บทที่ 2
วัสดุและวิธีการวิจัย

1. การเลือกกลุ่มประชากรและการคำนวณจำนวนตัวอย่าง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบตัดขวาง (cross-sectional) และแบบย้อนกลับ (retrospective) ที่ดำเนินการวิจัยในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2552 เพื่อหาความสัมพันธ์ของรูปแบบการคลอดระหว่างการคลอดแบบธรรมชาติและการผ่าตัดคลอดทางหน้าท้องกับการมีเชื้อก่อโรคฟันผุและเชื้อโดยรวมของมารดาและบุตร รวมทั้งศึกษา ECC ในเด็กก่อนวัยเรียนอายุระหว่าง 3-5 ปี

สุ่มตัวอย่างเด็กในช่วงอายุดังกล่าวจำนวนอย่างน้อย 320 คนจากมารดาที่มาคลอดบุตรในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 10 เชียงใหม่ ในช่วง พ.ศ. 2546 จนถึง พ.ศ. 2549 แบ่งตัวอย่างประชากรที่ศึกษา (มารดาและบุตร) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมอย่างน้อย 160 คู่และกลุ่มทดสอบอย่างน้อย 160 คู่ โดยเด็กที่นำมาศึกษาทั้งสองกลุ่มมีเพศและอายุใกล้เคียงกัน (± 6 เดือน)

ในการศึกษานี้ได้คำนวณจำนวนตัวอย่างของกลุ่มประชากรโดยอ้างอิงจากจำนวนของทารกที่มีการบันทึกประวัติการคลอดที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 10 เชียงใหม่ซึ่งมีจำนวน 1,500 คนต่อปี โดยที่ร้อยละ 25 หรือ 320 คนต่อปีคลอดด้วยวิธีผ่าตัดคลอดทางหน้าท้อง นอกจากนั้นยังอาศัยข้อมูลเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยของการมีเชื้อ *S. mutans* ในเด็กซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Li และคณะ (2005a และ 2007b) ซึ่ง Li และคณะได้รายงานว่าเด็กที่ผ่าตัดคลอดทางหน้าท้องมีระดับของเชื้อ *S. mutans* มากกว่าเด็กที่คลอดด้วยวิธีธรรมชาติที่ร้อยละ 89.7 และ 67.7 ตามลำดับ (Li et al, 2005a) โดยมีค่าเฉลี่ยของความเหมือนของประชากรเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับร้อยละ 83.5 (SD ± 6.9) ในคู่มารดาและบุตร(mother-child pairs) และร้อยละ 69.3 (SD ± 3.7) ในผู้ที่ไม่ใช่คู่มารดาและบุตร (non mother-child pairs) (Li et al, 2007b)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบสมมติฐานที่ว่าไม่มีความแตกต่างของการมีเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* องค์ประกอบเชื้อโดยรวมของมารดาและบุตร รวมทั้งการมีฟันผุระหว่างกลุ่มที่คลอดโดยการผ่าตัดคลอดทางหน้าท้องและกลุ่มที่คลอดด้วยวิธีธรรมชาติ โดยกำหนดให้มีค่าระดับความเชื่อมั่น (alpha) เท่ากับ 0.05 จากขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเด็กจำนวนอย่างน้อย 160 คนในแต่ละกลุ่มศึกษาทำให้สามารถแบ่งกลุ่มย่อยเป็นกลุ่มเด็กอายุ 3 ปีได้ 182 คนและอายุ 5 ปีได้ 168 คน รวมจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาทั้งสิ้น 350 คน

เกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรที่ศึกษาได้แก่เด็กที่คลอดด้วยวิธีผ่าตัดคลอดทางหน้าท้องและคลอดด้วยวิธีธรรมชาติที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 10 เชียงใหม่ และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อนหน้าการเก็บตัวอย่างอย่างน้อย 6 สัปดาห์ รวมทั้งมารดาหรือผู้ปกครองของเด็กได้ลงลายมือชื่อยินยอมเข้าร่วมการศึกษาอย่างเป็นลายลักษณ์อักษร ส่วนเกณฑ์ในการไม่คัดเลือกเป็นประชากรที่ศึกษา คือเด็กที่มีความผิดปกติของโครโมโซมอย่างรุนแรงหรือมีความผิดปกติแต่กำเนิด ทั้งนี้การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่แล้ว

แบ่งจำนวนตัวอย่างมารดาและบุตรทั้ง 350 คู่ออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการคลอดและแบ่งย่อยตามอายุของเด็กเป็นอีก 2 กลุ่ม (อายุ 3 และ 5 ปี) รวมเป็น 4 กลุ่มย่อยดังนี้

1. มารดาและบุตรที่คลอดโดยวิธีธรรมชาติอายุ 3 ปีจำนวน 97 คน
2. มารดาและบุตรที่คลอดโดยวิธีธรรมชาติอายุ 5 ปีจำนวน 88 คน

3. มารดาและบุตรที่คลอดโดยวิธีการผ่าคลอดทางหน้าท้องอายุ 3 ปีจำนวน 85 คน
4. มารดาและบุตรที่คลอดโดยวิธีการผ่าคลอดทางหน้าท้องอายุ 5 ปีจำนวน 80 คน

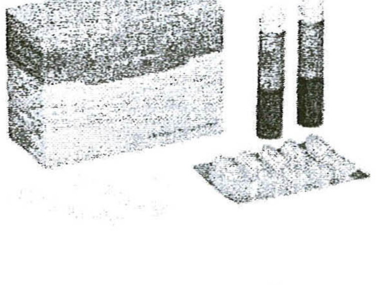
2. การเก็บข้อมูล

ข้อมูลที่เก็บจากมารดาและบุตร ประกอบด้วย ข้อมูลทั่วไป ประวัติการเลี้ยงดู และ ปัจจัยที่เกี่ยวกับตัวมารดา และพฤติกรรมการรับประทานอาหารว่างของเด็ก รวมทั้งมีการตรวจฟันเพื่อหาฟันผุถอนอุดและเก็บตัวอย่างเชื้อในช่องปากของมารดาและเด็ก ซึ่งการเก็บข้อมูลนั้นทำในวันที่เด็กมีนัดฉีดวัคซีนตามวันนัดของโรงพยาบาล ข้อมูลต่างๆ ได้จากการสัมภาษณ์มารดาตามแบบสอบถาม (ดูในภาคผนวก 1) ได้แก่ ประวัติการตั้งครรภ์และการรับยาปฏิชีวนะในช่วง 6 เดือนที่ผ่านมาของทั้งมารดาและบุตร รูปแบบของการคลอด น้ำหนักของทารกแรกคลอด วิธีการเลี้ยงดู และอาหารหรือขนมที่เด็กได้รับได้แก่ น้ำอัดลม น้ำผลไม้ ขนมถุงกรุบกรอบ หมากฝรั่งผสมน้ำตาลลูกอม ท้อฟฟี่ ช้อคโคแล็ต อมยิ้ม ลูกเกด เค้ก คุกกี้ ขนมปัง ซึ่งการเก็บข้อมูลทั้งหมดเป็นไปตามเงื่อนไขของจริยธรรมการทำวิจัยสากลได้แก่ การกรอกใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยที่ผู้เข้าร่วมโครงการได้รับฟังคำชี้แจงว่าการวิจัยนี้ไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ เป็นต้น

จากนั้นทำการตรวจสภาวะฟันผุทั้งมารดาและเด็กโดยทันตแพทย์เพียงคนเดียวตลอดการศึกษาโดยใช้เกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1997) และเกณฑ์อ้างอิงจากสถาบัน National Institute of Dental and Craniofacial Research ในการตรวจและบันทึกผลการเกิดฟันผุ (USHHS, 1989) (ดูในภาคผนวก 2)

3. การเก็บตัวอย่างเชื้อในช่องปาก

การเก็บตัวอย่างเชื้อในช่องปาก แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การเก็บเชื้อก่อโรคฟันผุและการเก็บเชื้อทั้งหมดในช่องปาก โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อก่อโรคฟันผุกลุ่ม mutans streptococci (MS) จากน้ำลายใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (MS Strip, Orion Diagnostica, Finland) เพื่อใช้ประเมินหาปริมาณของเชื้อก่อโรคฟันผุ โดยเริ่มจากการให้มารดาและบุตรเคี้ยวก้อนพาราฟินขนาด 1 กรัมเป็นเวลา 1 นาที แล้วคายทิ้ง จากนั้นทำการเก็บเชื้อตามวิธีของ Jensen and Bratthall (Jensen and Bratthal, 1989) โดยวางไม้เก็บเชื้อด้านที่มีแถบลงแตะบนลิ้น หมุนไม้กลิ้งบนลิ้น 10 ครั้งและหมุนไม้กลับบนลิ้นอีก 10 ครั้ง หลังจากนั้นให้ผู้ถูกเก็บเชื้องับปากลงเบาๆ และดึงไม้เก็บเชื้อออกเพื่อกำจัดน้ำลายส่วนเกิน



รูปที่ 2 ชุดเก็บตัวอย่างเชื้อจากน้ำลายสำเร็จรูป

นำไม้เก็บตัวอย่างเชื้อไปเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารน้ำที่มีส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะ (selective media) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วนำไม้เก็บเชื้อไปผึ่งที่อุณหภูมิห้อง ประเมินจำนวนเชื้อโดยเปรียบเทียบความหนาแน่นของจำนวนโคโลนีของเชื้อ (colony forming unit; cfu) ที่เจริญบนไม้เก็บตัวอย่าง เทียบกับตารางมาตรฐาน (รูปที่ 3) ซึ่งแบ่งความหนาแน่นของโคโลนีของเชื้อออกเป็น 4 ค่าดังนี้

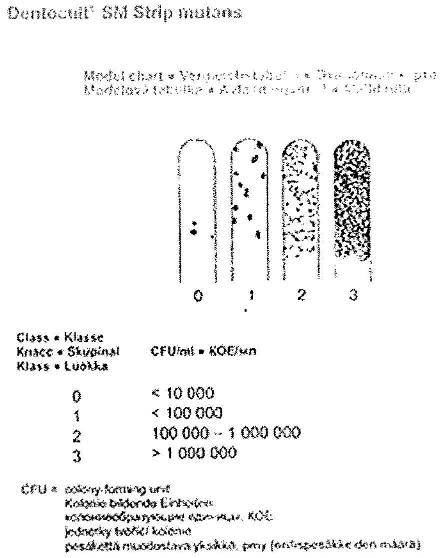
คะแนน 0 หมายถึงมีปริมาณเชื้อกลุ่มนี้เท่ากับ 0 (สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10^4 cfu/ml)

คะแนน 1 หมายถึงมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 1-10 (สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ 10^4-10^5 cfu/ml)

คะแนน 2 หมายถึงมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 11-99 (สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ 10^5-10^6 cfu/ml)

คะแนน 3 หมายถึงมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วงมากกว่า 100 (สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อมากกว่า 10^6 cfu/ml)

ทำการบันทึกผลเป็นคะแนนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป



รูปที่ 3 ตารางมาตรฐานเปรียบเทียบความหนาแน่นโคโลนีของเชื้อ 4 ค่า (คะแนน 0, 1, 2, 3)

ส่วนการเก็บเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในช่องปากทำโดยให้มารดาและเด็กบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดและใช้แปรงสีฟันปลอดเชื้อแปรงฟันให้ทั่วปากเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงจุ่มแปรงสีฟันลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย 1X PBS 10 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองเพื่อชะล้างเอาคราบจุลินทรีย์ออกจากแปรงสีฟันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที แล้วดูดสารละลายในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ลงในภาชนะสำหรับเก็บรักษา DNA (Oragene saliva DNA self-collection kit, Lensden, The Netherlands) (รูปที่ 4) ปิดฝาให้แน่นเพื่อทำให้สารที่มีคุณสมบัติรักษาสาย DNA (DNA preserving fluid) ไหลเข้าไปผสมเข้ากับตัวอย่างเชื้อแล้วพลิกภาชนะดังกล่าวไปมา 5 ครั้ง ภาชนะนี้ถูกออกแบบมาเป็นพิเศษเพื่อให้สามารถเก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลานาน

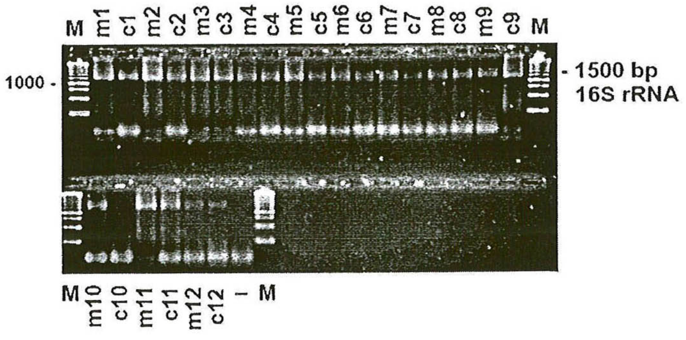
รูปที่ 4 ภาชนะสำหรับเก็บรักษา DNA จากน้ำลาย

4. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจากช่องปาก

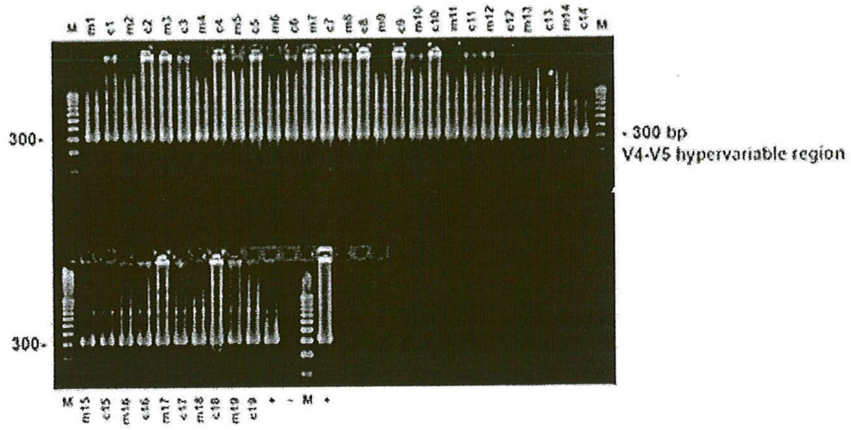
การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียโดยรวมที่เก็บจากช่องปากอ้างอิงตามวิธีของ Li และคณะ (2005b และ 2007a) โดยทำการล้างตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียสำเร็จรูป (MasterPure DNA purification kit, Epicentre, Madison, WI, USA) จากนั้นวัดปริมาณและคุณภาพ DNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (NanoDrop 2000, Wilmington, DE, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Li และคณะ พบว่าวิธีนี้สามารถสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียในช่องปากได้หลากหลายสายพันธุ์ ทั้งกลุ่มเชื้อที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (Li et al, 2005b; Li et al, 2007a, b)

5. การทำ polymerase chain reaction (PCR) **ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก**

ทำ PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (GeneAmp® PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Foster, CA, USA) โดยวิธี nested PCR เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรสารพันธุกรรม 2 รอบ โดยรอบแรกใช้คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มจำนวนส่วนที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด (universal 16S rDNA primers) คือ 16S-8F and 16S-1492R [Lane, 1991] ซึ่งจะได้ PCR product ขนาด 1500 bp และใช้เป็นสารตั้งต้น (template) ในการทำ PCR รอบที่ 2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มจำนวนส่วนที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (hypervariable region) คือ prbac1 and prbac2 [Rupf et al., 1999] โดยมีการเติม GC-clamp จำนวน 40 นิวคลีโอไทด์เข้าไปด้วย (Sheffield et al., 1989; Muyzer et al., 1993; Zoetendal et al., 1998)



รูปที่ 5 ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรก (M = marker, - = negative control, m = mother, C = child)

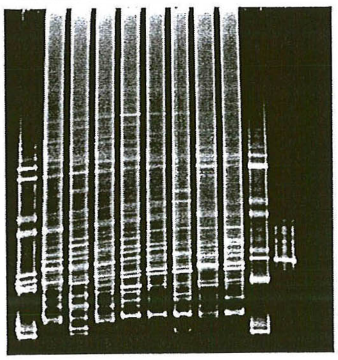


รูปที่ 6 ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่สอง

(M = marker, + = positive control, - = negative control, m = mother, C = child)

6. การทำ DGGE assay

หลังจากการทำ PCR รอบที่ 2 แล้ว นำ PCR product จำนวน 20 ไมโครลิตรมาแยกโดยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) บนแผ่นเจลที่มี 30%-70% denaturatant โดยใช้ Bio-Rad DCode™ System หลังจากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [Li et al., 2005b; Li et al., 2007a; Li et al., 2007b] ทำการถ่ายภาพและบันทึกโดยเครื่อง AlphaImager 3300 System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) และแปลงข้อมูลเข้าสู่ฐานเก็บข้อมูล (microbial profile database)



รูปที่ 7 ผล DNA profile การทำ DGGE assay

(M = marker, + = positive control, - = negative control, m = mother, C = child,)

7. การวิเคราะห์ Bacterial DNA profile

วิเคราะห์ข้อมูล Bacterial DNA profile ด้วยโปรแกรม Fingerprinting II Informatix™ Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ซึ่งเป็นการวัดระยะทางการเคลื่อนที่และความเข้มของแถบ DNA ในแต่ละตัวอย่าง โดยเจลแต่ละแผ่นจะถูกปรับค่าเพื่อให้สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ (normalize) กับค่ามาตรฐาน

(Li et al., 2005b; Li et al., 2007a; Li et al., 2007b) และค่าพื้นหลัง (background) จะถูกหักลบด้วยค่าทางคณิตศาสตร์ขึ้นกับกราฟความเข้มของตัวอย่าง

ตำแหน่งและระดับของแถบ DNA ที่คล้ายกันของตัวอย่างคู่มารดาและบุตรถูกนำไปคำนวณค่า Dice coefficient และแยกแยะโดยการใช้ the Shannon's index (*H'*) for richness (the total number of detected DGGE bands) และ similarity coefficient (C_s)

8. การรวบรวมข้อมูลและการจัดการข้อมูล

บันทึกข้อมูลทั้งหมดจากแบบสอบถามลงในโปรแกรม SPSS ได้แก่ ข้อมูลประวัติการรักษาพยาบาล และผลการประเมินทางคลินิก รวมทั้งข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ทำการลดการบันทึกข้อมูลผิดพลาดโดยใช้ logic rules และตรวจเช็คข้อมูลซ้ำ 2 รอบแบบสุ่ม โดยสุ่มตรวจข้อมูลทั้งหมดจำนวนประมาณร้อยละ 20 มาตรวจค่า missing values แล้วนำไปตรวจสอบกับข้อมูลต้นฉบับว่ามีการขาดหายไปจริงหรือไม่ การจัดการข้อมูลเพิ่มเติม (additional data cleaning) ทำโดยการสรุปและรายงานผลแบบ descriptive เพื่อตรวจสอบข้อมูลทั้งหมดว่าอยู่ในขอบเขตที่ยอมรับได้

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC และวิธีมาตรฐานทางสถิติ ขั้นตอนแรกใช้วิธีการวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนาในการวิเคราะห์ค่าความถี่ของการกระจายตัว (frequency distributions) หาค่าเฉลี่ยและทำการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงพรรณนาต่างๆ ระหว่างกลุ่มมารดาและบุตรที่มีการคลอดแตกต่างกันทั้งในด้านประวัติทางการแพทย์และปัจจัยการเกิดโรคฟันผุ เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มโดยใช้ Chi-square tests และ Analysis of Variance (ANOVA) เพื่อจำแนกและวิเคราะห์ค่าตัวแปรต่างๆ ตัวแปรที่มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติจะถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธีการอื่นๆ ได้แก่ log-transformation เพื่อแก้ไขค่าการกระจายตัวในบางค่าและทำการวิเคราะห์ความเหมือนของ bacterial population profiles ระหว่างคู่มารดาและบุตร