบทุกคน ผู้เข้าร่วมโครงการทุกคนได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับสุขอนามัยช่องปาก และให้การรักษาโรคปริทันต์อักเสบในผู้ที่ต้องการรับการรักษา ในการนัดครั้งต่อไป

นำเชื้อที่เก็บจากร่องลึกปริทันต์ ไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาวิเคราะห์หาเชื้อ *P.gingivalis* โดยวิธีพีซีอาร์

นำเลือดที่ได้จากประชากรศึกษามาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการแข็งตัวของเกร็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บเฉพาะส่วนซีรัมปริมาณ 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาวิเคราะห์

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการทั้งหมด 126 คน ถูกคัดออก 5 คน เนื่องจากมีอาการและอาการแสดงดังนี้ ท้องเสีย เพิ่งถอนฟันเมื่อ 2 วันที่ผ่านมา ใส่เครื่องมือจัดฟันแบบติดแน่น มีแผลร้อนในในช่องปาก และได้รับการวินิจฉัยว่าฟันซี่ #26 มี perio-endodontic lesion with abscess ร่วมกับอาการปวดซึ่งมีลักษณะของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน เหลือข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ผลทั้งสิ้น 121 ตัวอย่าง

7.1 การเปรียบเทียบลักษณะของประชากรระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งมีสภาวะของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่แข็งแรงกับกลุ่มศึกษาซึ่งเป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังทั้งแบบเฉพาะที่ และแบบทั่วไป

7.1.1 การเปรียบเทียบ อายุ ดัชนีมวลกาย สภาวะทางคลินิกของโรคปริทันต์ และปริมาณเชื้อ *P.gingivalis* ทดสอบโดยใช้สถิติ Oneway-ANOVA

7.1.2 การเปรียบเทียบปริมาณบุหรี่ที่สูบ (packyear, จำนวนซอง) และปริมาณการดื่มสุรา (จำนวนแก้ว/ปี) ทดสอบโดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test

ปริมาณบุหรี่ที่สูบ (packyear) เป็นการวัดปริมาณการสูบบุหรี่สะสมตลอดชีวิต (cumulative life-time exposure) คำนวณโดยนำจำนวนบุหรี่ที่สูบในแต่ละวันคูณด้วยจำนวนปีที่สูบบุหรี่หารด้วย 20 (= จำนวนบุหรี่ใน 1 ซอง)[79] เนื่องจากแบบสอบถามเกี่ยวกับจำนวนบุหรี่ที่สูบในแต่ละวัน เป็นคำถามแบบปลายปิดให้ตอบเป็นช่วงดังต่อไปนี้ น้อยกว่า 1 มวนต่อวัน, 1-4 มวนต่อวัน, 5-14 มวนต่อวัน, 15-24 มวนต่อวัน, และ มากกว่า 24 มวนต่อวัน จึงแทนค่าจำนวนบุหรี่ที่สูบในแต่ละวันด้วยค่ากลาง (mid-point) ของแต่ละช่วง คือ 0.5, 2.5, 9.5, 19.5 และ 25 ตามลำดับ

การคำนวณปริมาณการดื่มสุรา เนื่องจากแบบสอบถามเป็นคำถามปลายปิด แบ่งปริมาณการดื่มสุรา ดังต่อไปนี้ ไม่เคย หรือดื่มน้อยกว่า 1 แก้วต่อเดือน, 1-3 แก้วต่อเดือน, 1-4 แก้วต่อสัปดาห์, 5 แก้วต่อสัปดาห์ ถึงวันละแก้วและ มากกว่า 1 แก้วต่อวัน จึงทำการแทนค่าด้วยค่ากลางของแต่ช่วง คือ 0, 2 แก้วต่อเดือน, 2.5 แก้วต่อสัปดาห์, 6 แก้วต่อสัปดาห์ และ 2 แก้วต่อวัน ตามลำดับ จากนั้นคูณด้วยจำนวนสัปดาห์หรือเดือนเพื่อเปลี่ยนหน่วยให้เป็นจำนวนแก้วต่อปี

7.1.3 การเปรียบเทียบเพศ สถานที่เก็บข้อมูล ประวัติการสูบบุหรี่ (ไม่เคยสูบ, เคยสูบในอดีต, และสูบ ณ ปัจจุบัน) และประวัติการดื่มสุรา (ดื่ม/ไม่ดื่ม) ทดสอบโดยใช้สถิติ Chi-Square

ในกรณีที่ค่าซีอาร์พีมีค่าต่ำกว่าค่าที่เครื่องมือวัดได้ (lower detection limit) ในงานวิจัยนี้คือน้อยกว่า 0.15 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าซีอาร์พีที่นำมาใช้ในการคำนวณ คือ 0.075 มิลลิกรัม/ลิตร (ครึ่งหนึ่งของค่าที่อยู่ระหว่าง 0 และ 0.15 มิลลิกรัม/ลิตร)

7.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณซีอาร์พีกับโรคปริทันต์อักเสบ

ตรวจสอบการแจกแจงของค่าซีอาร์พี ใช้ Shapiro-Wilks test พบว่าค่าซีอาร์พีมีการแจกแจงไม่ปกติ จากนั้นทำการวิเคราะห์ ดังนี้

7.2.1 เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณซีอาร์พีในกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังทั้งแบบเฉพาะที่ และแบบทั่วไป โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test จากนั้นทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่ (post hoc multiple comparison) โดยใช้ Mann-Whitney-U test ที่ α=0.017

7.2.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณซีอาร์พีกับสภาวะทางคลินิกของโรคปริทันต์อักเสบ โดยใช้สถิติ Spearman's correlation

7.2.3 ใช้ multiple linear regression analysis เพื่อจำลองความสัมพันธ์ของปริมาณซีอาร์พีกับสภาวะปริทันต์อักเสบ โดยดัดแปลงข้อมูลซีอาร์พีให้มีการแจกแจงปกติโดยใช้ log transformation ก่อนแล้วจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ multiple regression analysis มีค่า log ซีอาร์พีเป็นตัวแปรตาม (dependent variable (Y)) และการเป็นโรคปริทันต์อักเสบแบบเฉพาะที่ และแบบทั่วไป เป็นตัวแปรอิสระ (independent variable (X)) คำนึงถึงปัจจัยกวน ได้แก่ เพศ อายุ ดัชนีมวลกาย การสูบบุหรี่ (คำนวณทั้งในเชิงปริมาณเป็นจำนวนซอง และประวัติการสูบในอดีต, สูบ ณ ปัจจุบัน และไม่เคยสูบ) การดื่มสุรา(คำนวณทั้งในเชิงปริมาณเป็นแก้ว/ปี และประวัติการดื่ม)

การเลือกปัจจัยกวนทำโดยใช้ Change-in-estimate method [80]ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่ามีเพียงตัวแปรอายุและดัชนีมวลกายเท่านั้นที่เป็นปัจจัยกวนของความสัมพันธ์ระหว่างซีอาร์พีและสภาวะปริทันต์ โดยเปลี่ยนแปลงค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยของความสัมพันธ์ มากกว่าร้อยละ 10

7.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณซีอาร์พีกับการมีเชื้อ *P.gingivalis*

ผลการวิเคราะห์โดยวิธีพีซีอาร์ออกมาเชิงคุณภาพ คือผลบวกหรือลบ แล้วคิดเป็นร้อยละของตำแหน่งที่มี *P.gingivalis* เป็นบวก (จำนวนตำแหน่งที่มี *P.gingivalis* เป็นบวก/จำนวนตำแหน่งที่เก็บเชื้อ) × 100 ในคนนั้นๆ แล้วแบ่งกลุ่มการมีเชื้อ *P.gingivalis* เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่พบเชื้อเลย กลุ่มที่พบเชื้อน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 (1-3 ตำแหน่ง) และกลุ่มที่พบเชื้อมากกว่าร้อยละ 50 (4-6 ตำแหน่ง) จึงนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ multiple linear regression โดยมี ซีอาร์พีเป็นตัวแปรตาม และร้อยละของตำแหน่งที่มี *P.gingivalis* เป็นบวกเป็นตัวแปรอิสระ ใช้หลักสถิติเช่นเดียวกับข้อ 7.2

การทดสอบสถิติทั้งหมดเป็นการทดสอบแบบสองทางที่ α=0.05 ยกเว้นเฉพาะกรณีของ Post hoc multiple comparison