การตรวจเชื้อ *Prevotella baroniae* อย่างรวดเร็วในคลองรากฟันที่ติดเชื้อ

Rapid Detection of *Prevotella baroniae* in Endodontic Infections

แสงอุษา เขมาลีลากุล[1], ประกายมุกด์ สาหร่ายทอง[2], เกษรา ปัทมพันธุ์[1]
[1]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันต์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]นศ.ระดับปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Saengusa Khemaleelakul[1], Prakaimuk Saraithong[2], Kassara Pattamapun[1]
[1]Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Chiang Mai University
[2]Ph.D.Student, Faculty of Sciences, Chiang Mai University

ชม. ทันตสาร 2558; 36(1) : 23-31
CM Dent J 2015; 36(1) : 23-31

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: *Prevotella baroniae* เป็นเชื้อแอนแอโรบส์ซึ่งเพิ่งมีการค้นพบและตั้งชื่อใหม่ การจำแนกเชื้อยังทำได้ยาก และต้องใช้เวลานาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและทดสอบไพรเมอร์จำเพาะที่สามารถนำไปใช้จำแนกเชื้อ *P. baroniae* ได้อย่างรวดเร็วด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อดังกล่าวในฟันที่ติดเชื้อของประชากรไทย

วิธีการ: ทำการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ แล้วทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์นี้ในการตรวจพบเชื้อ *P. baroniae* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากนั้นนำสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่มีคลองรากฟันติดเชื้อ 56 รายมาสกัดแยกดีเอ็นเอ แล้วใช้เป็นแม่พิมพ์เพื่อตรวจหาเชื้อ *P. baroniae* ในแต่ละสิ่งส่งตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าว

Abstract

Objectives: *Prevotella baroniae* is an anaerobic bacterium that has recently been discovered and named. Identification of this new species is still difficult and time-consuming. The aims of this study were to generate and test a pair of specific primers for rapid detection of *P. baroniae* by polymerase chain reaction (PCR) and to investigate the incidence of this new candidate endodontic pathogen in endodontic infections in Thai population.

Methods: A pair of *P. baroniae*-specific primers was developed. The specificity and sensitivity of the primers were tested in PCR. Genomic DNA was isolated from samples collected from 56 patients who had endodontic infections and then the

Corresponding Author:

แสงอุษา เขมาลีลากุล
อ.ทพญ.ดร. ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Saengusa Khemaleelakul
Lecturer, Dr., Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chaing Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.
E-mail: ***saengusa_K@yahoo.com***

คำนวณอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ *P. baroniae* ในสิ่งส่งตรวจ และวิเคราะห์ผลด้วย Chi-Square test

ผลการทดลอง: ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อ P. baroniae อย่างมาก โดยตรวจพบการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ที่มีขนาด 838 คู่เบสจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์เท่านั้น โดยปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* ที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 0.75 พิโคกรัม เมื่อศึกษาจากสิ่งส่งตรวจพบเชื้อ *P. baroniae* ในผู้ป่วยที่มีคลองรากฟันติดเชื้อ 12/56 ราย (21.43%) เป็นผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกแบบเฉียบพลัน 6/24 ราย (25.00%) และไม่มีอาการทางคลินิก 6/32 ราย (18.75%) ซึ่งอุบัติการณ์นี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป: ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบใหม่นี้มีประสิทธิภาพดีในการตรวจหาเชื้อ *P. baroniae* จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งจากการศึกษานี้ตรวจพบเชื้อ *P. baroniae* ได้ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อ โดยมีอุบัติการณ์ไม่แตกต่างกันในผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง

คำสำคัญ: *Prevotella baroniae* คลองรากฟันที่ติดเชื้อ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เชื้อแอนแอโรบส์

DNA was used as template in PCR. The presence of *P. baroniae* in the samples was investigated using the species-specific primers. The incidence of *P. baroniae* was then calculated and analyzed with Chi-Square test.

Results: *P. baroniae*-specific primers detected the target with no cross-reactivity. The specific fragment of approximately 848-bp was amplified only when the DNA of *P. baroniae* was used as template in the PCR reactions. Sensitivity testing showed that the estimated detection limit for the primers was 0.75 picogram of *P. baroniae* DNA. Overall, *P. baroniae* was detected in 12/56 (21.43%) of the samples. It was found in 6/24 (25.00%) of patients with acute symptoms and 6/32 (18.75%) of those with no symptoms. However, there was no significant difference between their occurrence and clinical symptoms.

Conclusions: Our results show that the PCR assay is effective for detecting *P. baroniae* from clinical specimens. Our findings confirm that this species is associated with endodontic infections. However, no significant association of this species with clinical symptoms was found.

Keywords: *Prevotella baroniae*, Endodontic infection, Polymerase chain reaction, Anaerobic bacteria

บทนำ

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่เกิดจากเชื้อในช่องปาก ซึ่งส่งผลให้เนื้อฟันถูกทำลาย หากไม่ได้รับการรักษาอาจมีการลุกลามของการติดเชื้อเข้าสู่ภายในฟันทำให้เกิดสภาวะเนื้อเยื่อในฟันอักเสบ (Pulpitis) และหากมีการลุกลามของแบคทีเรีย หรือผลผลิตของแบคทีเรียออกไปนอกปลายรากฟันจะทำให้เกิดสภาวะเนื้อเยื่อปริทันต์ปลายรากอักเสบ (Apical periodontitis) อาการแสดงของสภาวะเนื้อเยื่อปริทันต์ปลายรากอักเสบนั้นอาจเป็นแบบเฉียบพลัน (Acute) คืออาการปวดหรือบวมบริเวณรอบปลายราก หรืออาจมีอาการแบบเรื้อรัง (Chronic) คือไม่มีอาการปวดหรือบวม แต่มีการทำลายของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันซึ่งตรวจพบได้จากภาพถ่ายรังสี[1]

การติดเชื้อในคลองรากฟันมีลักษณะเป็นพลวัต คือในแต่ละช่วงเวลาอาจพบแบคทีเรียต่างชนิดและมีปริมาณแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม

ในคลองรากฟัน เช่น ปริมาณออกซิเจนและแหล่งอาหารของแบคทีเรีย โดยในการติดเชื้อของคลองรากฟันครั้งแรก (Primary endodontic infection) จะมีลักษณะสำคัญคือ เป็นการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดร่วมกัน (Mixed infection) เชื้อที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อชนิดที่เจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) ซึ่งอาจมีเชื้อที่แตกต่างกันถึง 10-20 สปีชีส์ (Species)[2] มีปริมาณแตกต่างกัน 10^3-10^8 เซลล์[3] อย่างไรก็ตาม ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อชนิดใดที่เป็นสาเหตุหลัก หรือมีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อดังกล่าว แต่เชื่อว่าเชื้อที่พบได้บ่อยและพบในปริมาณมากจากสิ่งส่งตรวจน่าจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค

ในปี 2002 แสงอุษา และคณะ[4] เพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากหนองรอบปลายรากฟันของผู้ป่วยที่มีอาการปวดบวมอย่างรุนแรง พบว่า เชื้อชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด คือเชื้อชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ใน สกุล *Prevotella* แต่ไม่สามารถจำแนกเชื้อดังกล่าวได้จนถึงระดับสปีชีส์ เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้มาก่อน ต่อมาในปี 2005 Downes และคณะ[5] ตีพิมพ์บทความเกี่ยวกับเชื้อ *Prevotella baroniae* ที่เพิ่งถูกค้นพบและตั้งชื่อใหม่ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถจำแนกได้ด้วยวิธีอื่นนอกจากวิธีทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยข้อมูลเกี่ยวกับการเรียงตัวของลำดับเบสในยีน 16S rRNA (16s rRNA gene) เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับเบสของยีนดังกล่าวจากเชื้อ *P. baroniae* และเชื้อ *Prevotella* จากการศึกษาของแสงอุษา และคณะ ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ (Gene sequencing) พบว่ามีความเหมือนกัน (Homology) 99-100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ผลของลักษณะทางชีวเคมีก็สอดคล้องกัน ดังนั้นเชื้อ *Prevotella* ที่พบจากหนองรอบปลายรากฟันจากการศึกษาของแสงอุษา และคณะจึงน่าจะเป็นเชื้อ *P. baroniae*

ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ *P. baroniae* ในช่องปากของผู้ป่วยที่มีอาการเนื้อเยื่อปริทันต์ปลายรากอักเสบทั้งแบบเฉียบพลัน[4,6,7] แบบเรื้อรัง[8-10] และแบบที่รักษาคลองรากฟันไปแล้วมีการติดเชื้อซ้ำ[11,12] ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. baroniae* อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเป็นเชื้อก่อโรคในฟันและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *P. baroniae* ในฟันของประชากรไทยมาก่อน คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วสำหรับจำแนกเชื้อ *P. baroniae* โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ออกแบบและทดสอบไพรเมอร์จำเพาะ ที่สามารถนำไปใช้จำแนกเชื้อ *P. baroniae* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) 2) ศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *P. baroniae* ในฟันของประชากรไทยภาคเหนือกลุ่มหนึ่ง

วิธีการทดลอง

การออกแบบและทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะ (Specific primers) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อ *P. baroniae* ที่ได้ออกแบบและนำมาทดสอบในการศึกษานี้มีลำดับเบสดังนี้ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Forward primer): 5′-CCTCCACTTTGGACATCTTTG-3′ (21 คู่เบส) รีเวอร์ส ไพรเมอร์ (Reverse primer): 5′-CATCATCTCTGAATCGTACGTCT-3′ (23 คู่เบส) ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าวทำได้โดยนำข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอในยีน 16S rRNA ของเชื้อ *P. baroniae* (Genbank accession number AY840553) และเชื้ออื่น ๆ ที่พบได้บ่อยในช่องปากจากฐานข้อมูลยีน (GenBank) มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม Clustal W เพื่อค้นหาช่วงของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะของเชื้อ *P. baroniae* แล้วนำไปออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ แล้วทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบไว้ด้วยโปรแกรม Primer 3:WWW Primer tool จากนั้นนำลำดับเบสของไพรเมอร์จำเพาะไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีน แล้วจึงนำไปสังเคราะห์ต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะ ทำโดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard strain) และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Clinical strains) ตลอดจนดีเอ็นเอของเชื้อสปีชีส์อื่น และสกุลอื่นซึ่งพบได้บ่อยในฟันที่ติดเชื้อ ดังนี้ *Prevotella loeschii* (ATCC15930), *Prevotella oralis* (ATCC 33269), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella melaninogenicus* (ATCC 25845), *Porphyromonas asaccharolyticus* (ATCC 25260), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Bacteroides ureolyticus* (ATCC 33387), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104), *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987), *Actinomyces*

actinomycetemcomitans (ATCC 29522), *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 25285), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Streptococcus mutans* serotype c, *Streptococcus gordonii* (clinical strain), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Veillonella parvula* (ATCC 10790), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Eubacterium lentum* (ATCC 25559), *Tannerella forsythus* (ATCC 43037), *Peptostreptococcus magnus* (ATCC 14955) มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะ เตรียมขึ้นจากสารละลายปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วยไพรเมอร์จำเพาะ 0.4 µM แมกนีเซียมคลอไรด์ 2 mM เอนไซม์ AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD (Applied Biosystems, California, USA) 1.25 U สารผสมของดีออกซีเบสไตรฟอสเฟส (Deoxy base triphosphate) ทั้ง 4 ชนิด (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) อย่างละ 0.2 mM และดีเอ็นเอต้นแบบ 75-100 พิโคกรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ GeneAmp 10X PCR Gold (Applied Biosystems, California, USA) จากนั้นนำหลอดทดลองเข้าเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (Master-cycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ต่อจากนั้นเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน 3 อุณหภูมิเป็นจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 95°C 15 วินาที อุณหภูมิ 60°C 15 วินาที และอุณหภูมิ 72°C 60 วินาที หลังจากนั้นแช่สารละลายที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบว่ามีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR product) หรือไม่โดยนำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์หาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะด้วยวิธีเจลอิเลกโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) ในวุ้นอะกาโรส (Agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยใช้วิธีการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าแบบแนวนอน และใช้สารละลายกรดทริสบอริก อีดีทีเอหรือทีบีอี (Tris boric acid EDTA; TBE) เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วย้อมให้เห็นแถบดีเอ็นเอด้วยสาร SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) และบันทึกภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UVP, Cambridge, England) หากพบว่ามีการสร้างสายดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 838 คู่เบส แสดงว่าให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส นอกจากนี้ยังใช้ดีเอ็นเอจากทุกเชื้อข้างต้นมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์สากล (Universal primers) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ทุกชนิดเป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) ส่วนกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) จะไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอใด ๆ ในปฏิกิริยาเลย

การทดสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะทำโดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อ *P. baroniae* จำนวน $1x10^1$-$1x10^8$ เซล (10-fold dilution) มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อหาว่าต้องมีปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* น้อยที่สุดเท่าใดที่จะให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้

การเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

สิ่งส่งตรวจทั้งหมดในการศึกษานี้ได้เก็บจากผู้ป่วยจำนวน 56 คน อายุระหว่าง15-64 ปี เป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาคลองรากฟันที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2551 โดยเก็บสิ่งส่งตรวจจากฟันรากเดียวที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีการตายของเนื้อเยื่อใน (Pulp necrosis) และมีอาการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันร่วมด้วย (โดยมีอาการปวดเมื่อเคาะ หรือบวม หรือมีรอยโรคปลายรากในภาพถ่ายรังสี) และไม่ได้รับประทานยาปฏิชีวนะก่อนการเก็บสิ่งส่งตรวจ ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับทราบข้อมูลของการวิจัยนี้และได้แสดงความจำนงยินยอมเข้าร่วมการวิจัยเป็นลายลักษณ์อักษร โดยยินยอมให้เก็บตัวอย่างหนอง หรือของเหลวในคลองรากฟันก่อนการรักษาโดยแบ่งผู้ป่วยออกตามอาการแสดงเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มอาการแบบเฉียบพลัน (Symptomatic) คือมีอาการปวดร่วมกับมีการอักเสบ หรือบวมของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันจำนวน 24 คน และกลุ่มไม่มีอาการแบบเฉียบพลัน (Asymptomatic) จำนวน 32 คน

การเก็บตัวอย่างในผู้ป่วยที่มีอาการบวมร่วมด้วยนั้น เริ่มจากการฉีดยาชาเฉพาะที่ (Local infiltration) หรือการฉีดยาชาเส้นประสาทอินฟีเรีย อัลวีโอล่า (Inferior alveolar nerve block) แล้วให้ผู้ป่วยอมกลั้วปากด้วยสารละลายคลอร์เฮกซิดีน

(Chlorhexidine) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นกันน้ำลายบริเวณเนื้อเยื่อที่บวมด้วยก้อนสำลี เช็ดด้วยสารละลายโพวิโดน ไอโอดีน (Povidone iodine) ให้ชุ่มอีก 1 นาทีแล้วเช็ดให้แห้ง ใช้แท่งกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ (Sterile paper point) ป้ายบริเวณเนื้อเยื่อที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นนำแท่งกระดาษซับไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวไธโอกลัยคอลเลท (Thioglycollate broth) เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในช่องปากในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง (ซึ่งตัวอย่างใดให้ผลบวกในขั้นตอนนี้จะถูกตัดออกจากการทดลอง) จากนั้นใช้เข็มขนาด 16 ที่ต่อกับหลอดแก้ว (Syringe) เจาะดูดหนองจากบริเวณที่บวม บันทึกปริมาณหนอง และนำตัวอย่างหนองที่ได้นั้นเก็บไว้ในหลอดที่บรรจุของเหลวสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (Reduced Transport Fluid) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20°C จนกว่าจะนำไปตรวจสอบต่อไป

การเก็บตัวอย่างในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการบวม ทำโดยการใช้แผ่นยางกันน้ำลาย (Rubber dam) สวมที่ฟันก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียในช่องปาก ทำความสะอาดฟันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 3 และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงกรอฟันเพื่อกำจัดเนื้อฟันส่วนที่ผุออกให้หมด ทำความสะอาดฟันอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) ที่ปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/v) เพื่อทำลายฤทธิ์ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จากนั้นเช็ดผิวฟันให้แห้งด้วยสำลีปราศจากเชื้อ ทดสอบความสะอาดของพื้นผิวโดยใช้แท่งกระดาษซับเช็ดที่ผิวฟันแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซึ่งตัวอย่างใดให้ผลบวกในขั้นตอนนี้จะถูกตัดออกจากการทดลอง) จากนั้นกรอฟันโดยไม่ใช้น้ำด้วยหัวกรอที่ปราศจากเชื้อจนทะลุเข้าสู่โพรงเนื้อเยื่อใน ฉีดน้ำเกลือเข้าไปในคลองรากเล็กน้อย ใช้ตะไบ (File) ใส่ลงในคลองรากฟันให้สั้นกว่าความยาวฟันในภาพถ่ายรังสีประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วเคลื่อนตะไบให้สัมผัสกับผนังคลองรากฟันโดยรอบ แล้วใช้แท่งกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อใส่ไว้ในคลองรากฟันส่วนปลายเพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำแท่งกระดาษซับใส่ในหลอดที่บรรจุของเหลวสำหรับเก็บรักษาเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปตรวจสอบต่อไป

การหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี PCR

นำสิ่งส่งตรวจที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C มาสกัดแยกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจด้วยน้ำยาแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp minikit (Qiagen, Chatsworth, California) ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้มาทดสอบว่ามีดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* อยู่ในสิ่งส่งตรวจหรือไม่ โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดังกล่าวข้างต้นด้วยไพรเมอร์จำเพาะ และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจ 1 นาโนกรัมเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ยังทดสอบกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์สากลด้วย เพื่อตรวจสอบว่ามีแบคทีเรียใด ๆ อยู่ในสิ่งส่งตรวจหรือไม่ จากนั้นตรวจสอบหาดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยวิธีเจลอิเลกโตรโฟรีซิส

การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

สุ่มนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากสิ่งส่งตรวจจำนวน 5 รายไปวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* โดยวิธี Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ว่ามีความเหมือนกัน (Homology) หรือไม่

การวิเคราะห์ทางสถิติ

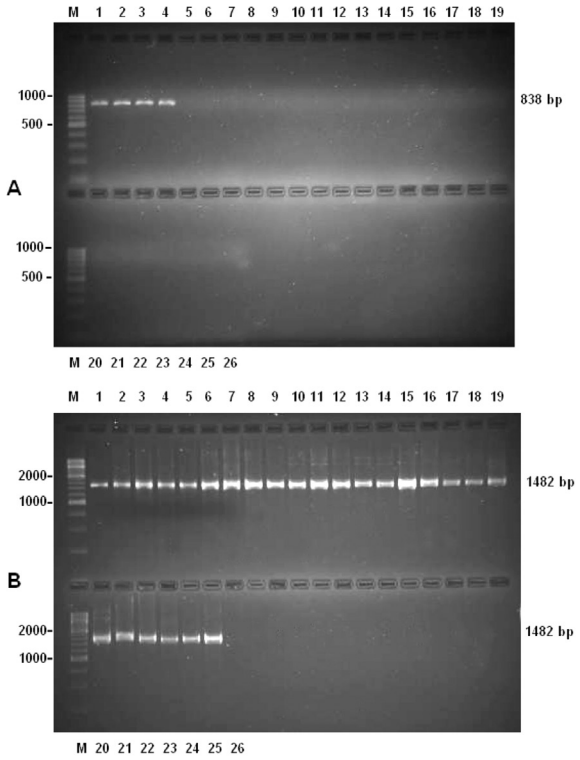
อุบัติการณ์ของการพบเชื้อ *P. baroniae* ในสิ่งส่งตรวจจะถูกบันทึกเป็นร้อยละของจำนวนสิ่งส่งตรวจที่พบเชื้อ แล้วแยกตามการมีอาการแบบเฉียบพลันหรือไม่มีอาการแสดงทางคลินิก จากนั้นใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 for Windows (IBM, Chicago, IL, USA) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของอุบัติการณ์พบเชื้อ *P. baroniae*e กับอาการแสดงทางคลินิกด้วย Chi-Square test โดยจะพิจารณาว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า $p<0.05$

ผลการทดลอง

ผลการออกแบบและทดสอบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อ P. baroniae

เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อต่าง ๆ ที่พบได้บ่อยในช่องปากมา

ทดสอบกับไพรเมอร์จำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าไพรเมอร์นั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. baroniae* มาก เนื่องจากไม่พบการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาด 838 คู่เบส เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อชนิดอื่น ๆ เลยนอกจากเชื้อ *P. baroniae* เท่านั้น (รูป 1A) ซึ่งผลการทดสอบดีเอ็นเอของเชื้อทุกชนิดกับไพรเมอร์สากลพบว่าทุกเชื้อให้ผลบวกโดยมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขนาด 1482 คู่เบส (รูป 1B) ยกเว้นกลุ่มควบคุมลบซึ่งไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบอยู่ในปฏิกิริยาเลย

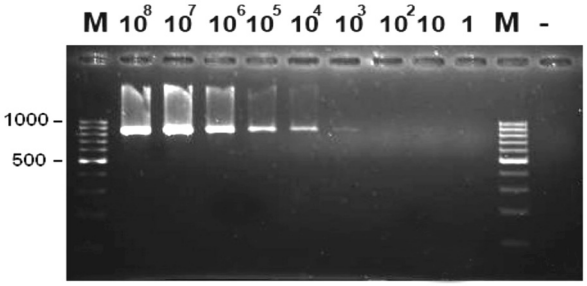


รูปที่ 1 *แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายใหม่จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อต่าง ๆ มาทดสอบกับไพรเมอร์จำเพาะ (รูป A) และไพรเมอร์สากล (รูป B)*

Figure 1 *PCR products generated from bacterial DNA when tested with specific primers (A) and universal primers (B)*

M: แถบดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA Markers) 1: *P. baroniae* (standard strain) 2-4: *P. baroniae* (clinical strain) 5-25: *P. loeschii, P. oralis, P. intermedia, P. melaninogenicus, P. asaccharolyticus, P. gingivalis, P. endodontalis, B. ureolyticus, A. naeslundii, A. viscosus, A. actinomycetemcomitans, F. necrophorum, F. nucleatum, S. mutans, S. gordonii, E. faecalis, V. parvula, E. coli, E. lentum, T. forsythus, P. magnus* ตามลำดับ 26: กลุ่มควบคุมลบ (Negative control)

ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจหาเชื้อ *P. baroniae* พบว่า ปริมาณเชื้อ *P. baroniae* ที่น้อยที่สุดที่จะตรวจพบได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ประมาณ 0.75 พิโคกรัม หรือเทียบเท่าได้กับเชื้อประมาณ 10^3 เซลล์ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 *แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายใหม่จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ P. baroniae ปริมาณต่าง ๆ มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ*

Figure 2 *PCR products generated from different amount of P. baroniae DNA template*

M: แถบดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA Markers) 10^8- 1 ปริมาณดีเอ็นเอจากเชื้อ 10^8- 1 เซลล์ตามลำดับ—กลุ่มควบคุมลบ

ผลการตรวจหาเชื้อ P. baroniae จากสิ่งส่งตรวจ

เมื่อนำสิ่งส่งตรวจที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 56 ราย (มีอาการแบบเฉียบพลัน 24 ราย และไม่มีอาการแบบเฉียบพลัน 32 ราย) มาสกัดแยกดีเอ็นเอแล้วนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์สากลและไพรเมอร์จำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียอยู่ในทุกสิ่งส่งตรวจ โดยตรวจพบการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขนาด 1482 คู่เบสในทุกสิ่งส่งตรวจเมื่อทดสอบกับไพรเมอร์สากล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจนั้นไม่มีสารยับยั้ง (inhibitors) ต่อการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส นอกจากนี้ยังตรวจพบการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขนาด 838 คู่เบสซึ่งแสดงว่ามีเชื้อ *P. baroniae* ในสิ่งส่งตรวจจำนวน 12 ราย จาก 56 ราย (21.43%) ซึ่งเมื่อนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ดังกล่าว

ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 99-100

จากสิ่งส่งตรวจทั้ง 12 รายที่ตรวจพบว่ามีเชื้อ *P. baroniae* นั้น มี 6 รายเป็นสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยที่มีอาการแบบเฉียบพลัน (25.00%) และอีก 6 รายเป็นสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแบบเฉียบพลัน (18.75%) ซึ่งความแตกต่างของอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ *P. baroniae* ในผู้ป่วยที่มีอาการแบบเฉียบพลันหรือไม่มีอาการทางคลินิกนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในทศวรรษที่ผ่านมามีการนำวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้ในการจำแนกเชื้อ ทำให้สามารถตรวจพบแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยากได้ เช่น *P. baroniae, Tannerella forsythia, Filifactor alocis, Olsenella uli, Dialister species* และ *Treponema species*[4,13-16] วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาวิธีการหนึ่งที่สามารถสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนน้อยภายในเวลาอันรวดเร็วได้ โดยในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะมีการใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อที่ต้องการตรวจหา โดยไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในบริเวณที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนนั้นเกิดเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาดจำเพาะขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบและทดสอบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *P. baroniae* ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และพบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อสูงมาก ดังจะเห็นได้จากการพบดีเอ็นเอขนาดจำเพาะเมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* เท่านั้น ซึ่งถึงแม้ว่าในการทดลองนี้จะไม่ได้ทดสอบกับเชื้อทุกชนิดในช่องปาก แต่ผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของไพรเมอร์จำเพาะกับฐานข้อมูลด้วยวิธี Blast ก็ไม่พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อที่เคยมีรายงานการพบในช่องปากเลย นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่จะตรวจพบได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ประมาณ 0.75 พิโคกรัม หรือเทียบเท่าได้กับเชื้อ *P. baroniae* ประมาณ 10^3 เซลล์ ซึ่งถือว่ามีความไวมากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปถึง 10-100 เท่า ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ตรวจหาเชื้อในสิ่งส่งตรวจได้

ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายใหม่ที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยนอกจากจะดูจากการมีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดที่คำนวณไว้แล้ว ยังได้นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อ *P. baroniae* ซึ่งก็พบว่ามีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99-100 ซึ่งโดยทั่วไปเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาว่าเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันนั้น จะต้องมีลำดับเบสดีเอ็นเอเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ขึ้นไป[16,17] ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะนี้สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *P. baroniae* จากสิ่งส่งตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งวิธีการนี้จะทราบผลได้ภายในไม่กี่ชั่วโมง ในขณะที่การวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอนั้นแม้ว่าจะถือเป็นวิธีมาตรฐานที่เชื่อถือได้มากที่สุดแต่ก็ต้องใช้เวลานานกว่ามาก ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะและใช้งบประมาณค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม ในการนำไปใช้จำแนกเชื้อนั้น เมื่อตรวจพบการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หากต้องการตรวจยืนยันความถูกต้องของการจำแนกเชื้อ สามารถใช้วิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดต่อจำเพาะซึ่งสามารถใช้ยืนยันผลได้โดยใช้เวลาน้อย โดยในการศึกษานำร่องพบว่าหากนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนี้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดต่อจำเพาะชนิด EcoRV จะเกิดเป็นสายดีเอ็นเอสองเส้นที่มีขนาดประมาณ 300 และ 500 คู่เบส ซึ่งก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะสามารถนำมาตรวจสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อ *P. baroniae* ได้ ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและงบประมาณกว่าวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ

การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อ *P. baroniae* จาก 21.43% ของสิ่งส่งตรวจทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานผลของ Rocas และคณะ[19] ที่ศึกษาในประชากรบราซิลจำนวน 52 ราย ซึ่งได้พบเชื้อใน 35% ของสิ่งส่งตรวจ โดยมีอุบัติการณ์ของการพบเชื้อในกรณีที่มีอาการแบบเฉียบพลันไม่ต่างจากแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มที่จะพบเชื้อในกรณีที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังมากกว่า แต่จากการศึกษาในกลุ่มประชากรไทยภาคเหนือครั้งนี้พบว่ามีความแตกต่างออกไป คือมีแนวโน้มที่จะพบเชื้อในกรณีที่มีการอักเสบแบบเฉียบพลันมากกว่าแบบเรื้อรัง อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างระหว่างทั้งสองกลุ่มนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติแล้ว

รายงานการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อใด ๆ ในพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์แตกต่างกันอาจพบเชื้อในอุบัติการณ์ที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันอย่างมาก ทั้งนี้ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากวิธีการที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ ความไวและความจำเพาะของวิธีที่ใช้ตรวจหาและจำแนกแบคทีเรีย วิธีเก็บตัวอย่าง ความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ และความแตกต่างของเกณฑ์ทางคลินิกที่ใช้วินิจฉัยโรค ในการศึกษานี้และการศึกษาของ Rocas และคณะ[19] ต่างก็ใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยการเรียงตัวของยีน 16S rRNA มาใช้ในการจำแนกเชื้อ ซึ่งถึงแม้จะมีรายละเอียดแตกต่างกันแต่ก็ให้ผลใกล้เคียงกันในประชากรทั้งสองกลุ่ม

จากข้อมูลที่ผ่านมาซึ่งมีรายงานการพบเชื้อ *P. baroniae* ทั้งในช่องปากของผู้ป่วยที่มีอาการเนื้อเยื่อปริทันต์ปลายรากอักเสบทั้งแบบเฉียบพลัน[4,6,7] แบบเรื้อรัง[8-10] และแบบที่รักษาคลองรากฟันไปแล้วมีการติดเชื้อซ้ำ[11,12] และยังพบว่าเป็นเชื้อกลุ่ม *Prevotella* ที่พบได้บ่อยที่สุดสปีชีส์หนึ่งในการติดเชื้อของฟัน[4,6-8] แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. baroniae* อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเป็นเชื้อก่อโรคในฟันและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปถึงความสามารถก่อโรค (Pathogenicity) ตลอดจนการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents) ซึ่งปัจจุบันยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับการก่อโรค หรือปัจจัยก่อโรคของเชื้อนี้ มีรายงานว่าเชื้อ *P. baroniae* สามารถเกาะกลุ่ม (Coaggregation) กับเชื้ออื่น ๆ ที่แยกได้จากคลองรากฟันเดียวกัน[20] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อน่าจะมีความสามารถในการสร้างแผ่นชีวมวล (Biofilm) ร่วมกับเชื้ออื่นได้ และมีรายงานว่าเชื้อ *P. baroniae* มียีนที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนโตรอิมิดาโซล รีดักเทส (Nitroimidazole reductase) ซึ่งสามารถทำให้เชื้อดื้อต่อยาเมโทรไนดราโซล (Metronidazole) ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อแอนแอโรบส์ได้[21]

กล่าวโดยสรุป ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบใหม่นี้มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือสูงในการตรวจหาและจำแนกเชื้อ *P. baroniae* จากสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *P. baroniae* อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อปริทันต์ปลายราก

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

1. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002 Sep; 94: 281-293.
2. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Odontological Dissertations no.7, Umea, Sweden: University of Umea, 1976.
3. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. J Endod 2005; 31: 488-498.
4. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94: 746-755.
5. Downes J, Sutcliffe I, Tanner ACR, Wade WG. Prevotella marshii sp. nov. and Prevotella baroniae sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55: 1551-1555.
6. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. Oral Microbiol Immunol 2006; 21: 112-122.
7. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. J Dent Res 2009; 88: 61-65.
8. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol 2008; 46: 3599-3606.

9. Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. J Med Microbiol 2007; 56: 110-118.
10. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. Oral Microbiol Immunol 2007; 22: 19-23.
11. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. Oral Microbiol Immunol 2008; 23: 275-281.
12. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. J Endod 2008; 34: 926-931.
13. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. J Endod 2003; 29: 794-797.
14. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis, Tannerella forsythia,* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod 2006; 32: 937-940.
15. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res 2002; 81: 761-766.
16. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94: 494-498.
17. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia,* tetQ gene and total bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 39: 81-86.
18. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. J Clin Microbiol 2000; 38: 2362-2365.
19. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae, Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infections. J Endod 2009; 35: 1359-1362.
20. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. J Endod 2006; 32: 312-318.
21. Alauzet C, Mory F, Teyssier C, Hallage H, Carlier JP, Grollier G, Lozniewski A. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new nim gene in *Prevotella baroniae*. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 60-64.

The 3rd Thai-German Congress

"Multi-Disciplinary Treatment in Modern World of Implant Destistry"

วันที่ 13-15 มกราคม 2559

ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส

โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่

วันที่ 13 มกราคม 2559	
เวลา	รายละเอียด
13.30 - 16.00	Pre-congress
วันที่ 14 -15 มกราคม 2559	
8.30 - 17.30	Congress (Scientific Program)

วิทยากร

Dr. Fred Bergmann
Dr. George Bayer
Dr. Jeon In-Seong
Dr. Lutz Ritter
Dr. Nikos Mattheos
Dr. Steffen Kistler
Dr. Ady Palti
Dr. Marcus Beschnidt
Dr. Thongnard Kumchai
Dr. Montri Chantaramungkorn
Dr. Pathawee Khongkhunthian
Dr. Pintippa Bunyaratavej
Dr. Winai Kittidumkerng
Dr. Sonthi Sirimai
Dr. Niwut Juntavee
Dr. Supachai Suphankul
Dr. Parinya Amornsettachai

ค่าลงทะเบียน

ค่าลงทะเบียนสมาชิกทันตแพทย์เอกชน และอาจารย์ มช.	
ก่อนวันที่ 30 ก.ย. 2558	: 4,000 บาท
หลังวัน 30 ก.ย. 2558	: 5,000 บาท
ค่าลงทะเบียนสมาชิกทันตแพทย์ทั่วไป.	
ก่อนวันที่ 30 ก.ย. 2558	: 5,000 บาท
หลังวัน 30 ก.ย. 2558	: 6,000 บาท
นักศึกษาทันตแพทย์ในประเทศไทย และศิษย์เก่าทันตแพทย์ มช. ที่จบการศึกษาไม่เกิน 10 ปี	
ก่อนวันที่ 30 ก.ย. 2558	: 3,000 บาท
หลังวัน 30 ก.ย. 2558	: 4,000 บาท
ทันตแพทย์ทั่วไปในกลุ่มประเทศ Asia	
ก่อนวันที่ 30 ก.ย. 2558	: 6,000 บาท
หลังวัน 30 ก.ย. 2558	: 8,000 บาท

Abstract Submission

for Oral and Poster Presentation

Deadline 1 กันยายน 2558

โรงแรม ดิ เอ็มเพรส เชียงใหม่

(สำรองห้องพักก่อนวันที่ 10 กันยายน 2558)

ห้องสุพีเรีย	เตียงเดี่ยว 1,700	เตียงคู่ 1,900 บาท
ห้องดีลักซ์	เตียงเดี่ยว 2,200	เตียงคู่ 2,400 บาท
ห้องสวีท	เตียงเดี่ยว 5,500	เตียงคู่ 5,500 บาท
เตียงเสริม		600 บาท

Contact / ติดต่อสอบถาม

สมาคมทันตแพทย์เอกชนแห่งประเทศไทย

tpda2013@gmail.com

02-287-2886 , 085-094-8822

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

cedentcmu@yahoo.com

053-944428 , 098-789-0234

www.dent.cmu.ac.th/congress/index.php

Private Dentist Association of Thailand

สมาคมทันตแพทย์เอกชนแห่งประเทศไทย

DGOI Deutsche Gesellschaft für Orale Implantologie