ความชุกของเชื้อก่อโรคปริทันต์ 3 สายพันธุ์ และยีนที่สร้างปัจจัยความรุนแรง

Prevalence of Three Periodontal Pathogens and Virulence Factor Producing Genes

พรรณวดี พันธัย[1], ประกายมุกด์ สาหร่ายทอง[2], สาครรัตน์ คงขุนเทียน[1]
[1]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาชีววิทยาและวัสดุศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมิชิแกน สหรัฐอเมริกา
Panwadee Bandhaya[1], Prakaimuk Saraithong[2], Sakornrat Khongkhunthian[1]
[1]Section of Periodontology, Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University
[2]Department of Biologic and Materials Sciences, University of Michigan School of Dentistry, USA

ชม. ทันตสาร 2561; 39(2) : 119-132
CM Dent J 2018; 39(2) : 119-132

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ซีโรไทป์ต่าง ๆ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลาฟอร์ซัยเธีย รวมทั้งตรวจยีนที่กำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง และโรคเหงือกอักเสบ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: นำตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ทั้ง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 20 คน มาตรวจหาเชื้อและยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อด้วยวิธีวิธีพีซีอาร์แบบพื้นฐาน วิธีเนสเต็ทพีซีอาร์ และวิธีมัลติเพล็กพีซีอาร์

Abstract

Objectives: To study prevalence of 3 periodontal pathogens, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa), Porphyromonas gingivalis (Pg), and Tannerell forsythia (Tf)*, and their virulence factor producing genes in patients with aggressive periodontitis (AP), chronic periodontitis (CP), and gingivitis (G).

Materials and Methods: Subgingival plaque samples were collected from patients with AP, CP, and G (20 each group). The samples were analyzed for the pathogens and their virulence factors

Corresponding Author:

พรรณวดี พันธัย
ผู้ช่วยศาตราจารย์ สาขาวิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Panwadee Bandhaya
Assistant Professor, Section of Periodontology, Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand
e-mail: ***panwadee.b@cmu.ac.th***

ผลการศึกษา: ตรวจพบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ได้มากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบซีโรไทป์ซีมากที่สุด เมื่อเรียงลำดับผู้ป่วยตามกลุ่มโรคได้แก่ ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง และโรคเหงือกอักเสบ ตรวจพบยีนที่มีการสร้างไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซิน (ซีดีทียีน) ครบทั้ง 3 ยีน (เอ บี และซี) ได้ร้อยละ 56.3, 50 และ 44.4 ตามลำดับ สำหรับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสพบว่ามีความชุกร้อยละ 85, 75 และ 85 ตามลำดับ โดยมียีนกำหนดการสร้างฟิมเบรีย (ฟิมเอยีน) ร่วมกับยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์คอลลาจีเนส (พีอาร์ทีซียีน) ร้อยละ 58.8, 80 และ 52.9 ตามลำดับ ส่วนเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียพบว่ามีความชุกสูงในทุกกลุ่มตัวอย่างคือร้อยละ 100, 100 และ 90 ตามลำดับ โดยพบยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ซิสเทอีน โปรติเอส (พีอาร์ทีเอชยีน) ร้อยละ 90, 80 และ 72.2 ตามลำดับ

สรุป: ตรวจพบความชุกของเชื้อก่อโรคปริทันต์ทั้ง 3 ชนิดในผู้ป่วยทุกกลุ่ม พบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว โดยเฉพาะซีโรไทป์ซี ส่วนยีนที่กำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรง พบซีดีทียีนและพีอาร์ทีเอชยีนในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวมากที่สุด ในขณะที่พบฟิมเอยีนและพีอาร์ทีซียีนในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังมากที่สุด อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: แบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ โรคปริทันต์อักเสบ ยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรง ซีดีทียีน พีอาร์ทีเอชยีน ฟิมเอยีน พีอาร์ทีซียีน

producing genes by polymerase chain reaction, nested polymerase chain reaction, and multiplex polymerase chain reaction techniques.

Results: Prevalence of *Aa* was significantly higher in AP and Aa serotype c was the most detected serotype. Categorized by periodontal status; AP, CP and G, the percentage of cytolethal distending toxin gene (*CDT* gene) a, b and c detected simultaneously in each periodontal status were 56.3, 50, and 44.4 respectively. The percentage of subjects with *Pg* in each periodontal status was 85, 75, and 85 and frimbria producing gene (*fimA* gene) detection together with collagenase enzyme producing gene (*prtC* gene) was 58.2, 80, and 52.9 respectively. *Tf* was the highest prevalence bacteria of all periodontal status detected in this study with the percentage of 100, 100, and 90 while cysteine protease enzyme producing gene (*prtH* gene) of *Tf* was 90, 80, and 72.2 respectively.

Conclusions: Three periodontal pathogens were found in all groups of subjects. *Aa* was significantly found in patients with AP especially serotype c. For virulence factor producing genes, *CDT* gene and *prtH* gene were predominant in AP whereas *fimA* gene and *prtC* gene were mostly detected in CP. However, no significant differences were found between groups.

Keywords: periodontal pathogen, periodontitis, virulence factor producing gene, *CDT* gene, *prtH* gene, *prtC* gene, *fimA* gene

บทนำ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีสาเหตุจากหลายปัจจัยร่วมกัน สาเหตุหลักของโรคนี้เกิดจากแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์ โดยมีปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรคอื่น ๆ เช่น ปัจจัยเฉพาะที่ ปัจจัยทางพันธุกรรม รวมถึงปัจจัยเสี่ยงทำให้การแสดงออกของโรคมีความแตกต่างกัน[1] แบคทีเรียซึ่งจัดเป็นสาเหตุหลักของโรคนั้น มีหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งในปัจจุบันแบคทีเรียที่มีหลักฐานการศึกษาและได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อักเสบที่สำคัญมี 3 สายพันธุ์ด้วยกัน ได้แก่ เชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ *(Aggregatibacter actinomycetemcomitans)* เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส *(Porphyromonas gingivalis)* และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย *(Tannerella forsythia)*[2] โดยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง[3,4] ขณะที่เชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ มักสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว[5,6] อย่างไรก็ดี การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบนั้น มีโอกาสของการตรวจพบเชื้อทั้งสามชนิดร่วมกันได้

นอกจากชนิดของแบคทีเรียแล้ว มีการศึกษาที่พบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียก็มีผลต่อความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบเช่นกัน พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นจะมีปัจจัยความรุนแรง (virulence factors) ที่แตกต่างกันออกไป อาทิเช่น เชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ สามารถจัดแบ่งกลุ่มย่อยออกเป็น 6 ซีโรไทป์ (serotypes) ได้แก่ ซีโรไทป์เอ (a) บี (b) ซี (c) ดี (d) อี (e) และ เอฟ (f) ตามคุณสมบัติของโมเลกุลบนผนังเซลล์ที่ต่างกัน จากข้อมูลการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อต่างซีโรไทป์กันพบว่ามีปัจจัยความรุนแรงต่างกัน[7,8] ปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง คือ ไซโตลีธัลดิสเทนดิง ท็อกซิน หรือซีดีที (cytolethal distending toxin: CDT) พบว่ามีบทบาทในการไปยับยั้งวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ในระยะจี 2 (G2) ทำให้เซลล์ไม่เข้าสู่ขบวนการแบ่งเซลล์ (mitosis)[9] ส่วนประกอบของท็อกซินแบ่งออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ ซีดีทีบี (CdtB) หน้าที่ยับยั้งวัฏจักรเซลล์ ส่วนซีดีทีเอ (CdtA) และซีดีทีซี (CdtC) จับกันเป็นคู่เพื่อส่งซีดีทีบีเข้าสู่เซลล์ เมื่อท็อกซินเข้าสู่นิวเคลียสส่วนซีดีทีบีจะทำหน้าที่คล้ายเอ็นไซม์ดีเอนเอสวัน (DNase I) ย่อยสายดีเอ็นเอ เซลล์จึงตอบสนองโดยการหยุดการแบ่งเซลล์และตายในที่สุด โปรตีนทั้งสามชนิดนี้ถูกกำหนดการสร้างโดยยีนซีดีทีเอ *(cdtA)*, ยีนซีดีทีบี *(cdtB)* และยีนซีดีทีซี *(cdtC)* โดยยีนเหล่านี้เรียงตามลำดับอยู่ในซีดีทีโอเปอรอน *(cdt operon)* โดยทางด้านหน้าพบโอเพ็นรีดดิ้งเฟรม (open reading frame) 2 ตำแหน่งซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด ปัจจุบันนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซินของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ จากหลายประเทศ เช่น บราซิล เคนยา ญี่ปุ่นและสวีเดน โดยพบยีนซีดีทีเอ ซีดีทีบี ซีดีทีซี ใน 34 จาก 40 สายพันธุ์ ในปี 2002 Tan และคณะ พบความสัมพันธ์ของการพบยีนซีดีทีกับการเกิดโรคปริทันต์ที่รุนแรง[10] ส่วน Leung และคณะ รายงานว่าเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ สายพันธุ์ที่ไม่พบยีนซีดีทีมีผลในการทำลายเซลล์ต่ำ[11]

ส่วนเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีปัจจัยความรุนแรงหลายชนิด แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ ฟิมเบรีย (fimbriae) เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) เอนไซม์โปรตีเนสคล้ายทริปซิน (trypsin-like proteinase) หรือจิงจิเพน (gingipain) และโปรตีนฮีแมกกลูทินิน (hemagglutinin) เป็นต้น มีการศึกษาพบว่ายีนที่กำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีอยู่สองชนิดได้แก่ ยีนฟิมเอ *(fimA)* ที่กำหนดการสร้างฟิมเบรีย และยีนพีอาร์ทีซี *(prtC)* ที่กำหนดการสร้างโปรตีนคอลลาจีเนสอันเป็นปัจจัยความรุนแรงหลักที่เป็นสาเหตุของการลุกลามของโรคที่พบมากในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[12-15] ส่วนเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย สามารถสร้างปัจจัยความรุนแรงได้หลายชนิด ได้แก่ โมเลกุลที่ช่วยในการยึดเกาะที่มีลิวซีนมาก (leucine-rich adhesion molecule) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายกระดูกเบ้าฟัน โปรตีนฮีแมกกลูทินินและปัจจัยที่ทำให้เซลล์ตาย (apoptotic-inducing factor) นอกจากนั้นยังพบเอนไซม์อื่น ๆ อีก เช่น เอนไซม์ไซอาลิเดส (sialidase) เอนไซม์โปรตีเนสคล้ายทริปซิน และเอนไซม์ซิสเทอีนโปรติเอส (cysteine protease) เป็นต้น[16-18] เอนไซม์ซิสเทอีนโปรติเอสถูกศึกษามากในเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย ถูกสร้างโดยยีนพีอาร์ทีเอช *(prtH)* มีคุณสมบัติ

ในการย่อยโปรตีนและทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสลาย[19] ในปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับความชุกของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ นั้นยังคงมีความหลากหลาย ผลการศึกษายังไม่สามารถชี้ชัดถึงบทบาทความสัมพันธ์ต่อการก่อโรคปริทันต์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่ไม่ได้จำแนกเชื้อลงไปถึงสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันในการสร้างปัจจัยความรุนแรง ดังนั้นหากทำการศึกษาให้มีความจำเพาะลงไปถึงระดับยีนที่สร้างปัจจัยความรุนแรง อาจจะทำให้เห็นความสัมพันธ์ของเชื้อกับโรคปริทันต์ได้ชัดเจนขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ซีโรไทป์ เอ บี ซี ดี อี และเอฟ รวมถึงยีนซีดีทีเอ บี และซี ความชุกของยีนฟิมเอ ยีนพีอาร์ทีซีของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และความชุกของยีนพีอาร์ทีเอช ของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีสภาวะปริทันต์ที่แตกต่างกัน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ศึกษาเป็นผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่มารับการตรวจและรับการรักษา ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 60 คน อายุระหว่าง 17 – 78 ปี ประกอบด้วยผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวทั่วไป (generalized aggressive periodontitis) จำนวน 20 คน ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังทั่วไประดับรุนแรง (generalized severe chronic periodontitis) จำนวน 20 คน และผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ จำนวน 20 คนตามเกณฑ์การจำแนกโรคของบัณฑิตยสภาสาขาปริทันตวิทยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา ปี 2542 (American Academy of Periodontology; AAP 1999) การศึกษานี้ได้รับคำอนุมัติจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่แล้ว โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครตามเกณฑ์ของสมาคมโรคหัวใจแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา คศ. 2000[20] คือ ต้องเป็นผู้ที่มีสุขภาพทั่วไปแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบใด ๆ และไม่มีประวัติต้องรับประทานยาปฏิชีวนะก่อนการรักษาทางทันตกรรมหรือได้รับยาปฏิชีวนะในช่วงก่อนการศึกษาอย่างน้อย 3 เดือน นอกจากนี้ยังต้องไม่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ คือ ผู้สูบบุหรี่ ผู้เป็นโรคเบาหวาน หรือมีโรคทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบก้าวร้าว รวมทั้งสตรีมีครรภ์

จากนั้นทำการตรวจสภาวะในช่องปาก เพื่อเก็บข้อมูลทางปริทันต์ซึ่งประกอบด้วย การวัดระดับอนามัยช่องปากของผู้ป่วย โดยการตรวจดัชนีคราบจุลินทรีย์ (plaque index; PI) การวัดระดับการอักเสบของเหงือก โดยการตรวจภาวะการมีเลือดออกจากร่องเหงือก (bleeding index; BI) ด้วยอุปกรณ์ตรวจปริทันต์ (periodontal probe) โดยใช้ดัชนีของ Ainamo and Bay[21] การวัดระยะความลึกของร่องลึกปริทันต์ (probing pocket depth; PPD) และการวัดระยะการร่นของเหงือก (gingival recession; GI) โดยใช้อุปกรณ์ตรวจปริทันต์ชนิดพีซีพี-ยูเอ็นซี 15 (PCP-UNC 15 periodontal probe, Hu-Friedy, USA) ทำการวัด 6 ตำแหน่งต่อฟัน 1 ซี่ ได้แก่ ด้านใกล้กลางด้านแก้ม ด้านแก้ม ไกลกลางด้านแก้ม ใกล้กลางด้านลิ้น ด้านลิ้น และไกลกลางด้านลิ้น ทำการคำนวณระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ทางคลินิก (clinical attachment level; CAL) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการรวมค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์กับค่าระยะการร่นของเหงือก

การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์

หลังการตรวจสภาวะทางปริทันต์ 1 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก โดยเช็ดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือกด้วยสำลีที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้กระดาษซับปลายแหลมที่ปราศจากเชื้อ (sterile paper point) เก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกโดยสอดกระดาษซับเข้าไปในร่องเหงือกด้านใกล้กลางด้านแก้มของฟันทุกซี่ในช่องปากทิ้งไว้นาน 30 วินาที จากนั้นนำกระดาษซับใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่บรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาย (phosphate buffer saline) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแทนเนอเรลลาฟอร์ซัยเธียด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย

ทำการตรวจหาเชื้อทั้งสามสายพันธุ์จากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างของคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAmp DNA mini kit (Qiagen, CA, USA) ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิต จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจหาเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) ต่อส่วน LKTA ของเชื้อนี้ ด้วยวิธีพีซีอาร์พื้นฐาน (conventional PCR)[22] ตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์พื้นฐาน[13] และตรวจหาเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์แบบเนสเต็ด (Nested PCR)[23] ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้หลักการเดียวกับพีซีอาร์พื้นฐาน แต่ลดข้อจำกัดของวิธีการ

ตารางที่ 1 *ลำดับไพรเมอร์ของยีนที่ทำการศึกษา*

Table 1 *Sequence of primers for specific gene*

Primers	Sequence	Product size (bp)
LKTA	LKT2 5'-CTA GGT ATT GCG AAA CAA TTT G-3' LKT3 5'-CCT GAA ATT AAG CTG GTA ATC-3'	262
16S rDNA P. gingivalis	Pg-F 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG -3' Pg-R 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT -3'	404
16S rDNA T. forsythia	Tf-F 5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA -3' Tf-R 5'-TGC TTC ACT GTC ACT TAT ACC T -3'	641
Serotype-a	SeroA-F 5' -GCA ATG ATG TAT TGT CTT CTT TTG GA -3' SeroB-R 5' -CTT CAG TTG AAT GGG GAT TGA CTA AAA C -3'	293
Serotype-b	SeroB-F 5' -CGG AAA TGG AAT GCT TGC -3' SeroB-R 5' -CTG AGG AAG CCT AGC AAT -3'	333
Serotype-c	SeroC-F 5' -AAT GAC TGC TGT CGG AGT -3' SeroC-R 5' -CGC TGA AGG TAA TGT CAG -3'	268
Serotype-d	SeroD-F 5' -TTA CCA GGT GTC TAG TCG GA -3' SeroD-R 5' -GGC TCC TGA CAA CAT TGG AT -3'	411
Serotype-e	SeroE-F 5' -CGT AAG CAG AAG AAT AGT AAA CGT -3' SeroE-R 5' -AAT AAC GAT GGC ACA TCA GAC TTT -3'	311
Serotype-f	SeroF-F 5' -AAA ATT TCT CAT CGG GAA TG -3' SeroF-R 5' -CCT TTA TCA ATC CAG ACA GC -3'	232
cdtA	cdtA-F 5'-GGG GGA CTA GTG GAT GGA TCT AAG GAG AGA TAT AAT G -3' cdtA-R 5'-GGG GGA GCT CTT AAT TAA CCG CTG TTG CTT CTA ATA CAG -3'	694
cdtB	cdtB-F 5'-GGG GGA ATT CTA AGG AGT TTA TAT GCA ATG GGT AAA G -3' cdtB-R 5'-GGG GGG AGC TCT TAG CGA TCA CGA ACA AAA CTA ACA G -3'	863
cdtC	cdtC-F 5'-GGG GGG AAT TCT AGT TTT GTT CGT GAT CGC TAA GGA G -3' cdtC-R 5'-GGG GGA CTA GTT AGC TAC CCT GAT TTC TTC GCA CCG -3'	593
fim A	fimA-F 5'-ATA ATG GAG AAC AGC AGG AA -3' fimA-R 5'-TCT TGC CAA CCA GTT CCA TTG C -3'	131
prtC	prtc-F 5'-ACA ATC CAC GAG ACC ATC -3' prtc-R 5'-TTC AGC CAC ACC GAG ACG -3'	584
prtH	prtH-F 5'-ATG AAG ATG CTT GAA GGC TTC -3' prtH-R 5'-TTA CAA ATC TAC TCT CAA TTG G -3'	1,443

พีซีอาร์พื้นฐานโดยเพิ่มความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อให้มากขึ้น ลำดับไพรเมอร์ของเชื้อที่ศึกษาแสดงในตารางที่ 1 เมื่อดีเอ็นเอของเชื้อได้รับการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ตามอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 2) แล้ว นำมาตรวจวัดโดยวิธีอีเล็คโตรโฟรีสิส (electrophoresis) บนวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 ที่ผสมเอทิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบดีเอ็นเอที่ถูกแยกชั้นออกมาด้วยวิธีอีเล็คโตรโฟรีสิสจะมองเห็นได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งสามารถเทียบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอตัวอย่างกับ 1 kb DNA ladder (O'RangeRuler™, Fermentas, Lithuania) ภายใต้เครื่อง ChemiDoc XRS system (Bio-rad, CA, USA) ร่วมกับโปรแกรม Quantity one 1-D analysis software (Bio-rad, CA, USA)

นำตัวอย่างที่ตรวจพบแบคทีเรีย มาตรวจหายีนสร้างปัจจัยความรุนแรงต่อ โดยตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ นำมาตรวจหาซีโรไทป์เอ บี ซี ดี อี ด้วยวิธีพีซีอาร์แบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex PCR)[24] และ ซีโรไทป์เอฟด้วยวิธีพีซีอาร์พื้นฐาน[25] ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ศึกษาเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ซีโรไทป์ต่าง ๆ ในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนดีเอ็นเอที่กำหนดการสร้างโมเลกุลบนผนังเซลล์ที่จำเพาะต่อเชื้อซีโรไทป์นั้น ๆ ซึ่งอ้างอิงตามการศึกษาของ Suzuki และคณะ[24] สำหรับเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ซีโรไทป์เอถึงอี และการศึกษาของ Kaplan และคณะ[25] สำหรับเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ซีโรไทป์เอฟ ดังแสดงลำดับไพรเมอร์ในตารางที่ 1 การศึกษานี้ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์ต่าง ๆ ที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ ATCC 29523 (ซีโรไทป์ เอ) ATCC 43718 (ซีโรไทป์ บี) ATCC 33384 (ซีโรไทป์ ซี) IDH 781 (ซีโรไทป์ ดี) IDH 1705 (ซีโรไทป์ อี) และ SA 474 (ซีโรไทป์ เอฟ) เป็นตัวควบคุมว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นจริง (positive control) และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมกรณีไม่พบเชื้อแบคทีเรีย (negative control) และตรวจหายีนกำหนดการสร้างไซโตลีทัลดิสเทนดิง ท็อกซินโดยวิธีพีซีอาร์พื้นฐานโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนซีดีทีเอ บี และซี[26] (ตารางที่ 1) โดยมีเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33384 เป็นตัวควบคุมผลบวกกรณีตรวจพบเชื้อและยีนซีดีทีเอ บีและซี และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ

ตารางที่ 2 *อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา*

Table 2 *PCR temperature*

Temperature / Primers	Start	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Hold	Cycles
LKTA	96 °C 2 min	94 °C 15 sec	55 °C 30 sec	72 °C 1 min	72 °C 7 min	4 °C	36
Serotype a-f	96 °C 2 min	94 °C 15 sec	54 °C 30 sec	72 °C 1 min	72 °C 10 min	4 °C	36
cdt A, B, C	96 °C 2 min	94 °C 2 min	65 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 7 min	4 °C	28
16S rDNA, *fimA, prtC*	94 °C 5 min	94 °C 1 min	50 °C 1 min	72 °C 1.5 min	72 °C 7 min	4 °C	35
Tf 16S rDNA	95 °C 2 min	95 °C 30 sec	60 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 2 min	4 °C	26
prtH	95 °C 2 min	94 °C 60 sec	58 °C 40 sec	72 °C 90 sec	72 °C 10 min	4 °C	35

ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส นำมาตรวจหายีนฟิมเอ และยีนพีอาร์ทีซี โดยวิธีพีซีอาร์แบบมัลติเพล็กซ์[15] โดยมีลำดับไพร์เมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1 และใช้เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33277 เป็นตัวสำหรับการควบคุมผลบวกกรณีตรวจพบเชื้อและยีนฟิมเอ และยีนพีอาร์ทีซี และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ

ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย นำมาตรวจหายีนพีอาร์ทีเอชด้วยวิธีพีซีอาร์พื้นฐาน[27] โดยมีลำดับไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1 และใช้เชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43037 เป็นตัวควบคุมผลบวกกรณีตรวจพบเชื้อและยีนพีอาร์ทีเอช และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ

ผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง 60 คน ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวทั่วไป 20 คน โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง 20 คน และโรคเหงือกอักเสบจำนวน 20 คน โดยกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังมีอายุเฉลี่ยมากที่สุด ส่วนกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวและกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบมีอายุเฉลี่ยใกล้เคียงกัน พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวมีค่าเฉลี่ยของร่องลึกปริทันต์มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง โดยค่าเฉลี่ยระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนระดับอนามัยช่องปากของผู้ป่วยทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบทั้งชนิดก้าวร้าวและเรื้อรัง มีระดับการอักเสบของเหงือกที่มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการตรวจหาเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวนั้นพบเชื้อ 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 80 ส่วนกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง พบเชื้อ 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 และกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบตรวจพบเชื้อ 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 45 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความชุกของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์ต่าง ๆ นั้น ตรวจพบซีโรไทป์เอ จำนวน 11 ตัวอย่าง ซีโรไทป์บี จำนวน 3 ตัวอย่าง ซีโรไทป์ซี จำนวน 20 ตัวอย่าง และซีโรไทป์เอฟ จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจหาซีโรไทป์ได้ จำนวน 2 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบซีโรไทป์ดี และอีในการศึกษาครั้งนี้

ในส่วนของยีนควบคุมการสร้างไซโตลีทัลดิสเทนดิงท็อกซิน ของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ตรวจพบเชื้อที่มีการสร้าง ซีดีทีเอ บี และซี ทั้ง 3 ยีนในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว 9 ตัวอย่าง กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง 4 ตัวอย่าง และกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 56.3 ร้อยละ 50 และ ร้อยละ 44.4 ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3 *ข้อมูลทั่วไป และข้อมูลทางปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่าง*

Table 3 *Demographic and periodontal characteristics of subjects*

	Aggressive periodontitis	Chronic periodontitis	Gingivitis	P value*
Mean age (years)	34.55 ± 9.33	52.89 ± 8.84	36.11 ± 17.6	0.00*
Mean clinical attachment level (mm.)	4.85 ± 1.66	4.35 ± 0.80	-	0.69
Mean pocket depth (mm.)	4.04 ± 0.71	3.64 ± 0.56	-	0.06
Mean bleeding index (%)	86.68 ± 16.70	87.38 ± 13.52	70.27 ± 23.22	0.04*
Mean plaque index (%)	78.14 ± 14.74	80.80 ± 13.17	82.80 ±13.56	0.54

* Mann Whitney U Test

ความชุกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ใกล้เคียงกันในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม โดยตรวจพบเชื้อนี้ จำนวน 17 ตัวอย่างในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว 15 ตัวอย่างในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังและ 17 ตัวอย่างในกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ คิดเป็นร้อยละ 85, 75 และ 85 ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การตรวจหายีนกำหนดการสร้างฟิมเบรีย (ฟิมเอยีน) และคอลลาจีเนส (พีอาร์ทีซียีน) ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส พบว่าผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบทั้งชนิดก้าวร้าวและชนิดเรื้อรัง รวมถึงผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ มักมีเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่มียีนทั้งสองชนิด (ร้อยละ 58.8, 80 และ 52.9 ตามลำดับ) รองลงมาคือ ตรวจพบเชื้อที่มีพีอาร์ทีซียีนเพียงอย่างเดียว และฟิมเอยีนเพียงอย่างเดียวตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนการตรวจหาเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียนั้น พบเชื้อในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวและโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังในทุกตัวอย่าง และพบในกลุ่มโรคเหงือกอักเสบ 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90

เมื่อทำการตรวจหายีนกำหนดการสร้างซิสเตอีนโปรตีเอส (พีอาร์ทีเอชยีน) ของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวตรวจพบพีอาร์ทีเอชยีน ร้อยละ 90 จากตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อนี้ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง และกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ ตรวจพบพีอาร์ทีเอชยีน ร้อยละ 80 และร้อยละ 72 ตามลำดับ โดยความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

บทวิจารณ์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย และยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อเหล่านี้ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีสภาวะปริทันต์ที่แตกต่างกัน

จากผลการตรวจหาเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวนั้นตรวจพบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ร้อยละ 80 ของจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ขณะกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังและกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบตรวจพบเพียง ร้อยละ 40 และ 45 ของจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ตามลำดับ ความชุกของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ที่พบนี้สอดคล้องกับการศึกษาส่วนใหญ่ที่มักมีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ได้สูงในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว[28,29] และตรวจพบความชุกได้ต่ำในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง[28,30] อย่างไรก็ดีมีบางศึกษาที่ไม่พบความแตกต่างของการตรวจพบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวและกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง[29,31]

สำหรับความชุกของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์ต่าง ๆ นั้น ตรวจพบซีโรไทป์ซีมากที่สุด รองลงมาคือ ซีโรไทป์เอและบี ส่วนซีโรไทป์เอฟนั้นตรวจพบเพียง 1 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาส่วนใหญ่ที่มักตรวจพบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์เอ บีและซี ได้มากกว่าซีโรไทป์อื่น[32-34] โดยการศึกษาในประเทศทางเอเชียนั้นส่วนใหญ่พบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์ซีมากกว่าซีโรไทป์อื่น[34-36] ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์ต่าง ๆ กับสภาวะปริทันต์ของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งตรงกับการศึกษาในกลุ่มประชากรทางภาคกลาง[37] และภาคใต้[34] ของประเทศไทย รวมไปถึงหลายการศึกษาที่ไม่พบความสัมพันธ์เช่นกัน[35,38]

ในการตรวจหายีนกำหนดการสร้างไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซินของเชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการตรวจพบยีนนี้ในกลุ่มตัวอย่างทั้งสามกลุ่ม อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวมีร้อยละของการตรวจพบยีนกำหนดการสร้างไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซินทั้งชนิด เอ บี ซีมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง และกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Tan และคณะที่พบความชุกของยีนกำหนดการสร้างไซโตลีธัลดิสเทนดิง

ท็อกซินในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซิน มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวมากกว่าชนิดเรื้อรัง[10] อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่พบยีนกำหนดการสร้างไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซิน สูงถึงร้อยละ 85 จากกลุ่มตัวอย่างจากประเทศบราซิล เคนยา ญี่ปุ่น และสวีเดน ที่มีสภาวะปริทันต์ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าการตรวจพบยีนกำหนดการสร้างไซโตลีธัลดิสเทนดิงท็อกซินนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับสภาวะปริทันต์[39]

ผลการศึกษาเกี่ยวกับความชุกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสามกลุ่ม เนื่องจากเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบทั้งชนิดก้าวร้าวและชนิดเรื้อรัง[40] นอกจากนี้เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ยังถูกตรวจพบได้ในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบเช่นกัน[41] กลุ่มตัวอย่างที่ถูกนำมาศึกษาครั้งนี้เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีระดับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงอาจมีผลต่อการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ

การตรวจหายีนกำหนดการสร้างฟิมเบรีย และยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์คอลลาจีเนสของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง ตรวจพบยีนกำหนดการสร้างฟิมเบรียร่วมกับยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์คอลลาจีเนส สูงถึงร้อยละ 80 ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวและกลุ่มตัวอย่างโรคเหงือกอักเสบ ตรวจพบความชุกของยีนทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันร้อยละ 58.8 และ 52.9 ตามลำดับ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสมีบทบาทต่อการเกิดและการดำเนินโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังมากกว่าโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว[3,4,42] นอกจากนี้ การศึกษาของ Wu และคณะ[15] พบว่าการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสร่วมกับยีนทั้งสองชนิดนี้สัมพันธ์กับความลึกของร่องลึกปริทันต์ และระดับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์อย่างมาก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มตัวอย่างมีค่าเฉลี่ยระดับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์สูง จึงอาจเพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อนี้ร่วมกับยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงทั้งสองชนิดร่วมกันในกลุ่มผู้ป่วยทั้งสามกลุ่ม อย่างไรก็ดี ฟิมเบรียที่ถูกตรวจพบในเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน คือ ฟิมเบรียชนิดที่ 1-5 และกลุ่มฟิมเบรียชนิดที่ 1b (type I-V, Ib) มีหลายการศึกษาพบว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 (type II) มีความสามารถในการเกาะและบุกรุกเข้าสู่ผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อในช่องปากได้ดี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่าฟิมเบรียชนิดอื่น จึงเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของฟิมเบรียนี้มีความสัมพันธ์ในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ[43-45] สำหรับฟิมเบียยีนที่ถูกนำมาศึกษาครั้งนี้ เป็นฟิมเบียยีนชนิดที่ 1 จึงอาจทำให้การศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบความสัมพันธ์กับระดับการทำลายของอวัยวะปริทันต์ได้

ด้านความชุกของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวและเรื้อรัง ตรวจพบเชื้อนี้ร้อยละ 100 ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบนั้นตรวจพบเชื้อนี้ร้อยละ 90 ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบความชุกของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียสูงเมื่อเทียบกับเชื้อก่อโรคปริทันต์ชนิดอื่น[4,46,47] นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพบเชื้อนี้ไม่สัมพันธ์กับสภาวะปริทันต์ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่เคยมีมาเช่นกัน[48]

เมื่อทำการตรวจหายีนกำหนดการสร้างซิสเตอีสโปรตีเอสของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย พบว่า ความชุกของการตรวจพบยีนนี้เป็นร้อยละ 90 ในกลุ่มโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว ร้อยละ 80 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง และร้อยละ 72.2 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ โดยความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวนั้นมีแนวโน้มของการตรวจพบยีนนี้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ซึ่งอาจแสดงถึงความสัมพันธ์ของเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย ที่มียีนกำหนดการสร้างซีสเตอีน โปรตีเอส กับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษาของ Tan และคณะ ที่พบว่าเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธียที่มียีนกำหนดการสร้างซีสเตอีน โปรตีเอส ถูกตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมากกว่ากลุ่มที่ไม่

เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[49] รวมถึงการศึกษาของ Hamlet และคณะ ที่พบว่าในกลุ่มผู้ที่ตรวจพบเชื้อแทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย ที่มียีนกำหนดการสร้างซีสเตอีน โปรตีเอสนั้น มีความสัมพันธ์กับการเกิดและการดำเนินโรคปริทันต์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ตรวจไม่พบยีนนี้[27,50] อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ van der Reijden และคณะ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบยีนนี้กับโรคปริทันต์อักเสบ[48]

การศึกษานี้มีข้อจำกัดของกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวเป็นโรคปริทันต์อักเสบที่พบได้น้อย โดยมีความชุกเพียงร้อยละ 0.1-0.2 ในประชากรคอเคเชียน และร้อยละ 1-5 ในกลุ่มประชากรแอฟริกันและแอฟริกันอเมริกัน[51] ส่วนในประชากรเอเชียนั้น Kowashi และคณะ[52] รายงานการสำรวจในกลุ่มนักศึกษามหาวิทยาลัยนางาซากิ ประเทศญี่ปุ่น พบเพียงร้อยละ 0.47[52] โดยยังไม่มีรายงานความชุกของโรคนี้ในประเทศไทย ดังนั้นการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าวจึงทำได้ยาก การเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้มากขึ้นอาจทำให้ทราบถึงบทบาทของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ทั้งสามชนิดรวมถึงยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรงที่มีผลต่อกระบวนการเกิดและการดำเนินโรคปริทันต์อักเสบอย่างชัดเจนต่อไป

ตารางที่ 4 *ความชุกของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ทั้ง 3 ชนิด และยีนกำหนดการสร้างปัจจัยความรุนแรง จำแนกตามชนิดของ โรคปริทันต์*

Table 4 *Prevalence of the three periodontal pathogens and virulence factor producing genes according to periodontal status*

	Aggressive periodontitis N (%)	Chronic periodontitis N (%)	Gingivitis N (%)	p value*
A. actinomycetemcomitans	16 (80)	8 (40)	9 (45)	0.011*
Serotype A	7	0	4	
Serotype B	0	2	1	
Serotype C	10	6	4	
Serotype D	0	0	0	
Serotype E	0	0	0	
Serotype F	1	0	0	
Non-serptypable	0	2	0	
Cdt a+ b+ c+	9 (56.2)	4 (50)	4 (50)	0.827
P. gingivalis	17 (85)	15 (75)	17 (85)	0.641
fimA+, *prtC*+	10 (58.8)	12 (80)	9 (52.9)	0.255
fimA+, *prtC*-	2 (11.8)	0 (0)	2 (11.8)	
fimA-, *prtC*+	5 (29.3)	2 (13.3)	5 (29.4)	
fimA-, *prtC*-	0 (0)	1 (6.7)	1 (5.9)	
T. forsythia	20 (100)	20 (100)	18 (90)	0.126
prtH+	18 (90)	16 (80)	13 (72.2)	0.374
Aa+ *Pg*+ *Tf*+	13 (65)	6 (30)	9 (45)	0.084

*Chi-square test

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยจากทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทุนสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทางคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อแอกกรีเกรทิแบคเทอร์ แอคติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ซีโรไทป์เอถึงเอฟ รวมถึงคำแนะนำด้านเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อจาก Professor Sirkka Asikainen and Elisabeth Granstrom (Institute of Odontology, Division of Oral Microbiology, Umea° University, Umea° , Sweden)

เอกสารอ้างอิง

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997; 14: 9-11.
2. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1(1): 879-925.
3. Alpagot T, Wolff LF, Smith QT, Tran SD. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. *J Clin Periodontol* 1996; 23(11): 982-988.
4. Papapanou PN, Teanpaisan R, Obiechina NS, et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(5): 345-352.
5. Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72(1): 1-10.
6. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75(8): 1077-1083.
7. Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in Bacteroides forsythus: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun* 2000; 68(8): 4611-4615.
8. Baehni PC, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol* 1981; 26(8): 671-676.
9. Smith JL, Bayles DO. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* 2006; 32(4): 227-248.
10. Tan KS, Song KP, Ong G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res* 2002; 37(4): 268-272.
11. Leung WK, Ngai VK, Yau JY, Cheung BP, Tsang PW, Corbet EF. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2005; 40(3): 258-268.
12. Fujiwara T, Nakagawa I, Morishima S, Takahashi I, Hamada S. Inconsistency between the fimbrilin gene and the antigenicity of lipopolysaccharides in selected strains of *Porphyromonas gingivalis. FEMS Microbiol Lett* 1994; 124(3): 333-341.
13. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20 Suppl 2: S304-307.
14. Wittstock M, Schmidt H, Flemmig TF, Karch H. Heterogeneity of the prtC gene of *Porphyromonas gingivalis. Oral Microbiol Immunol* 2000; 15(1): 33-39.
15. Wu YM, Yan J, Chen LL, Gu ZY. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans*

in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8(2): 121-131.

16. Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J. *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1987. 2(4): 152-157.
17. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134-144.
18. Tanner AC and Izard J. Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol 2000*. 2006. 42: 88-113.
19. Saito T, Ishihara K, Kato T, Okuda K. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from Bacteroides forsythus ATCC 43037 in Escherichia coli. *Infect Immun* 1997; 65(11): 4888-4891.
20. Tong DC, Rothwell BR. Antibiotic prophylaxis in dentistry: a review and practice recommendations. *J Am Dent Assoc* 2000; 131(3): 366-374.
21. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25(4): 229-235.
22. Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans:* polymerase chain reaction amplification of lktA-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(2): 105-110.
23. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacteroides forsythus in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod* 2003; 29(6): 390-393.
24. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(5): 2002-2005.
25. Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5375-5384.
26. Ahmed HJ, Svensson LA, Cope LD, et al. Prevalence of cdtABC genes encoding cytolethal distending toxin among Haemophilus ducreyi and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Med Microbiol* 2001; 50(10): 860-864.
27. Hamlet SM, Taiyeb-Ali TB, Cullinan MP, Westerman B, Palmer JE, Seymour GJ. *Tannerella forsythensis* prtH genotype and association with periodontal status. *J Periodontol* 2007; 78(2): 344-350.
28. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32(8): 860-866.
29. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006; 33(12): 869-877.
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): 122-129.
31. Gajardo M, Silva N, Gomez L, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 2005; 76(2): 289-294.
32. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* 1983; 41(1): 19-27.
33. Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6(2): 115-118.

34. Dahlen G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17(3): 137-142.
35. Mombelli A, Gmur R, Lang NP, Corbert E, Frey J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J Clin Periodontol* 1999; 26(8): 505-510.
36. Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22(3): 201-207.
37. Bandhaya P, Saraithong P, Likittanasombat K, Hengprasith B, Torrungruang K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. *J Clin Periodontol* 2012; 39(6): 519-525.
38. Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74(6): 803-814.
39. Fabris AS, DiRienzo JM, Wikstrom M, Mayer MP. Detection of cytolethal distending toxin activity and cdt genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17(4): 231-238.
40. da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2011; 56(9): 899-906.
41. Papapanou PN, Sellen A, Wennstrom JL, Dahlen G. An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(1): 24-29.
42. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3239-3242.
43. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res* 2004; 39(2): 136-142.
44. Beikler T, Peters U, Prajaneh S, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Caucasians. *Eur J Oral Sci* 2003; 111(5): 390-394.
45. Tamura K, Nakano K, Nomura R, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Japanese children and adolescents. *J Periodontol* 2005; 76(5): 674-679.
46. 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): 651-666.
47. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65(3): 260-267.
48. van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, Strooker H, van Winkelhoff AJ. prtH in *Tannerella forsythensis* is not associated with periodontitis. *J Periodontol* 2006; 77(4): 586-590.
49. 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.
50. Hamlet SM, Ganashan N, Cullinan MP, Westerman B, Palmer JE, Seymour GJ. A 5-year longitudinal study of *Tannerella forsythia* prtH genotype: association with loss of attachment. *J Periodontol* 2008; 79(1): 144-149.

51. Susin C, Haas AN, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2014; 65(1): 27-45.

52. Kowashi Y. Prevalence of juvenile periodontitis among students at Nagasaki University. *Adv Dent Res* 1988; 2(2): 395-396.