บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการศึกษาและแนวทางการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) โดยทำการเก็บข้อมูลในช่วงระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2552 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2553 โดยมีกลุ่มตัวอย่างจำนวน 51 คน

3.2 การคัดเลือกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่เข้าร่วมในการศึกษาเป็นผู้ป่วยรายใหม่ที่มารับบริการทางด้านทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่โดยการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเป็นไปตามความสะดวกของผู้เข้าร่วมการศึกษา (convenience sampling) และได้รับการตรวจจากทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านปริทันต์ (periodontist) ให้การวินิจฉัยเบื้องต้นเป็นโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง

คำจำกัดความ

โรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง หมายถึง โรคที่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์โดยมีร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์มากกว่า 1 มิลลิเมตร มากกว่าร้อยละ 30 ของตำแหน่งทั้งหมดในช่องปาก และภาพถ่ายรังสีแสดงลักษณะของการสูญเสียกระดูกเบ้าฟัน (AAP, 1999)

3.3 เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมศึกษาและคัดออกจากการศึกษา

3.3.1 ข้อกำหนดในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมศึกษา (Inclusion criteria) มีดังนี้

1. ผู้ป่วยมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบ เช่น ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunodeficiency diseases) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) และมีประวัติทางการแพทย์ที่ต้องได้รับยาปฏิชีวนะก่อนการรักษา
2. มีอายุมากกว่า 20 ปีขึ้นไป
3. มีจำนวนฟันในช่องปากอย่างน้อย 20 ซี่
4. ไม่สูบบุหรี่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 ข้อกำหนดในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างออกจากศึกษา (Exclusion criteria) ดังนี้

1. ผู้ป่วยตั้งครรภ์
2. ผู้ที่มีประวัติการได้รับยาปฏิชีวนะภายในระยะเวลา 3 เดือนที่ผ่านมา
3. ผู้ที่ได้รับการขูดหินน้ำลายและรักษาโรคปริทันต์ใดๆ ภายในระยะเวลา 3 เดือนที่ผ่านมา

3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการคำนวณสำหรับการวิจัยนี้ คำนวณได้จากสูตร [115]

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 [\pi_0(1 - \pi_0) + \pi_1(1 - \pi_1)] / (\pi_0 - \pi_1)^2$$

$$c = 1+(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 [\pi_0(1 - \pi_0)/n + \pi_1(1 - \pi_1)/n + k^2(\pi_0^2 + \pi_1^2)] / (\pi_0 - \pi_1)^2$$

π_0, π_1 = สัดส่วนในการพบเชื้อของการศึกษาที่ผ่านมา

$Z_{\alpha/2}$ = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 (Type I error) ที่ α โดยที่ α =0.05 ดังนั้น Z_{α} =1.96

Z_{β} = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 (Type II error) ที่ β โดยที่ β =0.20 ดังนั้น Z_{β} =0.84

k = ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน

คำนวณขนาดของตัวอย่างจากผลการศึกษาของ Krisanaprakornkit และคณะ [50] ดังนี้

การคำนวณ

$$n = (1.96 + 0.84)^2 [1(1 - 1) + 0.417(1 - 0.417)] / (1 - 0.417)^2$$
$$= 5.607$$
$$= 6$$
$$c = 1 + (1.96 + 0.84)^2 [1(1 - 1)/ 6 + 0.417(1 - 0.417) / 6 + 1^2(1^2 + 0.417^2)] / (1 - 0.417)^2$$
$$= 29.01$$

ต้องใช้ขนาดตัวอย่างอย่างน้อย 30 คน สำหรับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

$$n = (1.96 + 0.84)^2 [0.917(1 - 0.917) + 0.583(1 - 0.583)] / (0.917 - 0.583)^2$$
$$= 22.43$$
$$= 23$$
$$c = 1 + (1.96 + 0.84)^2 [0.917(1 - 0.917)/ 23 + 0.583(1 - 0.583) / 23 + 1^2(0.917^2 + 0.583^2)] / (0.917 - 0.583)^2$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

= 84.96

ต้องใช้ขนาดตัวอย่างอย่างน้อย 85 คน สำหรับเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย

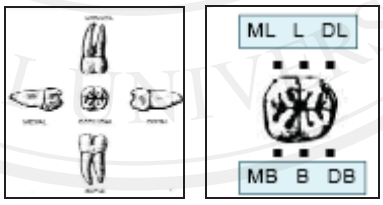
3.5 การขออนุมัติการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยได้รับการอนุมัติเมื่อวันที่ 27 ตุลาคม พ.ศ.2552 ผู้เข้าร่วมการศึกษาได้รับข้อมูล และคำอธิบายถึงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัยอย่างละเอียด พร้อมกับได้ลงชื่อในหนังสือยินยอมโดยความสมัครใจ (informed consent)

3.6 การตรวจสภาพอวัยวะปริทันต์

การตรวจลักษณะทางคลินิก ซึ่งประกอบด้วย

3.6.1 สภาวะปริทันต์ กลุ่มตัวอย่างทุกคนได้รับการตรวจสภาวะทางปริทันต์ โดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe) ชนิด PCPUNC 15 (Hu- friedy, Chicago, Illinois, USA) และบันทึกสภาวะปริทันต์ใน 6 ตำแหน่งต่อฟันหนึ่งซี่ ในตำแหน่งด้านแก้มใกล้กลาง ด้านแก้ม ด้านแก้มไกลกลาง ด้านลิ้นไกลกลาง ด้านลิ้น ด้านลิ้นใกล้กลาง การตรวจฟันจะทำการตรวจฟันในช่องปากทุกซี่ ยกเว้น ฟันกรามซี่สุดท้าย (third molar) โดยใช้แบบบันทึกสภาวะปริทันต์ ที่ได้จากสาขาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รูปที่ 2 แสดงการตรวจสภาวะปริทันต์ใน 6 ตำแหน่งต่อซี่ (ดัดแปลงจาก www.biodenix.com)

3.6.2 ร่องลึกปริทันต์ (Probing depth: PD)

ร่องลึกปริทันต์จะทำการตรวจโดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์สอดเข้าไปในร่องลึกปริทันต์ที่ต้องการตรวจจนปลายเครื่องมือตรวจปริทันต์สิ้นสุดบริเวณจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์ (base of pocket) และอ่านค่าระยะความลึกของร่องลึกปริทันต์บนเครื่องมือตรวจปริทันต์ในระดับพอดีขอบเหงือก (free gingival margin) โดยบันทึกค่าเป็นจำนวนเต็ม หน่วยเป็นมิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3 แสดงเครื่องมือตรวจปริทันต์ชนิด PCPUNC 15 ที่มีขีดแบ่งทุก1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก www.biodenix.com)

ในการตรวจทางคลินิกผู้ตรวจจะใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ที่มีขีดแบ่งทุก 1 มิลลิเมตรและใช้ตำแหน่งของรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟันเป็นจุดอ้างอิง โดยวางเครื่องมือตรวจปริทันต์ขนานไปกับแนวแกนของตัวฟัน (long axis) แสดงในรูปที่ 4

รูปที่ 4 แสดงการวางเครื่องมือตรวจปริทันต์ (ดัดแปลงจาก www. gumbleeding.com)

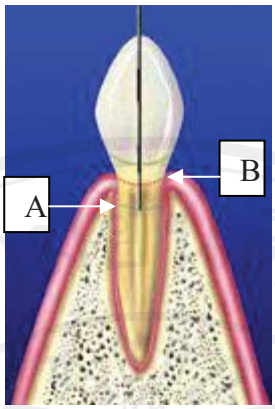
3.6.3 เหงือกร่น (Gingival recession)

ตรวจโดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์วัดระยะจากจุดอ้างอิงคือ รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction) ถึงขอบเหงือก กรณีที่มีเหงือกร่นค่าดังกล่าวมีค่าเป็นบวก แต่ในกรณีที่ขอบเหงือกอยู่สูงกว่าจุดอ้างอิง ค่าเหงือกร่นบันทึกค่าเป็นลบ โดยวัดในตำแหน่งเดียวกับที่ทำการวัดร่องลึกปริทันต์ บันทึกค่าเป็นจำนวนเต็ม หน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.6.4 การสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (Clinical attachment level: CAL)

เป็นค่าที่ได้จากการรวมค่าของร่องลึกปริทันต์และเหงือกร่น บันทึกค่าเป็นจำนวนเต็ม หน่วยเป็นมิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 5 วิธีการคำนวณการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (CAL) จากค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์ (A) บวกกับระยะของเหงือกร่น (B) (ดัดแปลงจาก www.dent.ucla.edu)

3.6.5 ดัชนีเหงือกอักเสบ (Gingival index) โดย Löe (1967) [116] ดังแสดงในรูปที่ 5

0 = เหงือกปกติ

1 = เหงือกอักเสบเล็กน้อย โดยสีของเหงือกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เหงือกบวมเล็กน้อย ไม่มีจุดเลือดออกภายหลังการใช้เครื่องมือทางปริทันต์สอดเข้าไป

2 = เหงือกอักเสบปานกลาง โดยเหงือกมีสีแดงและบวม มีจุดเลือดออกภายหลังการใช้เครื่องมือทางปริทันต์สอดเข้าไป

3 = เหงือกอักเสบรุนแรง โดยเหงือกมีสีแดงและบวมอย่างเห็นได้ชัด มีแนวโน้มมีจุดเลือดออกเมื่อใช้เครื่องมือทางปริทันต์สอดเข้าไป

3.6.6 ดัชนีคราบจุลินทรีย์ (Plaque index) โดย Silness & Löe (1964) [117] (รูปที่ 6)

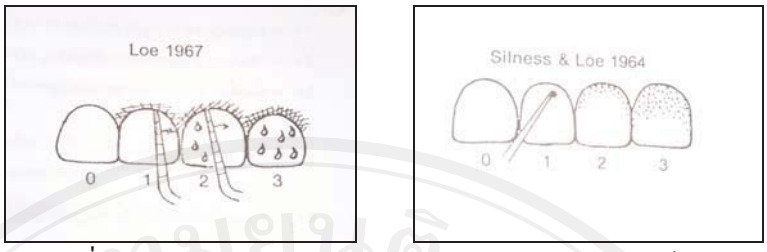
0 = ไม่พบคราบจุลินทรีย์

1 = ไม่พบคราบจุลินทรีย์เมื่อมองด้วยตาเปล่า แต่เมื่อใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์สามารถเขี่ยติด

2 = มีคราบจุลินทรีย์ที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = มีคราบจุลินทรีย์ที่สามารถเห็นในปริมาณมากบนผิวฟัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 6 แสดงดัชนีเหงือกอักเสบ และดัชนีคราบจุลินทรีย์

3.7 การถ่ายภาพรังสีแพโนรามา

ภายหลังการตรวจในช่องปากแล้ว หากพบว่าผู้ป่วยมีร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตรหรือพบความผิดปกติอื่นๆในช่องปากที่ต้องการตรวจเพิ่มเติมด้วยภาพถ่ายรังสี ทันตแพทย์ที่ทำการตรวจทางคลินิกนำส่งถ่ายภาพรังสีแพโนรามา โดยนำมาใช้ในการดูระดับการละลายของกระดูกเบ้าฟัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบเพิ่มเติมร่วมกับการตรวจทางคลินิก เพื่อนำสู่การวินิจฉัยโรคและใช้ในประกอบการวางแผน การรักษาทางปริทันต์และปัญหาในช่องปากอื่นๆ ของผู้ป่วยต่อไป

3.8 การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ (plaque sampling)

ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ภายหลังการตรวจทางคลินิกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยทำการเลือกบริเวณเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ จากตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ตื้นและลึก ร่วมกับการใช้ข้อมูลจากภาพถ่ายรังสีเพื่อดูการทำลายอวัยวะปริทันต์ร่วมด้วย การเก็บตัวอย่างของร่องลึกปริทันต์ตื้นและลึกต้องไม่อยู่ในฟันซี่เดียวกันเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากร่องลึกปริทันต์ที่ต่างกัน ตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จะถูกเก็บจากทุกตำแหน่งเมื่อเป็นไปตามความลึกที่กำหนด โดยจะนำตัวอย่างมารวมกันและแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่มีร่องปริทันต์ตื้น (shallow site) คือ บริเวณที่มีร่องลึกปริทันต์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตร
2. กลุ่มที่มีร่องปริทันต์ลึก (deep site) คือ บริเวณที่มีร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ (subgingival plaque sample)

1. ก่อนการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ กันน้ำลายบริเวณที่ต้องการเก็บให้แห้ง กำจัดคราบจุลินทรีย์และหินน้ำลายเหนือเหงือก โดยใช้คิวเร็ท (curette)
2. การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก จะสอดกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ (sterile paper point) ลงไปในร่องลึกปริทันต์ในตำแหน่งที่เลือกไว้โดยจะต้องไม่อยู่ในฟันซี่เดียวกันโดยเว้นตำแหน่งที่เก็บอย่างน้อย 1 ซี่ และทิ้งกระดาษซับไว้นาน 20 วินาที
3. นำกระดาษซับที่เก็บตัวอย่างจากแต่ละตำแหน่งใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ sterile phosphate buffer saline: PBS ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร โดยตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจะถูกเก็บรวมกัน (pooled subgingival plaque) โดยแยกใส่หลอดตามกลุ่มของร่องปริทันต์ที่ตื้นหรือลึก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้วิเคราะห์ต่อไป

3.9 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.9.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

ดีเอ็นเอของแบคทีเรียในตัวอย่างถูกสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini-kit (Qiagen®,Valencia, CA, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

1. นำหลอดเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ละลายในน้ำแข็ง นำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex) เป็นเวลา 1 นาที
2. ดูดตัวอย่างสารละลายปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างสารละลายใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
4. ดูดตัวอย่างสารละลายส่วนบนทิ้ง เหลือส่วนที่ตกตะกอนไว้
5. เติมสารละลาย ATL buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย
6. นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และในระหว่างนั้นนำสารละลายออกมาเขย่าด้วยด้วยเครื่องผสมสารละลายทุก 20 นาที
7. เติมสารละลาย AL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
8. นำไปแช่ในกล่องควบคุม (heat box) อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
9. เติมสารละลายเอทานอล (absolute ethanol) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
10. ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน spin column ที่รองด้วยหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร (collection tube)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสใน collection tube และเปลี่ยนใส่ในหลอดทดลองใหม่
12. เติมสารละลาย AW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน spin column
13. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสใน collection tube และเปลี่ยนใส่ในหลอดทดลองใหม่
14. เติมสารละลาย AW2 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน spin column
15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนใสใน collection tube ใส่ลงใน spin column ที่รองด้วยหลอดเอพเพนดอร์ฟ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
16. เติมสารละลาย AE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 นาที
17. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
18. นำสารละลายที่ได้ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอของแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบว่าในตัวอย่างคราบจุลินทรีย์นั้นมีดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่จริงก่อนนำไปตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธียต่อไป

3.9.2 การตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ดีเอ็นเอที่สกัดจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกถูกนำมาตรวจหาดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยใช้ ubiquitous primer เพื่อตรวจสอบว่าในสารสกัดดีเอ็นเอมีดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่จริงก่อนนำมาตรวจสอบหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงของแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อไป ลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ดังในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>ตารางที่ 4</u> แสดงไพรเมอร์จำเพาะของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย และแบคทีเรียทั่วไป

Periopathogens	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	729-1,132 (404)
T. forsythia	GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	120-760 (641)
Ubiquitous primer	GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC CCC GGG AAC GTA TTC ACC G	786-1,387 (602)

ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส มีการเตรียมสารต่างๆให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วย

1. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP; Fermentas, Burlington, Ont., Canada) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
2. 10x PCR buffer (Qiagen®,Valencia, CA, USA) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์
3. เอนไซด์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (Taq DNA polymerase; Qiagen®,Valencia, CA, USA) ความเข้มข้น 1.25 ยูนิต
4. คู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นยีนในส่วน 16S rRNA ซึ่งนำมาขยายชิ้นส่วน อ้างอิงตามการศึกษาของ Ashimoto และคณะ (1996) ดังแสดงในตารางที่ 4
5. นำ reaction mixture ที่เตรียมได้ในปริมาตร 45 ไมโครลิตร ผสมกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ในการศึกษาใช้ดีเอ็นเอที่เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) โดยเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้แก่ *P.gingivalis* -ATCC 33277 และ*T.forsythia* - ATCC 43037 (ATCC®, Manassas, VA, USA) และตัวควบคุมลบ (negative control) ได้แก่ น้ำกลั่น (sterile distilled water)

3.9.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

นำสารละลายผสมที่เตรียมไว้ใส่ในเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Thermal cycler; Eppendorf Mastercycler® Gradient, Germany) โดยการตั้งอุณหภูมิตามชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา อ้างอิงตามการศึกษาของ Ashimoto และคณะ (1996) ดังนี้

1. **การตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยใช้ ubiquitous primer**:
    1. Initial denaturation step อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
    2. ตามด้วยการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการจับของไพร เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

annealing) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพร์เมอร์ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจนครบ 36 รอบ

3. อุณหภูมิสุดท้าย (final step) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. **เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย**

1. อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
2. ตามด้วยการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยการจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพร์เมอร์ ที่อุณหภูมิ

72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจนครบ 36 รอบ

3. อุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

3.9.4 การวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

1. นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส มาตรวจด้วยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีส (Electrophoresis) บนเอกาโรสเจล (1.5% agarose gel electrophoresis) ที่ผสม ethidium bromide ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยทุกเจลจะมีการใช้แถบดีเอ็นเออ้างอิง 1 kb DNA ladder (Fermentas, Burlington, Ont., Canada) ใส่ไว้เพื่อใช้เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ
2. นำเอกาโรสเจลส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตเพื่อตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอตัวอย่าง เทียบกับแถบดีเอ็นเออ้างอิงโดยใช้และบันทึกด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพรุ่น UVP Auto-Chemi and Software Labworks 4.5 (AC1 Auto Darkroom Set-up & Operating Instruction, UK)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Statistical Package for Social Science (SPSS) version 16.0 และมีการวิเคราะห์ใน 2 รูปแบบดังนี้

1. การวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics)

แสดงข้อมูลทั่วไป และสภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ เพศ อายุ จำนวนฟันที่เหลืออยู่ในช่องปาก ค่าเฉลี่ยในแต่ละระดับร่องลึกปริทันต์ ค่าเฉลี่ยของการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ แสดงเป็นจำนวน ร้อยละ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่ามัธยฐานและค่าพิสัยควอไทด์ ความถี่ของการพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย โดยแสดงเป็นค่าความถี่และร้อยละ

2. การวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics)

เพื่อเปรียบเทียบความชุกเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธีย ในแต่ละกลุ่มของร่องลึกปริทันต์ที่ตื้นหรือลึกและในแต่ละบุคคล โดยใช้สถิติ McNemar test โดยกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.05$

เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวชี้วัดทางคลินิก เช่น ร่องลึกปริทันต์ การสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ ดัชนีเหงือกอักเสบ ดัชนีคราบจุลินทรีย์ ระหว่างกลุ่มที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเธียโดยใช้สถิติ Mann Whitney U test โดยกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.05$

3.11 สถานที่ใช้ในการวิจัย

1. คลินิกนักศึกษารวมชั้นปีที่ 5 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. คลินิกบัณฑิตศึกษา สาขาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved