บทความปริทัศน์
Review Article

วิธีการตรวจหาแบคทีเรียในทางปริทันตวิทยา
Microbiological Tests in Periodontology

พรรณวดี พันธัย
สาขาวิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Panwadee Bandhaya
Section of Periodontology, Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม.ทันตสาร 2554; 32(2) : 13-22
CM Dent J 2011; 32(2) : 13-22

บทคัดย่อ

วิธีการตรวจหาแบคทีเรียหลายวิธีถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ วิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับนั้นทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่มากขึ้นเกี่ยวกับบทบาทของแบคทีเรียต่อโรคปริทันต์อักเสบ ทบทวนวรรณกรรมฉบับนี้ได้นำเสนอหลักการของวิธีการตรวจหาแบคทีเรียแบบต่างๆ ในการศึกษาทางปริทันตวิทยา รวมถึงข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดของแต่ละวิธี

คำสำคัญ: วิธีการตรวจหาแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์

Abstract

Several microbiological tests have been used to identify periodontal pathogens. The succession of new techniques has brought major understanding for the role of bacteria in periodontal diseases. This review presents principles, advantages and limitations of various techniques used for bacterial detection in periodontal research.

Keywords: microbiological test, periodontal pathogens

Corresponding Author:

พรรณวดี พันธัย
อาจารย์ สาขาวิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

Panwadee Bandhaya
Lecturer, Section of Periodontology, Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.
E-Mail: panwadee@chiangmai.ac.th

บทนำ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีสาเหตุหลักจากแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์ โดยมีปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรคและปัจจัยเสี่ยงอีกหลายปัจจัยที่ทำให้แต่ละบุคคลมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่ไม่เท่ากัน[1] การศึกษาเกี่ยวกับโรคปริทันต์อักเสบนั้น การศึกษาส่วนหนึ่งมุ่งเน้นการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่เป็นส่วนประกอบในแผ่นคราบจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ[2] นอกจากนี้การศึกษาในด้านการพัฒนาวิธีการรักษาโรคปริทันต์นั้น มีการศึกษาบางส่วนที่ศึกษาส่วนประกอบของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ที่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการรักษาด้วยวิธีการต่างๆ[3,4] หรือเปรียบเทียบระหว่างวิธีการรักษาที่แตกต่างกัน[5] เป็นต้น

วิธีตรวจหาเชื้อแบคทีเรียนั้นมีอยู่หลายวิธีซึ่งได้รับการพัฒนาให้มีความแม่นยำและเชื่อถือได้มาเป็นลำดับ แต่ละวิธีมีข้อได้เปรียบและข้อจำกัดที่ต่างกันออกไป ทั้งในด้านความยากง่ายของวิธีการ ค่าใช้จ่าย เวลาที่ใช้ รวมไปถึงความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด[6-8]

ทบทวนวรรณกรรมฉบับนี้ ได้รวมรวมข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ ข้อได้เปรียบและข้อจำกัดของแต่ละวิธี เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสมต่อไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อ (bacterial culture)

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เป็นวิธีการดั้งเดิมในการศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารวุ้น (agar-containing solid culture media) ร่วมกับการปรับอุณหภูมิและภาวะออกซิเจนให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ต้องการศึกษาจากนั้นใช้คุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีในการจำแนกชนิดของเชื้อ เป็นวิธีการซึ่งใช้เป็นมาตรฐานทอง (gold standard)ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการใหม่ๆ[9,10] เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้สามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรียที่เฉพาะเจาะจงได้โดยการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective media) สำหรับแบคทีเรียชนิดนั้นๆ

ข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงเชื้อคือสามารถตรวจหาแบคทีเรียหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณปริมาณของแบคทีเรียได้ เป็นวิธีการที่สามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ โดยเชื้อที่ถูกตรวจพบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้สามารถนำไปตรวจสอบยืนยันชนิดของแบคทีเรียได้ด้วยวิธีการอื่น นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการที่ใช้ทดสอบความไวหรือการต้านต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียได้ (antibiotic sensitivity) อย่างไรก็ดี วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อยังมีข้อจำกัดในหลายด้าน อาทิเช่น แบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบนั้นจำเป็นต้องมีชีวิต ดังนั้น ระยะเวลา และการขนส่งเชื้อจำเป็นต้องทำอย่างรวดเร็ว รวมไปถึงสารตัวกลางในการขนส่งแบคทีเรีย (transport media) ต้องมีความเหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียคงความมีชีวิตอยู่ และพบว่าแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หรือเพาะเลี้ยงได้แต่ต้องอาศัยเทคนิคในการเพาะเลี้ยงที่ยุ่งยาก เช่น เชื้อแทนเนอเรลลาฟอร์ซัยเธีย (*Tanneralla forsythia*) และ เทรบโพนีมา เดนติโคลา (*Treponemadenticola*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญ เป็นต้น นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อต้องอาศัยความเชี่ยวชาญในการทำ รวมไปถึงระยะเวลาในการศึกษาค่อนข้างนานเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางปริทันตวิทยาอย่างแพร่หลายในยุคแรกๆ โดยส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ[11,12] ในปัจจุบันยังคงมีการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับการตรวจทางชีววิทยาโมเลกุลอื่นๆ เพื่อตรวจหาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ในระดับสายพันธุ์[13] รวมไปถึงการตรวจหาการต้านต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย[14]

อิมมูโน แอสเสย์ (immunoassays)

เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยแอนติบอดี (antibody) ที่สามารถจดจำแอนติเจน (antigen) ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียได้ สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ ไดเร็คและอินไดเร็คอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ ไมโครสโคปี (direct and indirect immunofluorescent microscopy)[15] โฟล ไซโตเมทรี (flow cytometry)[16] เอนไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนท์ แอสเสย์ (enzyme-

linked immunosorbent assay, ELISA)[17] แบคทีเรียล คอน-เซนเตรชั่น ฟลูออเรสเซนซ์ อิมมูโนแอสเสย์ (bacterial concentration fluorescence immunoassay, BCFIA)[18] และลาเท็กซ์ แอกกลูทิเนชัน (latex agglutination)[19] เป็นต้น วิธีอิมมูโน แอสเสย์นี้มีข้อได้เปรียบ คือ แบคทีเรียไม่จำเป็นต้องมีชีวิต จึงง่ายต่อการเก็บและขนส่งตัวอย่างเชื้อ เป็นวิธีการที่ทำได้เร็ว และต้นทุนไม่สูง เมื่อเทียบกับวิธีการอื่น นอกจากนี้ยังสามารถบอกปริมาณของเชื้อได้คร่าวๆ อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้มีข้อจำกัด คือ สามารถตรวจหาแบคทีเรียที่ทราบชนิดและมีแอนติบอดีที่เตรียมได้แล้วเท่านั้น แอนติบอดีที่เลือกใช้อาจไปจับกับแอนติ-เจนของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ซึ่งเรียกว่า ปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) และวิธีการนี้ไม่สามารถตรวจหาการต้านต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียได้

วิธีอิมมูโน แอสเสย์นี้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์[20,21] รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียภายในร่องลึกปริทันต์ภายหลังการใช้ยาปฏิชีวนะ[22]

เอนไซม์ แอสเสย์ (enzyme assay)

เป็นวิธีการในการตรวจหาเอนไซม์บางชนิดที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ได้แก่ คอลลาจีเนส (collagenase) เปปไทเดส (peptidase) ทริปซินไลค์ เอนไซม์ (trypsin-like enzymes) นิวทรัล โพรทีเอส (neutral protease) และ อีลาสเทส (elastase) เป็นต้น

เชื้อก่อโรคปริทันต์ที่สำคัญบางชนิด ได้แก่ เทรบโพนีมา เดนติโคลา (*Treponemadenticola*) แทนเนอเรลลาฟอร์ซัยเธีย (*Tannerella forsythia*) พอร์ไฟโรโม-แนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) และ เชื้อในกลุ่มแคปโนซัยโตฟาการ์ (*Capnocytophaga* spp.) มีคุณสมบัติในการสร้างทริปซินไลค์ เอนไซม์ จึงได้มีการพัฒนาการตรวจหาเอนไซม์ชนิดนี้จากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเพื่อตรวจหาระดับของเชื้อก่อโรคปริทันต์เหล่านี้ โดยการตรวจวัดจากความสามารถในการไฮโดรไลส์ (Hydrolyse) สารสังเคราะห์เอ็น-เบนโซอิล-ดี-แอล-อาร์จินิน-ทู-แนปธีลาไมด์ (*N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide;* BANA) ซึ่งเป็นสารไม่มีสี ให้กลายเป็นสารสีน้ำเงินดำภายหลังการทำปฏิกิริยาโดยความเข้มของสีภายหลังการทำปฏิกิริยาอาจเป็นตัวบ่งชี้สัดส่วนของแบคทีเรียได้อย่างคร่าวๆ[23] เรียกการตรวจสอบหาเอนไซม์ชนิดนี้ว่าบานาเทสต์ (BANA test)

วิธีบานาเทสต์นี้ ถูกนำมาใช้ตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อย่างแพร่หลายในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา[24,25] ตลอดจนมีการพัฒนาชุดตรวจทางการค้าเพื่อความสะดวกในการใช้งานในคลินิกทันตกรรม[26] อย่างไรก็ดี วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ไม่สามารถบอกชนิดของแบคทีเรียที่จำเพาะได้ แบคทีเรียต้องมีชีวิตและมีปริมาณมากพอที่จะทำปฏิกิริยาอย่างชัดเจน หากการตรวจให้ผลลบไม่ได้แสดงถึงการไม่มีแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ชนิดอื่น จึงทำให้วิธีการนี้ได้รับความนิยมลดลงอย่างมากในปัจจุบัน

การตรวจทางชีววิทยาโมเลกุล (Molecular biology techniques)

เป็นวิธีการในการตรวจหาแบคทีเรียโดยอาศัยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วยเทคนิคหลายรูปแบบ ได้แก่ นิวคลีอิค แอซิด โพรบ ซึ่งเป็นการใช้โพรบหรือดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาทำเครื่องหมายไว้ด้วยเอนไซม์ หรือกัมมันตภาพรังสีบนโมเลกุล เพื่อให้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่เป็นคู่สมกันได้ วิธีการนี้ได้ถูกนำมาพัฒนาให้สามารถตรวจหาแบคทีเรียได้หลายชนิดพร้อมกัน เรียกว่า เชคเกอร์บอร์ด ดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชั่น (checkerboard DNA-DNA hybridization) อีกเทคนิคหนึ่งได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งใช้หลักการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนจำเพาะของแบคทีเรียในดีเอ็นเอเป้าหมาย เพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะตรวจหาได้ง่าย

เชคเกอร์บอร์ด ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชั่น (Checkerboard DNA-DNA hybridization)

วิธีการนี้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรียได้มากถึง 40 ชนิดในเวลาเดียวกัน[27] รวมไปถึงจำนวน

ตัวอย่างที่ถูกนำมาทดสอบหาแบคทีเรียก็สามารถทำได้หลายตัวอย่างในการทดสอบเพียงครั้งเดียว การทดสอบจะใช้โพรบที่เป็นดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งสาย (whole chromosomal DNA) นำมาติดฉลากด้วยไดก๊อกซิจินิน (digoxiginin) โดยดีเอ็นเอจากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบนั้นจะถูกนำมายึดแน่นกับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยระบบสูญญากาศ ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเล็ต หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิสูงเพื่อให้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบมีการจับกับโพรบที่เป็นคู่สมกัน จากนั้นทำการตรวจดีเอ็นเอที่จับคู่กันด้วยแอนติบอดีต่อไดก๊อกซิจินินซึ่งถูกนำมายึดกับเอนไซม์ฟอสฟาเตสก่อน (phosphatase-conjugated anti-digoxiginin antibody) หลังจากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับสารเคมิฟลูออเรสเซนส์ (chemifluorescence substrates) และทำการตรวจโดยใช้เครื่องตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (fluorescence scanning instrument) ซึ่งสามารถแปลงสัญญาณเรืองแสงเพื่อตรวจนับปริมาณดีเอ็นเอได้ ในกรณีที่ไม่มีเครื่องตรวจจับสัญญาณเรืองแสง สามารถนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มกับสารเคมิฟลูออเรสเซนส์จากนั้นนำไปตรวจหาสัญญาณเรืองแสงโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปใส่ในกล่องที่มีเอกซ์เรย์ฟิล์มอยู่ เมื่อทำการล้างฟิล์มก็จะเห็นสัญญาณเรืองแสงโดยสามารถนำมาเทียบหาปริมาณดีเอ็นเอได้จากตัวควบคุมที่ทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแล้ว

ข้อได้เปรียบของวิธีเซคเกอร์บอร์ด ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชั่นนอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว คือเป็นวิธีการที่ทำได้รวดเร็ว มีความไว ราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น รวมถึงแบคทีเรียที่นำมาทดสอบไม่จำเป็นต้องมีชีวิต นอกจากนี้ยังสามารถบอกปริมาณของแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ดี วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ เป็นวิธีที่ต้องการความเชี่ยวชาญในการทำอย่างมาก มักเกิดการจับของโพรบกับดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะได้ง่าย (non-specific binding) และสามารถตรวจสอบได้เฉพาะแบคทีเรียที่ทราบชนิดเท่านั้น

ในทางปริทันตวิทยานั้น การศึกษาที่ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยเทคนิคเซคเกอร์บอร์ด ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชั่นมีการใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งการศึกษาเพื่อตรวจหาแบคทีเรียหลายชนิดซึ่งสามารถบอกความเป็นระบบนิเวศน์ของแบคทีเรียในภาวะปกติเทียบกับภาวะที่เกิดโรคปริทันต์[2] การศึกษาในเชิงระบาดวิทยา[28] รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ภายหลังการใช้ยาปฏิชีวนะ[29]

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อที่ใช้หลักการของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่รวมกับดีเอ็นเออื่นโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน โดยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นจำต้องมีการสังเคราะห์ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นสายโอลิโกนิวคลิโอไทด์ (oligonucleotide) สั้นๆ ขึ้นมาก่อน โดยไพรเมอร์นี้จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับปลายแต่ละด้านของดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้น ประกอบด้วยดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป้าหมาย ไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP ที่ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ทั้ง 4 ชนิด และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 3 ขั้นตอน (1 รอบปฏิกิริยา) โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มเป็น 2 เท่าดังนั้นเมื่อปฏิกิริยานี้ดำเนินซ้ำกันหลายๆ รอบ ดีเอ็นเอเป้าหมายก็จะมีการเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ (exponential) จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขึ้นกับปริมาณเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปใช้ 30-35 รอบ การดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้เครื่องเทอร์โมไซเคลอร์ (thermocycler) ซึ่งเป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิให้เปลี่ยนตามระยะเวลาที่กำหนดเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิตลอดการดำเนินปฏิกิริยาตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสิ้น จากนั้นจะทำ

การตรวจหาดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป้าหมายด้วยการทำอีเลคโตรโฟรีสิส (electrophoresis) บนแผ่นวุ้นอกาโรส (agarose gel) ที่ถูกย้อมด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) ในการแปลผลนั้น จะตรวจนับเพียงความถี่หรือความชุกของการพบแบคทีเรีย

การศึกษาในทางปริทันตวิทยา ได้มีการนำวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาตรวจหาแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย ทั้งการศึกษาในเชิงระบาดวิทยาของเชื้อก่อโรคปริทันต์[28,30] การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรค[31,32] รวมไปถึงยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรง (virulence gene) ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์บางชนิด[33-35]

อย่างไรก็ดี ถึงแม้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพื้นฐาน (conventional PCR) จะมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการอื่นๆ หลายประการ ได้แก่ เป็นวิธีการที่มีความไวอย่างมาก สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ แบคทีเรียที่นำมาทดสอบไม่จำเป็นต้องมีชีวิต ใช้เวลาในการทดสอบไม่นาน แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ และมีการปนเปื้อน (contamination) ได้ง่าย จำเป็นต้องใช้ทักษะและความระมัดระวังในการทำงานอย่างมาก

ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้สามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป้าหมายที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้โดยตรง เรียกว่า เรียลไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) หรือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นทวีคูณเช่นเดียวกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพื้นฐาน แต่ใช้การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาโดยอาศัยสารเรืองแสงซึ่งจะถูกตรวจวัดความเข้มเป็นสัดส่วนกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจะใช้กราฟที่แสดงความชันของปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (amplification curve) ซึ่งประกอบด้วย 3 ระยะ ได้แก่ ระยะเริ่มแรก (initial log phase) ซึ่งเป็นระยะแรกของการดำเนินปฏิกิริยา มักตรวจไม่พบสัญญาณสารเรืองแสงใด ระยะที่สอง (exponential phase) เป็นระยะที่ความชันของกราฟจะเพิ่มขึ้นเป็นแบบเอกซ์โปเนนเทียล (exponential) ระยะสุดท้าย (plateau phase) เป็นระยะที่ความชันของกราฟถึงจุดสูงสุด และมีลักษณะเป็นเส้นตรง การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเปรียบเทียบกับกราฟของดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard curve) ที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอก่อนแล้ว

รูปแบบสัญญาณเรืองแสงที่ใช้ในการตรวจวัดผลิตผลพีซีอาร์ (PCR products) แบ่งได้เป็น 2 แบบกว้างๆ ได้แก่

1. ไซเบอร์ กรีน วัน (Syber Green One) เป็นสารเรืองแสงประเภทหนึ่งที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ จากนั้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร จะมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสงซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่องเรียลไทม์เทอร์โมไซเคลอร์ (real time thermocycler) การใช้สารเรืองแสงชนิดไซเบอร์กรีน วัน มีข้อด้อยคือ สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ทุกชนิด ซึ่งอาจขาดความจำเพาะต่อดีเอ็นเอสายคู่ที่ต้องการทดสอบ อย่างไรก็ดี สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณที่เกิดจากดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการศึกษากับสัญญาณที่เกิดจากดีเอ็นเอสายคู่ที่ไม่จำเพาะได้ ด้วยการตรวจสอบอุณหภูมิ ณ จุดที่คู่เบสของสายนิวคลิโอไทด์แยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมดซึ่งทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างรวดเร็ว เรียกว่า เมลติ้งเทมพีเรเจอร์ (melting temperature, Tm) ซึ่งมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอในแต่ละสาย

2. การใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์โพรบ (probe) ที่จำเพาะต่อส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง มีหลายเทคนิคด้วยกัน ที่นิยมใช้ในทางปริทันตวิทยา ได้แก่ แทคแมน พีซีอาร์ (TaqMan PCR) ซึ่งมีหลักการคือ ใช้แทคแมน โพรบ (TaqMan probe) ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลิโอไทด์สายสั้นๆ ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อที่ต้องการศึกษา นำมาทำการปิดฉลากสารเรืองแสงที่ตำแหน่งปลาย 5' ส่วนตำแหน่งปลาย 3' จะถูกปิดฉลากด้วยตัวยับยั้งสัญญาณสารเรืองแสง (quencher) เมื่อแทคแมน โพรบได้จับกับตำแหน่งดีเอ็น

เอเป้าหมายที่เป็นคู่สมกันแล้วขณะที่มีการดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในแต่ละรอบนั้น เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) ซึ่งทำหน้าที่สร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่จากไพรเมอร์ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาจะทำการสร้างสายดีเอ็นเอมาจนถึงตำแหน่งที่แทคแมนโพรบจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส จะย่อยสลายแทคแมน โพรบในส่วนปลาย 5' ก่อน ทำให้ส่วนของสัญญาณสารเรืองแสงหลุดออกสายนิวคลิโอไทด์รวมทั้งหลุดออกจากตัวยับยั้งสัญญาณ จึงสามารถส่งสัญญาณแสงออกมาได้ เทคนิคนี้มีข้อดีคือสัญญาณสารเรืองแสงที่ปรากฏขึ้นมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย และช่วยลดโอกาสการแปลผลผิด (false positive) ได้

การศึกษาทางจุลชีววิทยาเกี่ยวกับแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ในปัจจุบัน นิยมใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์อย่างกว้างขวาง ทั้งการตรวจหาความแตกต่างของแบคทีเรียที่เป็นส่วนประกอบของไบโอฟิล์ม (biofilm) เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ[36] การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์[37] การตรวจหาแบคทีเรียในระดับสายพันธุ์[38] หรือตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียภายหลังการรักษา[39] เป็นต้น

ในปัจจุบัน วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์ เป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียในทางปริทันตวิทยามากขึ้น เนื่องจากเป็นระบบปิดสามารถป้องกันการปนเปื้อนซึ่งเป็นปัญหาหลักของวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพื้นฐาน นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยาและได้ผลครั้งละเป็นจำนวนมาก (high throughput) ใช้เวลาน้อย แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านของต้นทุนของเครื่องมือที่มีราคาสูง และสามารถตรวจวัดได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้วเท่านั้น

เทอร์มินัล เรสทริคชั่น แฟรกเมนท์ เลงค์ โพลีมอร์ฟิสซึ่ม อะนาลิสิส (Terminal restriction fragment length polymorphism analysis, T-RFLP)

วิธีการนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่ตำแหน่ง 16 เอสอาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA) โดยคู่ของไพรเมอร์ที่ใช้นั้น จะมีหนึ่งสายที่ถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่ตำแหน่ง 5' โดยเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว ผลิตผลพีซีอาร์จะถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งจะทำการตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้นๆ โดยแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีตำแหน่งของการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอต่างกัน จากนั้นนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แล้วด้านปลายที่มีสารเรืองแสงติดฉลากอยู่มาเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดความยาวของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัด แล้วจึงนำไปเทียบกับข้อมูลของแบคทีเรียที่ทราบชนิดบนฐานข้อมูลมาตรฐานต่อไป

วิธีการนี้ถูกนำมาใช้ตรวจหาการกระจายของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก[40] และจากน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[40, 41]

ฮิวแมน ออรัล ไมโครบ ไอเดนติฟิเคชั่น ไมโครอะเรย์ (Human Oral Microbe Identification Microarray, HOMIM)

วิธีการนี้ใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์ โพรบ ที่ตำแหน่ง 16 เอสอาร์อาร์เอ็นเอมายึดกับสไลด์แก้วที่ถูกฉาบไว้ด้วยอัลดีไฮด์ ด้วยพันธะไอไมด์ (imide links) ตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบจะถูกนำไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพร้อมกับการติดฉลากด้วยสีย้อมเรืองแสงก่อน (fluorescent dye) จากนั้นเมื่อนำตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วมาจับกับโพรบที่จำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียที่ถูกยึดไว้บนสไลด์แก้วซึ่งจะปรากฏการเรืองแสงขึ้น สามารถตรวจวัดได้โดยเครื่องไมโครอะเรย์ เลเซอร์ สแกนเนอร์ (microarray laser scanner)[42]ในปัจจุบัน วิธีการนี้สามารถตรวจหาแบคทีเรียได้มากถึง 300 สปีชี่ส์ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และเพาะเลี้ยงไม่ได้[43]

การคัดลอกยีนและการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนในตำแหน่ง 16 เอสอาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene cloning and sequencing)

จากวิธีการตรวจหาแบคทีเรียที่ผ่านมา พบว่ายังมีข้อจำกัดสำคัญคือไม่สามารถตรวจหาแบคทีเรียได้ครอบคลุมทุกชนิด จึงได้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น วิธีการที่กำลังได้รับความสนใจนำมาประยุกต์ในการตรวจหาแบคทีเรียในช่องปาก คือ การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing)[44,45] วิธีการนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ที่ตำแหน่งยีน 16 เอสอาร์อาร์เอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากนั้นนำผลิตผลพีซีอาร์ไปเพิ่มปริมาณยีนให้เหมือนกับยีนต้นแบบ (clone) ในเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) และทำการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated sequencer) แล้วจึงนำไปเทียบกับรหัสพันธุกรรมของแบคทีเรียที่ทราบชนิดบนฐานข้อมูลมาตรฐาน วิธีการนี้มีข้อได้เปรียบคือสามารถตรวจพบแบคทีเรียบางสปีชี่ส์ซึ่งไม่เคยตรวจพบมาก่อนจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาระบบนิเวศน์ของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ และจากข้อมูลที่ได้จนถึงปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียที่พบในช่องปากนั้นอาจมีได้มากกว่า 700 สปีชี่ส์[46-49]

ในปัจจุบัน เครื่องมือหาลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้นได้ถูกพัฒนามาเป็นลำดับ โดยระบบล่าสุดที่กำลังได้รับการพัฒนาอยู่นั้น มีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้[50] ซึ่งคาดว่าในอนาคตจะมีการนำวิธีการนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียในช่องปากต่อไป

บทสรุป

วิธีการในการตรวจหาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบนั้น ได้รับการพัฒนามาเป็นลำดับ ซึ่งในปัจจุบันความพยายามในการคิดหาวิธีการในการตรวจหาแบคทีเรียยังคงมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของแบคทีเรียกับโรคปริทันต์อักเสบชัดเจนมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997; 14: 9-11.
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134-44.
3. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol* 1990; 61(9): 579-84.
4. Shaddox LM, Andia DC, Casati MZ, et al. Microbiologic changes following administration of locally delivered doxycycline in smokers: a 15-month follow-up. *J Periodontol* 2007; 78(11): 2143-9.
5. Serrano C, Torres N, Bejarano A, Cavie M, Castellanos ME. Clinical and microbiological comparison of three non-surgical protocols for the initial treatment of chronic periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2011; 13(1): 17-26.
6. Zambon JJ. Principles of evaluation of the diagnostic value of subgingival bacteria. *Ann Periodontol* 1997; 2(1): 138-48.
7. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol 2000* 1995; 7: 69-82.
8. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004; 31(12): 1034-47.
9. D'Ercole S, Catamo G, Tripodi D, Piccolomini R. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of perio-

dontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *New Microbiol* 2008; 31(3): 383-91.

10. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in subingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004; 31(12): 1061-9.
11. Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 1977; 85(2): 114-21.
12. Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for Actinobacillus actinomycetemcomitans and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1981; 52 (10): 593-8.
13. Claesson R, Lagervall M, Hoglund-Aberg C, Johansson A, Haubek D. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of Aggregatibacter actinomycetemcomitans in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol* 2010; 38(2): 115-21.
14. Ardila CM, Granada MI, Guzman IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2010; 45(4): 557-63.
15. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75(8): 1077-83.
16. Kamiya I, Okuda K, Hara K. Flow-cytometric identification and detection of Porphyromonas gingivalis by a LPS specific monoclonal antibody. *J Periodontol* 1994; 65(4): 309-15.
17. Di Murro C, Paolantonio M, Pedrazzoli V, Lopatin DE, Cattabriga M. Occurrence of Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, and Treponema denticola in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J Periodontol* 1997; 68(1): 18-23.
18. Wolff LF, Anderson L, Sandberg GP, Aeppli DM, Shelburne CE. Fluorescence immunoassay for detecting periodontal bacterial pathogens in plaque. *J Clin Microbiol*1991; 29(8): 1645-51.
19. Nisengard RJ, Mikulski L, McDuffie D, Bronson P. Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J Periodontol* 1992; 63(7): 611-7.
20. Suda R, Kobayashi M, Nanba R, Iwamaru M, Hayashi Y, Lai CH, et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J Periodontol* 2004; 75(8): 1084-9.
21. Timmerman MF, Van der Weijden GA, Armand S, Abbas F, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Clinical and microbiological baseline data. *J Clin Periodontol* 1998; 25(3): 215-24.
22. Wong MY, Lu CL, Liu CM, Hou LT. Microbiological response of localized sites with recurrent periodontitis in maintenance patients treated with tetracycline fibers. *J Periodontol* 1999; 70(8): 861-8.
23. D'Ercole S, Catamo G, Piccolomini R. Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests. *Crit Rev Microbiol* 2008; 34(1): 33-41.
24. Grisi MF, Novaes AB, Ito IY, Salvador SL. Relationship between clinical probing depth and reactivity to the BANA test of samples of subgingival microbiota from patients with periodontitis. *Braz Dent J* 1998; 9(2): 77-84.

25. Loesche WJ, Giordano J, Hujoel PP. The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (Treponema denticola) in periodontal disease. *J Dent Res* 1990; 69(10): 1696-702.
26. Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, et al. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1551-9.
27. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17(4): 788-92.
28. Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997; 68(7): 651-66.
29. Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37(4): 353-65.
30. Torrungruang K, Bandhaya P, Likittanasombat K, Grittayaphong C. Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. *J Periodontol* 2009; 80(1): 122-9.
31. Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(1): 28-33.
32. Yamamoto M, Nishihara T, Koseki T, He T, Yamato K, Zhang YJ, et al. Prevalence of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes in Japanese patients with periodontitis. *J Periodontal Res* 1997; 32(8): 676-81.
33. Tan KS, Song KP, Ong G. Cytolethal distending toxin of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res* 2002; 37(4): 268-72.
34. Tan KS, Song KP, Ong G. Bacteroides forsythus prtH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res* 2001; 36(6): 398-403.
35. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP. Distribution of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(4): 224-9.
36. Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res* 2010; 45(3): 389-95.
37. Braga RR, Carvalho MA, Bruna-Romero O, et al. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe* 2010; 16(3): 234-9.
38. Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, et al. Quantification of Porphyromonas gingivalis and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36(6): 482-7.
39. Ribeiro Edel P, Bittencourt S, Zanin IC, et al. Full-mouth ultrasonic debridement associated with amoxicillin and metronidazole in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80(8): 1254-64.
40. Fullmer SC, Preshaw PM, Heasman PA,

Kumar PS. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res* 2009; 88(6): 524-8.

41. Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 6): 563-71.
42. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006; 42: 80-7.
43. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009; 80(9): 1421-32.
44. Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* 2009; 79(3): 266-71.
45. Xie G, Chain PS, Lo CC, Liu KL, Gans J, Merritt J, et al. Community and gene composition of a human dental plaque microbiota obtained by metagenomic sequencing. *Mol Oral Microbiol* 2010; 25(6): 391-405.
46. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183(12): 3770-83.
47. de Lillo A, Booth V, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. Culture-independent identification of periodontitis-associated Porphyromonas and Tannerella populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5523-7.
48. de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, et al. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21(1): 61-8.
49. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 3944-55.
50. Branton D, Deamer DW, Marziali A, Bayley H, Benner SA, Butler T, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26(10): 1146-53.