บทวิทยาการ
Original Article

การตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำจากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์

Detection of Black-Pigmented Bacteria in Pus of Acute Endodontic Infection by Multiplex Polymerase Chain Reaction

ประกายมุกด์ สาหร่ายทอง[1], เกษรา ปัทมพันธุ์[2]
[1]ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์, [2]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Prakaimuk Saraithong[1], Kassara Pattamapun[2]
[1]Dental Research Center, [2]Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม.ทันตสาร 2550; 28(1-2) : 65-74
CM Dent J 2007; 28(1-2) : 65-74

บทคัดย่อ

การศึกษานำร่องนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ในหนองที่เก็บจากคลองรากฟันจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยลำดับแรกใช้วิธีพีซีอาร์ ตรวจโดยใช้คู่ไพรเมอร์หนึ่งคู่ที่จำเพาะต่อส่วนยีน 16 เอส ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของแบคทีเรียในทุกตัวอย่าง ต่อมาใช้วิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ที่มีการออกแบบคู่ไพรเมอร์ในการตรวจหาสารพันธุกรรมแบคทีเรียที่ต่างกันทีละสองสายพันธุ์พร้อมกัน ได้แก่ การตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส คู่กับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และการตรวจหาเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ใน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) แต่ตรวจพบเชื้อสามสายพันธุ์ร้อยละ 40 ตรวจ

Abstract

The aim of this pilot study was to determine whether a multiplex polymerase chain reaction (PCR) protocol could detect DNA from four different pathogenic bacteria, including *Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens* in 10 pus exudate samples from root canals. The conventional PCR together with a pair of universal primers that was specific for 16s ribosomal RNA was initially conducted to show the presence of any bacterial DNA in all specimens. Then, the primers for multiplex PCR were specifically designed to amplify the DNA of two different bacterial species at a time, i.e. *Porphyromonas endodontalis and Porphyromonas gingivalis versus Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. The results showed that two of the specimens (20%) failed to show the presence of DNA in any of the four bacteria. The percentage of sample where bacterial DNA was detected for three, two or

พบเชื้อสองสายพันธุ์ร้อยละ 10 และตรวจพบเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวร้อยละ 30 นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อที่พบได้บ่อยคือ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส รองลงมาคือ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (ร้อยละ 70, 40, 40, และ 20 ตามลำดับ) โดยสรุปจากการศึกษาในเบื้องต้นนี้แสดงว่าวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างในคลองรากฟันได้ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นเพื่อสนับสนุนผลการศึกษาครั้งนี้อย่างชัดเจน

คำไขรหัส: ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสที่มีไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งคู่ แบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำ

one species was 40, 10 or 30%, respectively. Moreover, the presence of DNA was detected in *Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis, Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* by 70, 40, 40 and 20% of the sample, respectively. In summary, the present pilot study shows the effectiveness of multiplex PCR for detecting distinct bacterial DNA in endodontic specimens. However, additional studies with a larger number of samples are still required to corroborate these findings.

Key words: multiplex polymerase chain reaction, black-pigmented bacteria

บทนำ

จากการศึกษาที่ผ่านๆ มาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำ (black-pigmented bacteria) มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อภายในคลองรากฟันโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infections)[1-3] โดยเชื้อในกลุ่มนี้ที่พบบ่อยได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส (*Porphyromonas endodontalis*) เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ (*Prevotella nigrescens*) เนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างปัจจัยความรุนแรง (virulence factors) ได้หลายชนิด[4,5] คุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่มนี้คือ ลักษณะโคโลนี (colony) ของเชื้อกลมนูน ขอบเรียบ มันวาวและมีสีดำ ลักษณะเซลล์รี ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ไม่สร้างสปอร์ เจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน (strictly anaerobe) ดังนั้นจึงต้องควรระวังการสัมผัสกับออกซิเจน ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง การนำส่งห้องปฏิบัติการ รวมถึงขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในปัจจุบันวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยเชื้อจากสิ่งส่งตรวจคือวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการและการจำแนกเชื้อโดยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) แต่เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้มีรูปร่างที่คล้ายกันและการทดสอบทางชีวเคมีไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อออกจากกันได้อย่างชัดเจน นอกจากนั้นแล้วเชื้อในกลุ่มนี้ยังต้องการอาหารเสริมชนิดพิเศษเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตได้แก่ สารที่มีส่วนประกอบของเหล็กคือ ฮีมิน (hemin) และวิตามินเค (menadione) และใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานกว่าเชื้อกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria)

จากปัญหาดังกล่าว วิธีทางอณูชีววิทยาจึงได้เข้ามามีบทบาทในการตรวจวินิจฉัยเชื้อภายในช่องปาก โดยมีหลักการในการตรวจสารพันธุกรรมเป้าหมาย (target gene) ซึ่งในการตรวจหาเชื้อชนิดต่างๆ มักใช้ยีน (gene) ที่มีหน้าที่กำหนดการสร้างยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16s rRNA gene) ซึ่งเป็นยีนที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยในกลุ่มแบคทีเรียจะมีส่วนที่เรียกว่า บริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ซึ่งมีความคล้ายกันมากไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ใดและจะมีส่วนที่มีความแตกต่างกันมาก (variable regions) ซึ่งมีความจำเพาะและเป็นตัวกำหนดความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นความแตกต่างของยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ในส่วนที่มีความแตก

ต่างกันมากนี้จึงถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ วิธีที่นิยมใช้คือวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสแบบพื้นฐานหรือพีซีอาร์ (conventional polymerase chain reaction; PCR) วิธีนี้เป็นการเพิ่มชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ต้องการโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primers) ต่อส่วนที่มีความแตกต่างกันมากของเชื้อที่ต้องการตรวจหา ถ้ามีสารพันธุกรรมของเชื้อที่ต้องการตรวจในตัวอย่าง คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะจะเข้าไปจับที่ส่วนที่มีความแตกต่างกันของเชื้อและทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ต้องการให้มีปริมาณมากขึ้น (PCR products) และสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องการโดยวิธีการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า (gel electrophoresis) ข้อดีของวิธีพีซีอาร์ คือมีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจวินิจฉัยเชื้อได้ถึงระดับสายพันธุ์ (species) ทั้งยังสะดวก รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม[6,7] ทำให้ทราบผลเร็ว นำไปสู่การวางแผนการรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็วขึ้น

แต่เนื่องการติดเชื้อภายในคลองรากฟันเป็นการติดเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ดังนั้นในการใช้วิธีพีซีอาร์คือการจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อทีละสายพันธุ์มาตรวจวินิจฉัย ทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลือง ต่อมาจึงมีการพัฒนาวิธีการจำแนกเชื้อหลายสายพันธุ์พร้อมกันโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อหลายๆ เชื้อมาตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์พร้อมกันภายในครั้งเดียว เรียกว่าวิธี มัลติเพล็กโพลีมอเรสเซนรีแอคชัน หรือ มัลติเพล็กพีซีอาร์ (multiplex polymerase chain reaction; multiplex PCR) ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ประหยัดสารเคมีและเวลา ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการนำวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์มาใช้ตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำจากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน โดยลำดับแรกเป็นการตรวจหาแบคทีเรียจากตัวอย่างโดยใช้คู่ไพรเมอร์หนึ่งคู่ที่จำเพาะต่อยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรียทุกชนิดด้วยวิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐาน ลำดับที่สองเป็นการตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส คู่กับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และตรวจหาเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ โดยใช้วิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ซึ่งมีความไว (sensitivity) ในการตรวจจำแนกเชื้อในแต่ละคู่นี้อยู่ที่ 100 พิโคกรัม (picogram; pg) และ 10 พิโคกรัมตามลำดับ และทุกวิธีมีความจำเพาะ (specificity) สูงเนื่องจากได้มีการทดสอบกับเชื้อชนิดอื่นๆ ให้ผลลบคือไม่พบปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อชนิดอื่น[8]

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างหนองจากคลองรากฟัน

หนองที่เก็บจากคลองรากฟันจำนวน 10 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ ได้มาจากตัวอย่างที่เก็บไว้ยังคลังจุลชีพของศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งได้มาจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาคลองรากฟันและมีวิธีการเก็บตัวอย่างดังนี้

1.1. การคัดเลือกประชากรศึกษา[9,10]

คัดเลือกผู้ป่วยจำนวน 10 ราย ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าฟันตายและพบการคั่งของหนองในบริเวณเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน (pulp necrosis with acute apical abscess) ผู้ป่วยเข้ามารับการรักษาคลองรากฟันที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยดังนี้คือ เป็นผู้ที่มีอาการปวดฟัน มีการบวมของเนื้อเยื่อในตำแหน่งที่ตรงกับรากฟันซี่ที่ปวด ฟันซี่ดังกล่าวไม่ตอบสนองต่อการทดสอบความมีชีวิตของฟัน มีเงาดำปรากฏบริเวณปลายรากฟันจากการด้วยภาพรังสีแบบขนาน (parallel technique) มีอาการปวดมาก เมื่อถูกเคาะที่ซี่ฟันและผู้ป่วยไม่ได้รับยาปฏิชีวนะใดๆ ก่อนหน้าการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน

1.2. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหนองจากคลองรากฟันซี่ที่เป็นสาเหตุของอาการปวดและบวมภายใต้สภาวะที่สะอาด (aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจากแหล่งอื่นที่ไม่ใช่หนองของฟันซี่ที่เป็นสาเหตุ ทำความสะอาดผิวฟันโดยการขัดด้วยผงขัดฟัน (pumice) และบ้วนปากด้วยน้ำยาคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 (0.12% chlorhexidine) ใส่แผ่นยางกันน้ำลายเพื่อแยกฟันที่ต้องการเก็บตัวอย่างออกจากบริเวณอื่นของช่องปาก เช็ดทำความสะอาดตัวฟันและแผ่นยางกันน้ำลายด้วยสำลี

ชุบน้ำยาไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 (30% hydrogen peroxide) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (2.5% sodium hypochoride) ใช้หัวกรอฟันที่ปราศจากเชื้อชนิดกรอเร็ว (airotor) ร่วมกับการใช้น้ำกำจัดรอยผุในส่วนเคลือบฟัน (enamel) หรือวัสดุบูรณะเดิมที่เสื่อมสภาพ จากนั้นใช้หัวกรอฟันชนิดกรอช้า (micromotor) กรอแบบไม่ใช้น้ำกำจัดเนื้อฟัน (dentin) ส่วนที่ผุและไม่แข็งแรงออกจนพบรอยทะลุสู่โพรงฟัน (pulp cavity) กำจัดส่วนของหลังคาโพรงฟัน (pulpal roof) เพื่อเปิดทางระบายของหนองบนตัวฟัน รอจนกระทั่งหนองหยุดไหล จึงใส่กระดาษซับที่สะอาดปราศจากเชื้อ (sterile paper point, Maillefer, Bellaigues, Switzerland) ลงในคลองรากฟัน ทิ้งไว้นาน 1 นาที เพื่อเก็บตัวอย่างหนองตั้งแต่ส่วนตัวฟันไปจนถึงกึ่งกลางรากฟัน นำกระดาษซับใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่มีรีดิวซ์ทราสปอร์ตฟลูอิดหรืออาร์ทีเอฟ (reduced transport fluid; RTF) ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ต่อไป ในกรณีที่เปิดทางระบายหนองที่ตัวฟันแล้วไม่พบการไหลออกของหนองแต่พบมีการบวมของหนองบริเวณเหงือก โดยเหงือกในตำแหน่งที่บวมมีลักษณะกดนิ่ม ใช้สำลีขนาดเล็กชุบน้ำยาฆ่าเชื้อสารละลายทาลบอตส์ (talbot's solution) เช็ดโดยรอบ แล้วใช้ใบมีดหมายเลข 11 กรีดที่ตำแหน่งกลางตุ่มหนองเพื่อระบายหนอง ใช้กระดาษซับหนองตรงรอยเปิดที่ระบายหนองทางเหงือกทิ้งไว้นาน 1 นาที นำกระดาษที่ซับหนองใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่มีอาร์ทีเอฟ ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้วิเคราะห์ต่อไป

2. การสกัดสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงและจากตัวอย่าง

สกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, Hilden, Germany) มีวิธีการดังนี้ ปั่นเหวี่ยงตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เติมสารละลายเอทีแอล (ATL) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนเซลล์หลังจากนั้น เติมเอนไซม์โปรตีเนสเค (proteinase K) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำทำความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายเอแอล (AL) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำทำความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายทั้งหมดเติมลงในหลอดคอลัมน์บรรจุสารที่เคลือบด้วยประจุบวกเพื่อดักจับสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายส่วนใสตกลงด้านล่าง ทิ้งสารละลายส่วนใสด้านล่าง จากนั้นเติมสารละลายเอดับบลิว 1 (AW1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลายเอดับบลิว 2 (AW2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทั้งสองขั้นตอนนี้เป็นการล้างส่วนที่ไม่ต้องการออกจากคอลัมน์แต่สารพันธุกรรมยังคงอยู่ แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 ต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง สุดท้ายเติมสารละลายอีบี (EB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารพันธุกรรมเป็นอิสระจากสารตัวกลางออกมาอยู่ในสารละลาย เก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. วิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐาน ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียทุกสายพันธุ์[11]

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากหนองผู้ป่วย ปริมาตร 2 ไมโครลิตรมาเพิ่มจำนวนยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ในส่วนที่มีความคล้ายกันมากไม่ว่าจะเป็นเชื้อชนิดใด โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจับส่วนนี้ของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ปฏิกิริยาเกิดในสารละลายปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตรในหลอดทดลองที่มีผนังบาง (thin-walled tube) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ดังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 1 ในสารละลายนี้ยังประกอบด้วยสารเคมีอื่นดังนี้ สารละลาย 2 เอ็กซ์พีซีอาร์ มาสเตอร์มิกซ์ (2X PCR master mix, Fermentas, Vilnius, Lithuania) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตรที่มีส่วนผสมของ

เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) ความเข้มข้น 0.05 หน่วยต่อไมโครลิตร สารละลายแมกนีซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์และสารผสมของดีออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟสทั้ง 4 ชนิด (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) โดยแต่ละสารผสมมีความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์และน้ำกลั่น โดยมีสารพันธุกรรมของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์อ้างอิง (ATCC 33277) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ส่วนตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ประกอบด้วยสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาและน้ำ หลังจากนั้นนำหลอดทดลองเข้าเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (Master- cycler Gradient, Eppendorf™, Hamburg, Germany) โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาทีต่อจากนั้นโดยใช้อุณหภูมิต่างๆ กัน 3 อุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที ใช้จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม 35 รอบ หลังจากนั้นแช่สารละลายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

4. วิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส คู่กับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และการตรวจหาเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากหนองผู้ป่วยที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันปริมาตร 5 ไมโครลิตรมาเพิ่มจำนวนยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ในบริเวณที่มีความแตกต่างกันมากในแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์ที่ต้องการตรวจหา โดยตรวจวินิจฉัยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส คู่กับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และการตรวจหาเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ใช้คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจับส่วนที่จำเพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ต้องการปฏิกิริยาเกิดในสารละลายปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มีผนังบาง โดยใช้ความเข้มข้นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส อย่างละ 20 ไมโครโมลาร์ ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ ดังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 1 ในสารละลายนี้ยังประกอบด้วยสารเคมีอื่นๆ ดังนี้ สารละลาย 2 เอ็กซ์ ไควเจน มัลติเพล็กพีซีอาร์ มาสเตอร์มิกซ์ (2X QIAGEN multiplex PCR master mix, QIAGEN, Hilden, Germany) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตรที่มีส่วนผสมของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์และสารผสมของดีออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟสทั้ง 4 ชนิดและน้ำกลั่น โดยมีตัวควบคุมเชิงบวกสำหรับวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส คู่กับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส คือสารพันธุกรรมของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์อ้างอิง (ATCC 35406 และ ATCC 33277 ตามลำดับ) ส่วนวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ใช้เชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (ATCC 25611) และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นตัวควบคุมเชิงบวกตามลำดับ ส่วนตัวควบคุมเชิงลบ ประกอบด้วยสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาและน้ำ หลังจากนั้นนำหลอดทดลองเข้าเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ วิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์คู่แรกเริ่มใช้ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นใช้อุณหภูมิต่างๆ กัน 3 อุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 นาที ใช้จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม 35 รอบหลังจากนั้นแช่สารละลายที่อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ส่วนวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์คู่ที่สองเริ่มใช้ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นใช้อุณหภูมิต่างๆ กัน 3 อุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ใช้จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม 36 รอบ หลังจากนั้นแช่สารละลายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลิโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์[2,15]

Table 1 Nucleotide primers[2,15]

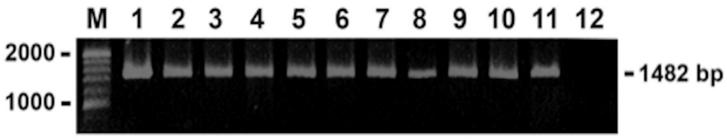
Bacteria	Nucleotide primers (nucleotide positions) (Forward and Reverse, 5´-3´)	PCR product size (bp)
Universal bacteria	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (10-29) ACGGCTACCTTGTTACGACTT (1472-1492)	1,482
P. endodontalis	CTATATTCTTCTTTCTCCGCATGGAGGAG G (182-211) GCATACCTTCGGTCTCCTCTAGCATAT (649-675)	494
P. gingivalis	AGGCAGCTTGCCATACTGCG (729-748) ACTGTTAGCAACTACCGATGT (1112-1132)	404
P. intermedia	CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA (209-233) CCGCTTTACTCCCCAACAAA (448-467)	259
P. nigrescens	GTGTTTCATTGACGGCATCCGATATGAA AC (186-215) CCACGTCTCTGTGGGCTGCGA (992-1013)	828

5. การตรวจลักษณะสารพันธุกรรมด้วยการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ข้างต้นปริมาตร 5 ไมโครลิตรมาตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยใช้วิธีการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าแบบแนวนอน (Mupid-ex, Optima, Japan) และใช้สารละลายกรดทริสบอริก อีดีทีเอหรือทีบีอี (tris boric acid EDTA; TBE) เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ (volt) เป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้นย้อมให้เห็นแถบสารพันธุกรรมด้วยสารเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) และบันทึกภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UVP, Cambridge, England)

ผลการศึกษา

จากการตรวจวินิจฉัยหาแบคทีเรียทุกสายพันธุ์จากตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐานโดยการใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ พบว่าตัวควบคุมเชิงบวกปรากฏแถบสารพันธุกรรมขนาด 1,482 คู่เบส ในขณะที่ตัวควบคุมเชิงลบไม่พบชิ้นส่วนของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของแบคทีเรียปนเปื้อนในสารเคมีที่นำมาใช้ และตรวจพบแบคทีเรียในทุกตัวอย่างที่เก็บมาจากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 *การตรวจหาแบคทีเรียทุกสายพันธุ์โดยวิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐานจากตัวอย่างหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน*

แถว M *แถบสารพันธุกรรมที่ทราบขนาด*

แถว 1 *กลุ่มควบคุมบวกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 33277*

แถว 2-11 *ตัวอย่างหมายเลข 1-10*

แถว 12 *กลุ่มควบคุมลบ*

Figure 1 *Detection of all bacteria species by conventional PCR from pus of acute endodontic infection*

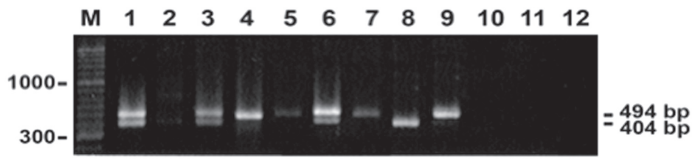
Lane M *Standard marker*

Lane 1 *Positive control of Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*

Lane 2-11 *Clinical sample 1-10*

Lane 12 *Negative control*

ผลการทดสอบด้วยวิธีวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส คู่กับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะต่อยีน 16 เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ตัวควบคุมเชิงบวกพบแถบสารพันธุกรรมอยู่ 2 ขนาด คือ แถบสารพันธุกรรมของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 35406 ขนาด 494 คู่เบส และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 33277 ขนาด 404 คู่เบส ส่วนตัวควบคุมเชิงลบไม่พบแถบสารพันธุกรรม โดยผลจากการตรวจเชื้อจากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน สามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส ในผู้ป่วย 7 ใน 10 ราย (ร้อยละ 70) ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 และสามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในผู้ป่วย 4 ใน 10 ราย (ร้อยละ 40) คือ ตัวอย่างที่ 1, 2, 5 และ 7 และตรวจไม่พบเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในตัวอย่างที่ 9 และ10 (ร้อยละ 20) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 *การตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ จากตัวอย่างหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน*

แถว M *แถบสารพันธุกรรมที่ทราบขนาด*

แถว 1 *กลุ่มควบคุมบวกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 35406 และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 33277*

แถว 2-11 *ตัวอย่างหมายเลข 1-10*

แถว 12 *กลุ่มควบคุมลบ*

Figure 2 *Detection of Porphyromonas endodontalis and Porphyromonas gingivalis by multiplex PCR from pus of acute endodontic infection*

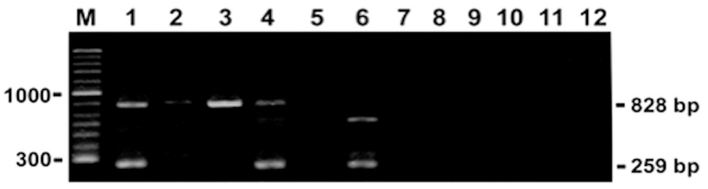
Lane M *Standard marker*

Lane 1 *Positive control of Porphyromonas endodontalis ATCC 35406 and Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*

Lane 2-11 *Clinical sample 1-10*

Lane 12 *Negative control*

ส่วนผลการทดสอบด้วยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ พบว่าสำหรับตัวควบคุมเชิงบวก พบแถบสารพันธุกรรมอยู่ 2 ขนาด คือพบแถบสารพันธุกรรมของเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 25611 ขนาด 259 คู่เบส และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย พบแถบสารพันธุกรรมขนาด 828 คู่เบส ส่วนตัวควบคุมเชิงลบไม่พบแถบสารพันธุกรรม โดยผลจากการตรวจเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน สามารถตรวจพบเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ในผู้ป่วย 2 ใน 10 ราย (ร้อยละ 20) คือตัวอย่างที่ 3 และ 5 และสามารถตรวจพบเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ จากผู้ป่วย 4 ใน 10 ราย (ร้อยละ 40) คือตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 และตรวจไม่พบเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในตัวอย่างที่ 6 ถึง 10 (ร้อยละ 50) นอกจากขนาดแถบสารพันธุกรรมของเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วยังพบแถบสารพันธุกรรมที่ขนาดอื่นๆ (non specific band) ปรากฏในการทดสอบหาเชื้อทั้งสองชนิดจากสารพันธุกรรมที่แยกได้จากผู้ป่วยอีกด้วย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 *การตรวจหาเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ โดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ จากตัวอย่างหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลัน*

แถว M *แถบสารพันธุกรรมที่ทราบขนาด*

แถว 1 *กลุ่มควบคุมบวกของเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย สายพันธุ์อ้างอิง ATCC 25611 และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย*

แถว 2-11 *ตัวอย่างหมายเลข 1-10*

แถว 12 *กลุ่มควบคุมลบ*

Figure 3 *Detection of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens by multiplex PCR from pus of acute endodontic infection*

Lane M *Standard marker*

Lane 1 *Positive control of Prevotella intermedia ATCC 25611 and Prevotella nigrescens clinical stain*

Lane 2-11 *Clinical sample 1-10*

Lane 12 *Negative control*

จากการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำจากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันทั้ง 4 ชนิดพบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ถึง 8 ใน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) โดย เชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือเชื้อพรีโวเทลลา เอ็นโดดอนตัลลิส (ร้อยละ 70) รองลงมาคือเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย โดยพบได้ร้อยละ 40, 40 และ 20 ตามลำดับ โดย

ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 5 (ร้อยละ 40) ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ 2 สายพันธุ์ได้แก่ ตัวอย่างที่ 4 ร้อยละ 10 และตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวได้แก่ตัวอย่างที่ 6, 7 และ 8 (ร้อยละ 30) ส่วนตัวอย่างที่ 9 และ 10 (ร้อยละ 20) ตรวจไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มสร้างเม็ดสีดำ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 *การตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำจากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันโดยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์*

Table 2 *Detection of black-pigmented bacteria in pus of acute endodontic infection by multiplex PCR*

Sample	PCR product of all bacteria species	PCR products of black-pigmented bacteria			
		P. e	*P. g*	*P. i*	*P. n*
1	+	+	+	-	+
2	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	-	+
5	+	+	+	+	-
6	+	+	-	-	-
7	+	-	+	-	-
8	+	+	-	-	-
9	+	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-

P. e = Porphyromonas endodontalis, P. g = Porphyromonas gingivalis, P. i = Prevotella intermedia, P. n = Prevotella nigrescens

บทวิจารณ์

การศึกษานี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำ 4 สายพันธุ์จากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียจากตัวอย่างใช้คู่ไพรเมอร์หนึ่งคู่ที่จำเพาะต่อยีน 16 เอสอาร์อาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรียทุกด้วยสายพันธุ์วิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐาน สามารถตรวจพบแบคทีเรียในทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับโรคที่มีสาเหตุหลักคือการติดเชื้อแบคทีเรียและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการอักเสบ โดยมีรายงานการพบแบคทีเรียในกลุ่มสร้างเม็ดสีดำได้บ่อยและคาดว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคอย่างรุนแรง[3,12] นอกจากนั้นยังมีรายงานการพบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ร่วมกับเชื้อกลุ่มอื่นอีกได้แก่ เชื้อกลุ่มสไปโรชีตส์ (spirochetes)[13] หรือเชื้อฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีอาตัม (*Fusobacterium nucleatum*)[14] ซึ่งการติดเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อแบบหลายสายพันธุ์ร่วมกันและเชื้อแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างปัจจัยความรุนแรงส่งเสริมกันในการก่อโรค

จากผลการตรวจหาแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์จากการศึกษาครั้งนี้พบแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำสูงถึงร้อยละ 80 โดยพบเชื้อพรีโวเทลลา เอ็นโดดอนตัลลิส ได้บ่อยที่สุด รองลงมาคือเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sequeira และคณะ (2001) ซึ่งรายงานการตรวจวินิจฉัยหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันจำนวน 10 ตัวอย่างพบเชื้อกลุ่มนี้ ร้อยละ 59.3 โดยจำแนกเป็นเชื้อเชื้อพรีโวเทลลา เอ็นโดดอนตัลลิส ร้อยละ 42.6 เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาริ ร้อยละ 27.8 และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ร้อยละ 7.4 และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ร้อยละ 5.6[3] นอกจากนั้นยังมีการศึกษาของ Seol และคณะ (2006) สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่มนี้สูงถึงร้อยละ 65 ในหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันจำนวน 4 ตัวอย่างโดยจำแนกเป็นเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ร้อยละ 45 เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส เอ็นโดดอนตัลลิส ร้อยละ 35 เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ร้อยละ 22.5 และเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรสเซนซ์ ร้อยละ 17.5 โดยสามารถตรวจพบเชื้อครบทั้ง 4 สายพันธุ์ในหนองของผู้ป่วยหนึ่งรายในขณะที่บางรายตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าวเลย[8] ซึ่งสอดคล้องไปกับผลของการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าบางตัวอย่างพบเชื้อมากถึง 3 สายพันธุ์ และบางตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อสายพันธุ์ใดเลย ความแตกต่างที่พบนี้เกิดได้จากหลายสาเหตุคือ ความแตกต่างของวิธีการเก็บตัวอย่างและขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมที่ต่างกัน หรืออาจเป็นไปได้ว่าเชื้อมีความหลากหลายเนื่องจากสภาวะแวดล้อมและสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเชื้อในช่องปากที่ต่างกัน[15]

ความสำเร็จของวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัยโดยการศึกษาของ Henegariu และคณะ (1997) พบว่าอุณหภูมิที่เกิดการจับของคู่ไพรเมอร์กับสายสารพันธุกรรมเริ่มต้น (annealing temperature) ปริมาณความเข้มข้นของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม และการเพิ่มระยะเวลาการสังเคราะห์สายสารพันธุกรรม (extension time) ช่วยในการสร้างสายสารพันธุกรรมที่มีขนาดยาวได้ดีขึ้น[16] ส่วนการศึกษาของ Morot-Bizot และคณะ (2004) รายงานเพิ่มเติมว่าวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ในการใช้คู่ไพรเมอร์จำนวนมาก ต้องการความเข้มข้นสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม[17] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yoshida และคณะ (2005) ที่พบว่าจำนวนรอบที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ช่วยให้ได้ผลแถบสารพันธุกรรมที่ชัดเจน[18] งานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ประยุกต์ใช้การศึกษาของ Seol และคณะ (2006) ที่ได้ทำการทดสอบสภาวะเหมาะสมของวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์และทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของคู่ไพรเมอร์โดยวิธี BLAST (National Center for Biotechnology Information) โดยนำลำดับเบสของไพรเมอร์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในคลังเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank) และคู่ไพรเมอร์แต่ละคู่ถูกทดสอบโดยวิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐานกับสารพันธุกรรมของแบคทีเรียต่างๆ และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อชนิดอื่น แต่เมื่อนำการศึกษานี้มาประยุกต์ใช้พบว่านอกจากขนาดแถบสารพันธุกรรของเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วยังพบแถบสารพันธุกรรมที่ขนาดอื่น จากการตรวจด้วยวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย คู่กับเชื้อพรีโวเทลลา ไนเกรส-เซนซ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าคู่ไพรเมอร์สองคู่ที่จำเพาะต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถไปจับและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อชนิดอื่นภายในช่องปากได้อีกในสภาวะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ นอกเหนือจากเชื้อที่นำมาทดสอบหาความจำเพาะเมื่อถูกทดสอบที่สภาวะเดียวกันโดยแถบสารพันธุกรรมขนาดอื่น ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปหาลำดับเบสและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ทราบสายพันธุ์ได้ เพื่อเป็นการจำแนกสายพันธุ์เชื้อที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาในการทำพีซีอาร์นี้

บทสรุป

วิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์ สามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยสารพันธุกรรมแบคทีเรียกลุ่มสร้างเม็ดสีดำ 4 สายพันธุ์จากหนองของฟันที่มีการอักเสบติดเชื้อแบบเฉียบพลันซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ประหยัดสารเคมีและเวลาอันจะนำไปสู่การวางแผนการรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ อ.ทพญ.ดร.แสงอุษา เขมาลีลากุล อาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมบูรณะที่ให้คำแนะนำ และเอื้อเฟื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงและขอขอบคุณศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวกด้านครุภัณฑ์และสถานที่ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Dougherty WJ, Bae Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod* 1998; 24: 356-358.
2. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 1999; 25: 413-415.
3. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endo-dontic origin. *J Endod* 2001; 27: 563-566.
4. Seltzer S, Farber PA. Microbiology factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 634-645.
5. Siqueira JF Jr, Magalhaes FAC, Lima KC, Uzeda M. Pathogenicity of facultative and obligate anaerobic bacteria in monoculture and combined with either *Prevotalla intermedia or Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol immunol* 1998; 11: 368-372.
6. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infection: Part 2-redefining the endodntic microbiota. *J Endod* 2005; 31: 488-498.

7. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodont Res* 2005; 40: 277-285.
8. Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2006; 32: 110-114.
9. Gomes BPFA, Pinheir ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol immunol* 2004; 19: 71-76.
10. Walton RE. Interappointment flare-ups: incidence, related factors, prevention, and management. *Endod Topics* 2002; 3: 67-76.
11. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; 173: 697-703.
12. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 1992; 18: 558-561.
13. Van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented Bacteroides species in odonto-genic abscesses. *Infect immune* 1985; 3: 494-497.
14. Baumgartner JC, Falkler WA, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 253-256.
15. Baumgartner JC, Sequeira JF, Xia T, Rocus IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod* 2004; 30: 141-144.
16. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997; 23: 504-511.
17. Morot-Bizot S, Talon R, Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1087-1094.
18. Yoshida A, Tachibana M, Ansai T, Takehara T. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultanrous detection of black-pigmented *Prevotella* species in oral specimen. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 43-46.

ขอสำเนาบทความที่:

น.ส.ประกายมุกด์ สาหร่ายทอง นักวิจัยศูนย์วิจัยทางทันต-แพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50202

Reprint Request:

Miss. Prakaimuk Saraithong, Researcher, Dental Research Center, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Muang District, Chiang Mai 50202