การประเมินการรั่วซึมแบคทีเรียของวัสดุอุดคลองรากฟันตามระยะเวลาโดยแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย

Evaluation of Bacterial Leakage of Root Canal Fillings over Time Using Modified Bacterial Leakage Model

อัญญรัตน์ แพงจันทร์[1], สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล[2], คุณเมตตจิตต์ นวจินดา[3]
[1]นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[2]สาขาวิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[3]สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
Anyarat Paengchan[1], Suttipalin Suwannakul[2], Khun Mettachit Nawachinda[3]
[1]Graduate student, Program in Endodontology, Department of Restorative Dentistry,
Faculty of Dentistry, Naresuan University
[2]Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University
[3]Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University

ชม. ทันตสาร 2561; 39(3) : 103-115
CM Dent J 2018; 39(3) : 103-115

Received : January 5, 2018
Revised : March 12, 2018
Accepted : April 10, 2018

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบการรั่วซึมของแบคทีเรียผ่านวัสดุอุดคลองรากฟันในระยะเวลาต่างกันโดยแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย

วิธีการศึกษา: ฟันกรามน้อยล่างแท้รากเดียว 170 ซี่ แบ่งเป็นกลุ่มทดลอง 6 กลุ่ม (กลุ่มละ 25 ซี่) กลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 ซี่) ประกอบแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย โดยทดสอบกับเชื้อเอนเทอโรคอกคัสฟีคาลิส สังเกตผลการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลอง

Abstract

Objective: To evaluate the bacterial leakage of root canal fillings over time using the modified bacterial leakage model.

Material and methods: One hundred and seventy mandibular premolars were divided into 6 experimental (n=25) and 2 control groups (n=10). 170 leakage apparatus were set up using Enterococcus faecalis as a microbial marker. The models were

Corresponding Author:

สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Suttipalin Suwannakul
Assistant Professor, Dr., Department of Preventive Dentistry,
Faculty of Dentistry, Naresuan University,
Phitsanulok, 65000, Thailand
E-mail: ***oomdent@hotmail.com***

ทุกวันเป็นระยะเวลา 7, 10, 15, 30, 45 และ 60 วัน ตรวจสอบแบคทีเรียที่พบบนพื้นผิวสัมผัสที่ผนังคลองรากฟันและในท่อเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ผลการศึกษา: กลุ่มควบคุมบวกพบว่าแบบจำลองขุ่นทั้งหมดโดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 กลุ่มทดลองพบเชื้อซึมผ่านออกไปนอกปลายรากฟัน 1 ซี่ในกลุ่ม 45 วัน (ร้อยละ 5.26) และไม่พบการขุ่นของแบบจำลองอื่นตลอดระยะเวลาติดตามผล ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบแบคทีเรียที่พื้นผิวสัมผัสระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุด และท่อเนื้อฟันข้างเคียงในคลองรากฟันส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลายในฟันที่ตรวจสอบทุกกลุ่ม

สรุป: แบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียพบเชื้อซึมผ่านออกไปนอกปลายรากฟันที่ได้รับการอุดเพียง 1 ซี่ในช่วงระยะเวลาติดตามผลตั้งแต่ 7 ถึง 60 วัน แต่ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบแบคทีเรียตลอดคลองรากฟันในทุกกลุ่มถึงแม้แบบจำลองไม่มีการขุ่นก็ตาม

คำสำคัญ: การรั่วซึมส่วนตัวฟัน การรั่วซึมระดับจุลภาค แบบจำลองการรั่วซึมแบคทีเรีย เอนเทอโรคอกคัส ฟีคาลิส

observed daily for turbidity of the broth in the middle and lower chambers for 7, 10, 15, 30, 45 and 60 days. The scanning electron microscope (SEM) was used to observe the presence of bacteria at the interface of the root canals.

Results: All six positive controls leaked after day 1, one obturated tooth of the 45-day group (5.26%) leaked, while the others showed no turbidity. The SEM images revealed bacteria accumulated at the interface between root canal wall and root canal fillings as well as in tubular dentine in all groups.

Conclusions: The modified bacterial leakage model showed only 1 obturated tooth leaked in the period from 7 to 60 days. However the SEM revealed that E. faecalis was present at the interface along the root even when the model did not show turbidity.

Keywords: coronal leakage, microleakage, bacterial leakage model, Enterococcus faecalis

บทนำ

การรั่วซึมในส่วนตัวฟัน (coronal leakage) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟัน[1,2] คลองรากฟันที่ได้รับการอุดเกิดการปนเปื้อนได้จากหลายสาเหตุ เช่น การบูรณะส่วนตัวฟันภายหลังการรักษาคลองรากฟันล่าช้า ความหนาของวัสดุอุดชั่วคราวที่เหลือไม่เพียงพอและเกิดการรั่วซึมได้ นอกจากนั้นการแตกหักของวัสดุบูรณะและตัวฟัน การเตรียมคลองรากฟันเพื่อเป็นที่อยู่ของเดือยฟัน (post space)[2] การมีรอยผุกลับซ้ำ (recurrent caries) จนถึงวัสดุอุดคลองรากฟัน วัสดุบูรณะหรือครอบฟันที่บริเวณขอบไม่แนบสนิทหรือไม่สามารถทนต่อแรงบดเคี้ยวได้ ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้ฟันที่ได้รับการรักษาคลองรากฟันแล้วมีการติดเชื้อกลับขึ้นใหม่[1,3] จากการติดตามผลการรักษาทางคลินิกและภาพถ่ายรังสีฟันที่มีคุณภาพของการรักษารากฟันที่ดีแต่มีการบูรณะส่วนตัวฟันที่ไม่เหมาะสม พบว่ามีการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายราก (apical periodontitis) ร้อยละ 29 จนถึงร้อยละ 55.9[4-6] และโอกาสในการหายของเนื้อเยื่อรอบปลายรากของฟันที่มีคุณภาพของการรักษารากฟันที่ดีร่วมกับการบูรณะส่วนตัวฟันที่เหมาะสมนั้นจะสูงกว่าฟันที่มีคุณภาพของการรักษาที่ดีเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง[7]

วิธีการตรวจสอบการรั่วซึมในฟันที่ได้รับการรักษารากฟันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สีย้อม (dye penetration) การใช้สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive isotope) การใช้แบคทีเรียหรือผลผลิตของเชื้อ (bacteria and

byproduct penetration) การเคลื่อนที่ของของเหลว (fluid filtration model) และวิธีการทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical)[8] แต่พบว่าผลของแต่ละวิธีไม่สัมพันธ์กัน นอกจากนั้น การประเมินการรั่วซึมของคลองรากฟันที่มีการสัมผัสกับสภาพแวดล้อมในช่องปากยังทำได้ยาก ต่อมาได้มีการนำแบบจำลองการรั่วซึมของแบคทีเรียและน้ำลาย ซึ่งเป็นการจำลองสถานการณ์ทางคลินิกที่เกิดขึ้นจริงมาใช้[9-11] วิธีการทดสอบการรั่วซึมด้วยแบคทีเรียโดยแบบจำลองแบบสองห้อง (two-chamber model) คิดค้นโดย Mortensen และคณะในปี 1965 และนำมาใช้ในการศึกษาการรั่วซึมทางเอ็นโดดอนติกส์โดย Goldman และคณะในปี 1980 แบบจำลองประกอบด้วยสองส่วน คือแบบจำลองส่วนบน/ส่วนปนเปื้อน (upper/ contaminated chamber) และแบบจำลองส่วนล่าง (lower chamber) ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อที่ซึมผ่านฟันออกไปนอกปลายราก รอยต่อระหว่างแบบจำลองส่วนบนกับฟันและแบบจำลองส่วนล่างผนึกด้วยขี้ผึ้งเหนียว (sticky wax) หรือกาวไซยาโนอะไครเลต (cyanoacrylate)[12] แต่การศึกษาโดยแบบจำลองการรั่วซึมแบคทีเรียแบบสองห้องพบว่ามีข้อผิดพลาดทางระบบ คือไม่สามารถควบคุมการรั่วซึมระหว่างส่วนบนและส่วนล่างของแบบจำลองได้ ทำให้ผลการศึกษาที่ผ่านมามีความแตกต่างกันมากและส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของการทดลอง[12] Lertjantarangkool[13] ได้ทำการปรับปรุงแบบจำลองแบบสองห้อง เรียกว่าแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย (modified bacterial leakage model) โดยเพิ่มแบบจำลองส่วนกลาง (middle chamber) ระหว่างรอยต่อของแบบจำลองส่วนบนและส่วนล่าง เพื่อให้สามารถตรวจสอบการรั่วที่เกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของฟันกับหลอดทดลองส่วนบน ทำให้สามารถคัดชิ้นงานที่มีการรั่วจากภายนอกฟันออกและได้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

ถึงแม้ว่ามีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการรั่วซึมในส่วนตัวฟันมากมาย[9,11,13-19] แต่เนื่องจากความแตกต่างของวิธีการศึกษาและผลการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้ข้อพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมในการรักษาคลองรากฟันซ้ำหลังจากมีการสัมผัสกับน้ำลายในช่องปากแตกต่างกันไป ระยะเวลาตั้งแต่เกิดการรั่วซึมของน้ำลายหรือแบคทีเรียจากส่วนตัวฟันจนถึงปลายรากฟันและก่อให้เกิดพยาธิสภาพซึ่งต้องทำการรักษาคลองรากฟันซ้ำยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนในปัจจุบัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรั่วซึมของเชื้อ *E. faecalis* ในคลองรากฟันที่ได้รับการอุดในระยะเวลาที่แตกต่างกันโดยใช้แบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมฟันที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (หมายเลขโครงการ 512/59) ฟันที่ใช้ในการศึกษาเป็นฟันกรามน้อยล่างแท้รากเดียว ปลายรากปิด ไม่มีรอยผุบริเวณรากฟันหรือรอยผุทะลุโพรงประสาทฟัน ไม่มีรอยร้าว ไม่มีการละลายตัวของผิวรากฟัน มีหนึ่งคลองรากตรวจสอบโดยภาพถ่ายรังสีในแนวใกล้แก้ม-ใกล้ลิ้น และแนวใกล้กลาง-ไกลกลาง มีความโค้งของรากฟันไม่เกิน 20 องศาโดยการวัดด้วยวิธีของ Schneider[20] จำนวน 170 ซี่ แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 (5.25% sodium hypoclorite; NaOCl) 40 นาที[21] ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที และเก็บฟันไว้ในสารละลายไทมอลความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (0.1% thymol solution) ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดลอง

คัดแยกฟันเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบอย่างละ 10 ซี่ ฟันที่เหลือ 150 ซี่จัดเป็นกลุ่มทดลอง 6 กลุ่ม กลุ่มละ 25 ซี่ ฟันกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มทดลองทำการกรอเปิดทางเข้าสู่คลองรากฟันให้ได้รูปร่างตามอุดมคติ โดยใช้หัวกรอกากเพชรรูปกลมและหัวกรอกากเพชรรูปสอบปลายทู่ ล้างคลองรากฟันด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 วัดความยาวทำงานโดยใช้ไฟล์ชนิดเค (K-Flexofile®, Densply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) ขนาด 10 ผ่านทะลุพอดีรูเปิดปลายรากฟัน ลดความยาว 1 มิลลิเมตรเพื่อใช้เป็นความยาวในการทำงาน ฟันที่มีรูเปิดปลายรากฟันกว้างโดยไฟล์ขนาด 30 เกินออกไปนอกรูเปิดปลายรากฟันจะถูกคัดออกและเตรียมฟันใหม่ทดแทน ทำการขยายคลองรากฟันด้วยไฟล์ชนิดเคจนถึงเบอร์ 40 เป็นมาสเตอร์เอพิคัลไฟล์ (master apical file; MAF) จากนั้นขยายคลองรากฟันด้วยวิธีสเตปแบค (step-back technique)[22] จนถึงไฟล์ขนาด 70 ล้างคลองรากฟัน

ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนขนาดเครื่องมือ นำฟันทั้งหมดที่ขยายคลองรากฟันเรียบร้อยแล้วมาลองกัตทาเพอร์ชาแท่งเอก (master cone) โดยกัตทาเพอร์ชาแท่งเอกต้องมีความแนบบริเวณปลายรากอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร และมีความยาวเท่ากับความยาวทำงาน ตรวจสอบจากการมีแรงต้านขณะดึงขึ้น (tug back) และการถ่ายภาพรังสี ล้างคลองรากฟันครั้งสุดท้ายด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามด้วย อีดีทีเอ (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 17 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดชั้นสเมียร์ (smear layer)[23] ซับคลองรากให้แห้งด้วยแท่งกระดาษซับ จากนั้นนำฟันทั้งหมดทำให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องอบฆ่าเชื้อชนิดอุณหภูมิต่ำด้วยแก๊สเอทิลีน ออกไซด์ (ethylene oxide) ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

การอุดคลองรากฟันทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในตู้กรองอากาศ (laminar air flow cabinet) ฟันกลุ่มทดลองที่ลองแท่งกัตทาเพอร์ชาแท่งเอก อุดคลองรากฟันด้วยกัตทาเพอร์ชา (Densply Maillefer, Tulsa, OK, USA) และรูตคะแนลซีลเลอร์ชนิดเอเอชพลัส (AH Plus, Densply De Trey, Konstanz, Germany) ด้วยวิธีแลตเทอรัลคอมแพคชั่น (lateral compaction)[24] ตัดกัตทาเพอร์ชาด้วยความร้อนและใช้รูตคะแนลพลักเกอร์กดอัดกัตทาเพอร์ชาในแนวดิ่งให้แน่นที่ระดับรอยต่อระหว่างเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (CEJ) ปรับความยาวของวัสดุอุดให้เท่ากับ 12 มิลลิเมตร ตรวจสอบความแน่นของวัสดุอุดคลองรากฟันด้วยการถ่ายภาพรังสีในแนวด้านแก้ม-ด้านลิ้น และด้านใกล้กลาง-ไกลกลาง โดยถ่ายภาพรังสีขณะฟันอยู่ในหลอดทดลองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว กลุ่มควบคุมบวกลองกัตทาเพอร์ชาแท่งเอกและอุดคลองรากฟันด้วยวิธีเดียวกันโดยไม่ใช้รูตคะแนลซีลเลอร์ หลังจากอุดคลองรากฟันแล้วนำฟันทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองเก็บในผ้าโปร่งชุบน้ำเกลือ เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้รูตคะแนลซีลเลอร์แข็งตัวเต็มที่และหมดฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ[25]

การเตรียมแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย

เตรียมแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมของแบคทีเรียตามการศึกษาของ Lertjantarangkool[13] ดังนี้ แบบจำลองส่วนบน นำหลอดเซ็นทริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ตัดบริเวณส่วนปลายออก กรอแต่งให้พอดีกับส่วนป่องสุดของฟันแต่ละซี่ เพื่อให้สามารถใส่ฟันที่เตรียมไว้ผ่านส่วนบนของหลอดแล้วส่วนรากฟันทั้งหมดยื่นออกมาด้านนอก นำหลอดเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรตัดส่วนกลางของหลอดที่บริเวณระดับมาตรวัด 25 มิลลิลิตร กรอแต่งส่วนปลายหลอดให้พอดีกับบริเวณกึ่งกลางของรากฟันเพื่อใช้เป็นแบบจำลองส่วนกลาง ส่วนอีกครึ่งหนึ่งของหลอดที่ถูกตัดพร้อมฝาจะนำมาใช้เป็นแบบจำลองส่วนล่าง และเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตรใต้ต่อขอบหลอดประมาณ 7 มิลลิเมตร ซึ่งรูเปิดนี้ใช้ในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าและออกจากหลอดทดลองล่าง และเตรียมฝาปิดของหลอดทดลองกลางโดยกรอฝาปิดหลอดเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรตรงกลางให้เป็นรูปวงกลมขนาดพอดีกับหลอดทดลองบน เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตรที่ด้านข้างเพื่อใช้ในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าและออกจากแบบจำลองส่วนกลาง

แบบจำลองแต่ละชุดประกอบด้วย 1) หลอดทดลองบนพร้อมฝา 2) หลอดทดลองกลางพร้อมฝา 3) หลอดทดลองล่างพร้อมฝา นำอุปกรณ์ทั้งหมดบรรจุซองปลอดเชื้อเพื่อนำไปอบฆ่าเชื้อโดยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

ประกอบแบบจำลองด้วยความระมัดระวังภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในตู้กรองอากาศ โดยนำฟันทั้งหมดผึ่งผิวรากฟันให้แห้งแล้วเคลือบยาทาเล็บ (Revlon Inc., New York, NY, USA) สองชั้นโดยรอบ เว้นระยะ 3 มิลลิเมตรจากปลายรากฟัน โดยทาน้ำยาเคลือบเล็บลักษณะนี้เหมือนกันทั้งในกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบ[12] นำหลอดทดลองบนยึดกับฟันบริเวณคอฟันด้วยขี้ผึ้งเหนียวและกาวไซยาโนอะไครเลตทาทับบนขี้ผึ้งเหนียวและโดยรอบรอยต่อทิ้งไว้ให้กาวแห้งข้ามคืน จากนั้นนำหลอดทดลองส่วนกลางพร้อมฝาปิดประกอบเข้ากับหลอดทดลองส่วนบนและทิ้งไว้ให้กาวแห้งข้ามคืน จากนั้นนำแบบจำลองส่วนบนและส่วนกลางที่ยึดกับฟันเรียบร้อยแล้วมาประกอบกับหลอดทดลอง

ล่าง ยึดปิดรอยต่อระหว่างหลอดทั้งสองด้วยขี้ผึ้งเหนียวและกาวไซยาโนอะไครเลต บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (brain heart infusion broth; BHI broth) ในหลอดทดลองกลางและล่างผ่านรูเปิดที่เตรียมไว้ โดยให้ปลายรากฟันอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ปิดรอยต่อของแบบจำลองทั้งหมดและฝาปิดด้วยพาราฟิน (paraffin) จะได้แบบจำลองที่เตรียมสำเร็จแล้วดังภาพที่ 1 จากนั้นนำแบบจำลองทั้งหมดมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 2 วัน เพื่อทดสอบความปราศจากเชื้อ แบบจำลองที่พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นจะถูกคัดออกจากการทดลอง

รูปที่ 1 *แบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียประกอบด้วย 3 ส่วน แบบจำลองส่วนบนบรรจุสารละลายเชื้อ E. feacalis แบบจำลองส่วนกลางและแบบจำลองส่วนล่างบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน*

Figure 1 *The modified bacterial leakage model consists of 3 chambers. The upper chamber is filled with E. faecalis culture, the middle and lower chambers contain the BHI broth.*

การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบ คือเชื้อ *E. faecalis* (สายพันธุ์ ATCC 29212) จัดซื้อจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปรับค่าความขุ่นมาตรฐาน (optional density; OD) เท่ากับ 0.10 วัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งจะได้สารละลายที่มีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/mL[26]

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองบนซึ่งอยู่ส่วนบนสุดของแบบจำลอง นำแบบจำลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองบนจะถูกเปลี่ยนทุก 7 วันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

การทดลองแบ่งกลุ่มตามระยะเวลาที่ติดตามผลดังนี้ กลุ่มทดลอง กลุ่มที่ 1 ระยะเวลา 7 วัน กลุ่มที่ 2 ระยะเวลา 10 วัน กลุ่มที่ 3 ระยะเวลา 15 วัน กลุ่มที่ 4 ระยะเวลา 30 วัน กลุ่มที่ 5 ระยะเวลา 45 วัน กลุ่มที่ 6 ระยะเวลา 60 วัน กลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบ ระยะเวลา 60 วัน

การติดตามผลการทดลองจะสังเกตและบันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง โดยสังเกตและบันทึกผลการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองกลางและหลอดทดลองล่าง การเตรียมการทดลองและอ่านผลทำโดยผู้ทดลองคนเดียวตลอดการทดลอง ถ้ามีการขุ่นในหลอดทดลองกลางจะบ่งบอกว่ามีการรั่วซึมเกิดขึ้นระหว่างแบบจำลองส่วนบนและส่วนกลาง ซึ่งแบบจำลองที่ขุ่นนี้จะถูกคัดออกจากการทดลองและไม่เตรียมแบบจำลองใหม่ขึ้นมาทดแทน

เมื่อพบว่าหลอดทดลองล่างขุ่นจะตรวจสอบโดย นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขุ่นเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น (brain heart infusion agar; BHI agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูลักษณะของเชื้อบนอาหารวุ้น จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *E. feacalis* โดยการย้อมสี (gram stain) และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเบรนฮาร์ทอินฟิวชันที่มีสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5 (6.5% NaCl BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลองในแต่ละกลุ่ม หลอดทดลองกลางและหลอดทดลองล่างที่อาหารเลี้ยงเชื้อ

ยังคงใสจะถูกนำไปเพาะเชื้อเพื่อยืนยันผลด้วยวิธีการเดียวกัน การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM)

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาติดตามผลในแต่ละกลุ่ม สุ่มเลือกฟันในกลุ่มควบคุมบวกและควบคุมลบอย่างละ 1 ซี่ ฟันจากแบบจำลองที่ยังคงใสตลอดระยะเวลาสังเกตกลุ่มละ 3 ซี่ และฟันที่มีการซึมผ่านของเชื้อออกไปนอกปลายรากฟัน ซึ่งพบการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนล่าง เพื่อนำไปตรวจสอบแบคทีเรียที่พบในคลองรากฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำฟันมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline; PBS) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้นใช้หัวกรอกากเพชรรูปจาน (diamond disc) กรอผิวฟันด้านใกล้แก้มและด้านใกล้ลิ้นในแนวยาว (longitudinal section) โดยให้อยู่กึ่งกลางของด้าน ด้านละ 1 แนว ระวังไม่ให้กรอถึงคลองรากฟัน ล้างฟันด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อีกครั้ง แบ่งฟันออกเป็น 2 ส่วนโดยใช้สิ่วและค้อน ฟันแต่ละซี่จะเลือกครึ่งที่มีความสมบูรณ์มากกว่ามาตรวจสอบ

นำชิ้นฟันตัวอย่างแช่สารละลายกลูทาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (2.5% glutaraldehyde) ตามด้วยสารละลายออสเมียม เททร็อกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 (2% osmium tetroxide in PB) จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปขจัดน้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 70, 80, 90 และ 100 ตามลำดับ ทำให้แห้งโดยแช่ในสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ต่อเฮกซะเมทิลไดซิลาเซน (hexamethyldisilazene: HMDS) อัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ จากนั้นแช่เฮกซะเมทิลไดซิลาเซนทิ้งไว้ข้ามคืนจนชิ้นงานแห้ง นำชิ้นงานเคลือบผิวหน้าด้วยทอง เก็บในตู้ดูดความชื้นก่อนนำไปตรวจสอบแบคทีเรียบนพื้นผิวผนังคลองรากฟันและท่อเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (LEO1455vp, LEO Electron, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) ภายใต้กำลังขยายสูง 1000 3000 และ 5000 เท่า ที่ระดับคอฟัน (cervical) กลางรากฟัน (middle) และปลายรากฟัน (apical) บริเวณละ 9 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบการรั่วซึมแบคทีเรีย

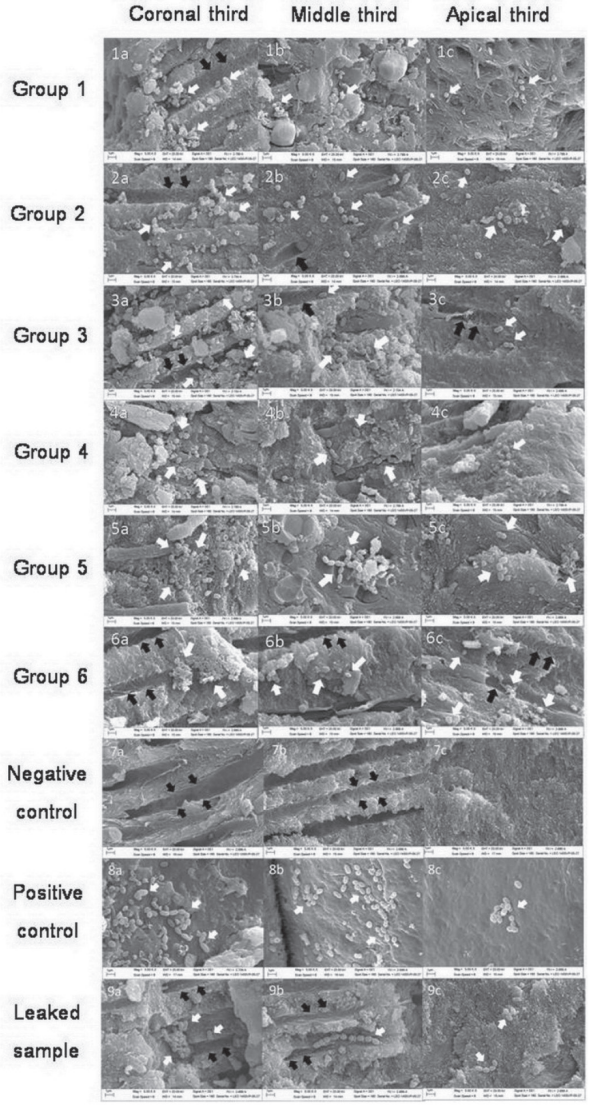
แบบจำลองที่ประกอบเรียบร้อยแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 2 คืน ก่อนเริ่มการทดลอง พบอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นทั้งในหลอดทดลองส่วนกลาง และ/หรือหลอดทดลองส่วนปลายซึ่งแสดงถึงการปนเปื้อนขณะประกอบแบบจำลองและถูกคัดออก 34 ชิ้น คงเหลือแบบจำลองที่ปราศจากการปนเปื้อนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง 136 ชิ้น

แบบจำลองที่เหลือ 136 ชิ้นติดตามผลเป็นระยะเวลา 7, 10, 15, 30, 45 และ 60 วัน ระหว่างติดตามผลพบอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองกลางมีการขุ่นในขณะที่หลอดทดลอง

ตารางที่ 1 *การรั่วซึมของคลองรากฟันที่ได้รับการอุดภายหลังสัมผัสเชื้อเอนเทอโรคอกคัส ฟีคาลิสตามระยะเวลา*

Table 1 *The leakage of the obturated root canal after exposed to E. faecalis over time.*

Control/ test group	Observation Period (days)	n	No leakage (%)	Leakage (%)	Range (days)
Group 1	7 days	18	18 (100)	0 (0)	
Group 2	10 days	19	19 (100)	0 (0)	
Group 3	15 days	19	19 (100)	0 (0)	
Group 4	30 days	17	17 (100)	0 (0)	
Group 5	45 days	19	18 (94.74)	1 (5.26)	Day 44
Group 6	60 days	17	18 (100)	0 (0)	
Negative control	60 days	8	8 (100)	0 (0)	
Positive control	60 days	6	0 (0)	6 (100)	1,2,5,22



รูปที่ 2 *ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนส่องกราดแสดงเชื้อเอนเทอโรคอกคัส ฟีคาลิส (ลูกศรสีขาว) ที่รอยต่อระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุด และที่ท่อเนื้อฟัน (ลูกศรสีดำ) ในบริเวณคลองรากฟันส่วนต้น (a) ส่วนกลาง (b) และส่วนปลาย (c) ของกลุ่มทดลอง (กลุ่ม 1-6) กลุ่มควบคุมบวก และฟันที่เชื้อซึมผ่านออกไปนอกปลายรากฟัน ส่วนกลุ่มควบคุมลบไม่พบแบคทีเรียในท่อเนื้อฟัน ภายใต้กำลังขยาย 5000 เท่า*

Figure 2 *The SEM images show E. faecalis (white arrows) present at the interface between the root canal wall and the root canal filling as well as in the dentinal tubules (black arrows) of the coronal (a), middle (b) and apical (c) parts of the root of Groups 1-6, the positive control and the tooth that had turbidity in the lower chamber. The SEM images show no bacterial present in the negative control (5000x magnification).*

ล่างยังคงใสอยู่ ซึ่งแสดงถึงการรั่วระหว่างรอยต่อของแบบจำลองส่วนบนซึ่งมีเชื้อ *E. faecalis* และแบบจำลองส่วนกลางจำนวน 13 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 9.56 แบบจำลองที่พบการรั่วซึมในหลอดทดลองกลางถูกคัดออกจากการทดลอง

ผลการทดลองโดยแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรีย พบว่าในกลุ่มที่ 1, 2, 3, 4, และ 6 และกลุ่มควบคุมลบ อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองกลางและล่างยังคงใสตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง พบการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองล่างในกลุ่มที่ 5 ซึ่งติดตามผลเป็นระยะเวลา 45 วันจำนวน 1 ชิ้นคิดเป็นร้อยละ 5.26 ในขณะที่กลุ่มควบคุมบวกซึ่งอุดคลองรากฟันโดยไม่ใช้รูตคะแนลซีลเลอร์นั้นพบว่าหลอดทดลองล่างขุ่นทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 22 ดังตารางที่ 1

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาติดตามผล นำอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนกลางและส่วนล่างเพาะในอาหารวุ้น จากนั้นทดสอบด้วยการย้อมแกรมและการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อจากแบบจำลองส่วนล่างของกลุ่มควบคุมบวกและแบบจำลองที่มีการขุ่นในกลุ่มที่ 5 นั้นพบเชื้อเจริญบนอาหารวุ้น มีลักษณะโคโลนีสีขาวค่อนข้างกลม ย้อมติดสีม่วง และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อ *E. faecalis* แต่อาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดทดลองส่วนกลางที่ใสนั้นไม่พบเชื้อบนอาหารวุ้นเลย สำหรับกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มทดลองที่เหลือซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงใสตลอดระยะเวลาติดตามผล ไม่พบเชื้อเจริญบนอาหารวุ้นเช่นกัน ในขณะที่แบบจำลองที่หลอดทดลองกลางขุ่นซึ่งถูกคัดออกนั้น เมื่อลองนำมาเพาะเชื้อพบว่าเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้นมีลักษณะเช่นเดียวกันกับที่พบในกลุ่มควบคุมบวก

ผลการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาศึกษา สุ่มฟันในกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมลบอย่างละ 1 ซี่ กลุ่มทดลองกลุ่มละ 3 ซี่ ตรวจสอบโดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบแบคทีเรียรูปร่างค่อนข้างกลมอยู่บนพื้นผิวสัมผัส (interface) ระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุดในกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม โดยจะพบเชื้อมากที่ระดับคลองรากฟันส่วนต้นและส่วนกลาง สำหรับคลองรากฟันส่วนปลายพบเชื้อเช่นเดียวกันแต่น้อยกว่าคลองรากฟันส่วนบน รวมทั้งยังพบเชื้อที่ท่อเนื้อฟันด้านข้างของผนังคลองรากฟันทั้งสองข้างด้วย สำหรับฟันที่เชื้อมีการซึมผ่านออกไปนอกปลายรากฟันนั้นพบแบคทีเรียตลอดคลองรากฟันในลักษณะเดียวกันกับที่พบในกลุ่มทดลอง ส่วนกลุ่มควบคุมลบไม่พบแบคทีเรียตลอดคลองรากฟันที่ทำการตรวจสอบ (รูปที่ 2)

บทวิจารณ์

การศึกษานี้แสดงผลการแทรกซึมของแบคทีเรียผ่านวัสดุอุดคลองรากฟันโดยใช้แบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียที่ระยะเวลาตั้งแต่ 7 ถึง 60 วัน ฟันที่อุดโดยไม่ใช่รูตคะแนลซีลเลอร์ในกลุ่มควบคุมบวกพบอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนล่างมีการขุ่นตั้งแต่วันที่ 1 ซึ่งเป็นการยืนยันผลการศึกษาของ Torabinejad และคณะ[11] และ Khayat และคณะ[9] ว่ารูตคะแนลซีลเลอร์ช่วยเพิ่มความแนบสนิทของการอุดคลองรากฟัน (apical seal) ในขณะที่กลุ่มควบคุมลบซึ่งเป็นฟันที่ไม่ได้กรอเปิดทางเข้าสู่คลองรากฟันไม่มีการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลอง เป็นการยืนยันว่าแบบจำลองไม่มีการปนเปื้อนตลอดการทดลอง

การศึกษาการรั่วซึมของคลองรากฟันที่ได้รับการอุดที่ผ่านมานั้นใช้แบบจำลองการรั่วซึมแบคทีเรียแบบสองห้องซึ่งแต่ละการศึกษาให้ผลที่แตกต่างกัน[16-18,27] เนื่องจากการออกแบบการทดลองมีความแตกต่างทั้งในแง่ของวัสดุและวิธีการอุดคลองรากฟัน แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ รวมทั้งผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกันมากและนำมาเปรียบเทียบกันได้ยาก การทบทวนอย่างเป็นระบบพบว่าการทดลองที่ผ่านมายังมีการออกแบบกลุ่มควบคุมลบไม่เหมาะสมเพียงพอและการแทรกซึมของแบคทีเรียในการทดลองสามารถเกิดขึ้นผ่านรอยต่อระหว่างฟันและแบบจำลองส่วนบนนอกเหนือจากผ่านทางคลองรากฟันที่ได้รับการอุด อีกทั้งผลการรั่วซึมที่ได้จากแบบจำลองเป็นผลทางจุลชีววิทยา (microbiology) ซึ่งเป็นวิธีที่ไวต่อการทดสอบมากกว่าวิธีการทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histology) และพบว่าไม่สอดคล้องกับผลการสังเกตที่พบทางคลินิก[12]

การศึกษานี้ใช้แบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียตามการศึกษาของ Lertjantarangkool[13] ซึ่งทำการปรับปรุงแบบจำลองแบบสองห้อง โดยเพิ่มแบบจำลองส่วนกลาง (middle chamber) ระหว่างรอยต่อของแบบจำลองส่วนบนและส่วนล่าง เพื่อตรวจจับการรั่วของแบคทีเรียผ่านรอยต่อระหว่างหลอดทดลองส่วนบนกับฟัน ผลการศึกษานี้พบว่าแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียสามารถตรวจจับการขุ่นในหลอดทดลองส่วนกลาง 13 ชิ้นจากแบบจำลองทั้งหมด 136 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 9.55 และพบการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนล่างเพียง 1 ชิ้นในกลุ่มที่ติดตามผลระยะเวลา 45 วัน คิดเป็นร้อยละ 5.26 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lertjantarangkool[13] ที่สามารถตรวจจับการรั่วซึมที่แบบจำลองส่วนกลางได้ร้อยละ 11.11 และมีการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองล่างเพียง 1 ซี่ (ร้อยละ 6.25) ในคลองรากฟันที่ได้รับการอุดซึ่งมีการสัมผัสเชื้อเป็นระยะเวลา 60 วัน ถึงแม้ว่าการศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับแบบจำลองแบบสองห้องเดิม แต่การพบอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนกลางขุ่นในขณะที่แบบจำลองส่วนล่างยังคงใสอยู่นั้น แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองดัดแปลงนี้สามารถตรวจจับการรั่วของแบบจำลองนอกตัวฟันได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Rechenberg และคณะซึ่งพบแบคทีเรียที่รอยต่อระหว่างชั้นเคลือบฟันและขี้ผึ้งเหนียวที่ใช้ยึดฟันกับแบบจำลองแบบสองห้อง โดยพบเชื้อที่บริเวณนี้ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมลบซึ่งแสดงว่าการรั่วของแบบจำลองเกิดขึ้นที่ภายนอกรากฟัน[28]

เมื่อพิจารณาการศึกษาก่อนหน้าที่มีการออกแบบการทดลองที่คล้ายกัน คือใช้แบบจำลองแบบสองห้องตรวจสอบการรั่วซึมของวัสดุอุดคลองรากฟันกัตทาเพอร์ชาร่วมกับรูตคะแนลซีลเลอร์ชนิดเอเอชพลัสภายหลังสัมผัสเชื้อ

E.feacalis ที่ผ่านมา ผลการศึกษาจะรายงานการขุ่นของแบบจำลองส่วนล่างตั้งแต่ร้อยละ 25 จนถึง 100 ในระยะเวลา 30 และ 60 วัน[17,18,29,30] เช่น การศึกษาของ Timpawat และคณะพบการขุ่นของแบบจำลองส่วนล่างภายหลังวัสดุอุดคลองรากฟันมีการสัมผัสเชื้อร้อยละ 25 ในระยะเวลา 30 วัน และร้อยละ 31.3 ที่ระยะเวลา 60 วัน[17] Yücel และคณะพบแบบจำลองเริ่มเกิดการขุ่นตั้งแต่วันที่ 3 โดยพบแบบจำลองมีการขุ่นร้อยละ 85 ในระยะเวลา 30 วัน และเกิดการขุ่นของแบบจำลองส่วนล่างทั้งหมดในระยะเวลา 60 วัน[18] จะเห็นว่าจำนวนร้อยละของแบบจำลองแบบสองห้องเดิมที่อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการขุ่นนั้นมากกว่าการทดลองนี้ เนื่องมาจากแบบจำลองดัดแปลงที่ใช้สามารถตรวจจับการขุ่นของหลอดทดลองส่วนกลางและคัดออกจากการทดลอง ดังนั้นผลการศึกษาการรั่วซึมของฟันที่ได้รับการอุดโดยแบบจำลองแบคทีเรียแบบสองห้องที่ผ่านมาอาจเกิดจากการรั่วซึมของแบบจำลองด้วยส่วนหนึ่ง และการรั่วซึมผ่านคลองรากฟันที่แท้จริงอาจเกิดขึ้นน้อยกว่าที่รายงาน

ผลการศึกษาการรั่วซึมของวัสดุอุดคลองรากฟันโดยแบบจำลองการรั่วซึมแบคทีเรียที่ผ่านมาเป็นการสังเกตผลทางจุลชีววิทยาจากการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนล่าง แต่ความลึกของการแทรกซึมของแบคทีเรียเข้าไปในท่อเนื้อฟันนั้นขึ้นกับระยะเวลาในการบ่ม (incubation time) ธรรมชาติของผิวฟัน (nature of dentine surface) และสภาวะของท่อเนื้อฟัน[31] จึงออกแบบการทดลองโดยให้ฟันมีการสัมผัสเชื้อในระยะเวลาที่แตกต่างกันและตรวจสอบการแทรกซึมของเชื้อจากส่วนตัวฟันไปยังส่วนปลายรากฟันในแต่ละระยะเวลาด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลจากแบบจำลองในการศึกษานี้พบว่ามีการแทรกซึมของแบคทีเรียผ่านวัสดุอุดคลองรากฟันที่มีการสัมผัสเชื้อเพียง 1 ชิ้นงานในระยะเวลาติดตามผลตั้งแต่ 7 ถึง 60 วัน อาจเนื่องมาจากการศึกษานี้เลือกใช้เฉพาะฟันที่มีการอุดคลองรากฟันได้แนบสนิท (hermatic seal) ซึ่งตรวจสอบด้วยภาพถ่ายรังสีทั้งด้านใกล้กลาง-ไกลกลาง และด้านใกล้แก้ม-ใกล้ลิ้น ส่วนการพบแบคทีเรียแทรกซึมผ่านออกไปนอกปลายรากฟันและทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองส่วนล่างขุ่นจำนวน 1 ชิ้นนั้นอาจเนื่องจากจากความไม่แนบสนิทของวัสดุอุดคลองรากฟันและรูตคะแนลซีลเลอร์ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้จากภาพถ่ายรังสีทำให้เกิดช่องว่างซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียสามารถแทรกซึมผ่านช่องว่างเหล่านี้ออกไปยังนอกปลายรากฟันได้[27]

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของฟันซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มที่มีระยะเวลาติดตามผล 7 ถึง 60 วันนั้น พบแบคทีเรียบนพื้นผิวสัมผัสผนังคลองรากฟันและภายในท่อเนื้อฟันด้านข้างของคลองรากฟันส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย ถึงแม้ว่าฟันที่นำมาตรวจสอบจะไม่พบการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองส่วนล่างก็ตาม แสดงให้เห็นว่าผลจากแบบจำลองการรั่วซึมแบคทีเรียและผลทางจุลชีววิทยาไม่สัมพันธ์กัน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษา ของ Brosco และคณะในปี 2010 ซึ่งติดตามผลการรั่วซึมไปยังปลายรากฟันของเชื้อ *E. faecalis* ในระยะเวลา 120 วัน พบแบบจำลองส่วนล่างขุ่นทั้งหมด 50 ชิ้นจาก 154 ชิ้น (ร้อยละ 32.4) แต่เมื่อนำไปตรวจสอบทางจุลชีววิทยาด้วยการย้อมสีบราวน์แอนด์เบรนน์ (Brown and Brenn) กลับพบแบคทีเรียในคลองรากฟันถึง 188 ซี่คิดเป็นร้อยละ 76.6[32] และการศึกษาของ Kwang และ Abbott ซึ่งใช้แบบจำลองแบบสองห้องติดตามผลระยะเวลา 90 วัน พบว่าแบบจำลองส่วนล่างขุ่น 8 ชิ้นจากทั้งหมด 16 ชิ้น (ร้อยละ 50) แต่เมื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Streptococcus gordonii* ที่ปรากฏในคลองรากฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบแบคทีเรียที่ผิวสัมผัสระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุด รวมทั้งท่อเนื้อฟันข้างเคียงจำนวน 9 ซี่จากฟันที่นำมาตรวจสอบ 10 ซี่[33] แสดงว่าแบบจำลองที่ไม่มีการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งนิยามว่าเป็นแบบจำลองไม่พบการซึมผ่านของแบคทีเรียออกไปนอกปลายรากฟัน แต่ในความเป็นจริงแล้วยังคงพบแบคทีเรียภายในคลองรากฟันจากการตรวจสอบด้วยวิธีการอื่น[32] การพบเชื้อบนพื้นผิวผนังคลองรากฟันและท่อเนื้อฟันข้างเคียงแสดงให้เห็นว่าเมื่อแบคทีเรียแทรกซึมไปตามรอยต่อระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุดคลองรากฟันแล้ว จะสามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟันข้างเคียงได้[33] ซึ่งการพบเชื้อแบคทีเรียในท่อเนื้อฟันนั้นส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากการกำจัดชั้นสเมียร์ มีการศึกษาพบว่าในฟันที่ทำการกำจัดชั้นสเมียร์นั้น เชื้อ *E. faecalis* จะสามารถแทรกซึมจาก

คลองรากฟันเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ 300-400 ไมครอน[34] อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบแบคทีเรียในคลองรากฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดซึ่งมีกำลังขยายสูง สามารถตรวจสอบรูปร่างลักษณะ (morphology) ของแบคทีเรียได้ชัดเจนกว่าการตรวจสอบโดยการใช้สีย้อม แต่ทั้งสองวิธีก็ยังไม่สามารถบอกถึงความมีชีวิตของเชื้อที่พบได้[33] ดังนั้นยังไม่สามารถทราบได้ว่าแบคทีเรียที่ปรากฏในคลองรากฟันในแต่ละระยะเวลาที่ทำการศึกษานั้นเป็นแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่หรือไม่

ในทางคลินิก Ricucci และคณะ ในปี 2009 พบว่าฟันที่มีการรั่วซึมในส่วนตัวฟันสัมพันธ์กับการพบเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟันส่วนต้น แต่ไม่จำเป็นว่าจะต้องพบเชื้อในคลองรากฟันส่วนปลายทั้งหมด โดยฟันที่เกิดการรั่วซึมในส่วนตัวฟันเนื่องจากฟันหรือวัสดุบูรณะแตกหักหรือเกิดการผุซ้ำเป็นเวลานานจำนวน 49 ซี่ พบแบคทีเรียอยู่เฉพาะบริเวณหนึ่งส่วนสามของคลองรากฟันส่วนต้นและท่อเนื้อฟันข้างเคียง มีเพียง 1 ซี่ที่พบแบคทีเรียที่คลองรากฟันส่วนปลายด้วย แต่พบการตอบสนองต่อการอักเสบ (mild inflammatory response) ในเนื้อเยื่อปลายรากฟันได้ถึงหนึ่งในสามของฟันที่ตรวจสอบทั้งหมด[35] เช่นเดียวกับอีกการศึกษาของ Ricucci และคณะในปี 2003 พบว่าฟันของผู้ป่วยที่มีการรั่วซึมในส่วนตัวฟันตั้งแต่ 3 เดือนขึ้นไป จำนวน 32 ซี่พบแบคทีเรียที่คลองรากฟันส่วนต้นจำนวนมาก แต่พบเชื้อในคลองรากฟันส่วนกลางและส่วนปลายเพียง 2 ซี่เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามมีฟันจำนวน 7 ซี่ที่พบเซลล์อักเสบมารวมตัวกันอยู่ที่บริเวณปลายรากฟัน[36] ถึงแม้ว่าในทางคลินิกแล้ว คลองรากฟันที่วัสดุอุดมีการสัมผัสเชื้อระยะเวลาหนึ่งจะยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันในภาพถ่ายรังสี และไม่พบแบคทีเรียแทรกซึมไปยังคลองรากฟันส่วนปลายหรือออกนอกปลายรากฟันดังที่พบในการศึกษาการรั่วซึมต่าง ๆ ก็ตาม แต่ยังคงพบว่ามีแบคทีเรียที่อยู่ในท่อเนื้อฟันที่มีการติดเชื้อในบริเวณข้างเคียง[35,36] ดังนั้นแบคทีเรียและผลผลิตที่เป็นพิษอาจแทรกซึมไปยังเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากฟันและก่อให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อปลายรากฟันในที่สุด[32]

อย่างไรก็ดีการนำผลการศึกษาเกี่ยวกับการรั่วซึมของวัสดุอุดคลองรากฟันไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต้องมีการแปลผลอย่างระมัดระวังและพิจารณาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งความแตกต่างของสภาวะทางคลินิกและการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วย เนื่องจากในทางคลินิกมีปัจจัยที่มีความซับซ้อนและควบคุมไม่ได้ เช่น กายวิภาคของฟัน อิทธิพลจากเนื้อเยื่อและของเหลวบริเวณปลายรากฟัน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่องปาก ความดันภายในช่องปาก และความหลากหลายของเชื้อในช่องปากเป็นต้น[37] แบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียนี้สามารถกำจัดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการรั่วของแบบจำลองและให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ แต่มีขั้นตอนการเตรียมแบบจำลองที่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนระหว่างประกอบแบบจำลองได้มากเช่นกัน การศึกษาในอนาคตอาจพิจารณาปรับขั้นตอนที่มีผลต่อการทดลอง เช่น การใช้อะคริลิกเรซินหรือซิลิโคนในการประกอบฟันเข้ากับหลอดทดลอง และการทำการปลอดเชื้อแบบจำลองภายหลังการประกอบอีกครั้งด้วยแก๊สเอทิลีนออกไซด์หรือฉายรังสีแกมมา[12] การทดสอบด้วยเชื้อหลายชนิดซึ่งมีศักยภาพในการก่อโรคได้มากกว่าการติดเชื้อเพียงชนิดเดียว และเชื้อที่มีโอกาสพบในฟันที่มีการติดเชื้อและต้องรักษาคลองรากฟันซ้ำหรือสภาวะที่พบในช่องปากจะมีแบคทีเรียหลายชนิดอยู่ร่วมกัน[38,39] รวมทั้งการทดสอบภายใต้สภาวะที่มีแรงบดเคี้ยวซึ่งพบว่ามีอิทธิพลต่อความแนบตามขอบของวัสดุและการแทรกซึมของสีย้อมและแบคทีเรีย[40]

บทสรุป

การรั่วซึมของคลองรากฟันที่ได้รับการอุดด้วยกัตตาเพอร์ชาร่วมกับรูตคะแนลซีลเลอร์ชนิดเอเอชพลัสโดยวิธีแลตเทอรัลคอมแพคชัน เมื่อทดสอบด้วยแบบจำลองดัดแปลงการรั่วซึมแบคทีเรียที่ระยะเวลา 7 ถึง 60 วันพบว่ามีแบคทีเรียซึมผ่านออกไปนอกคลองรากฟันซึ่งทำให้แบบจำลองส่วนล่างขุ่นเพียง 1 ซี่ในกลุ่มที่ติดตามผลระยะเวลา 45 วัน แต่จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบแบคทีเรียแทรกซึมไปตามพื้นผิวสัมผัสระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุดและสามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟัน โดยพบเชื้อได้ทั้งส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลายรากฟันในทุกกลุ่มทดลอง ถึงแม้จะยังไม่พบการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแบบจำลองก็ตาม ถึงแม้ว่าผลการศึกษานี้

จะยังไม่สามารถแสดงถึงภาพที่แท้จริงในทางคลินิกและยังไม่สามารถบอกความแตกต่างของการแทรกซึมของแบคทีเรียผ่านวัสดุอุดคลองรากฟันภายในระยะเวลาที่ทำการทดลองได้ แต่ผลการศึกษาก็แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการสัมผัสกับเชื้อแล้ว แบคทีเรียจะแทรกซึมไปตามรอยต่อระหว่างผนังคลองรากฟันและวัสดุอุดรวมถึงท่อเนื้อฟันข้างเคียง ซึ่งแสดงถึงความสำคัญในการบูรณะส่วนตัวฟันภายหลังการรักษาคลองรากฟันให้มีความแนบสนิทดีเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการรั่วซึมในส่วนตัวฟัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ (พิเศษ) ทพญ. ดร. วิสาขะ ลิ่มวงศ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเรื่องภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เอกสารอ้างอิง

1. American Association of Endodontists [URL of homepage on the Internet]. Chicago: Endodontics: Colleagues for Excellence newsletter.Fall/Winter 2002. [cited 2015 Oct 11]. Available from: HYPERLINK "http://www.aae.org/publications-and-research/endodontics-colleagues-for-excellence-newsletter/coronal-leakage.aspx" http://www.aae.org/publications-and-research/endodontics-colleagues-for-excellence-newsletter/coronal-leakage.aspx
2. Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. *Dent Traumatol* 1994; 10(3): 105-108.
3. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34(1): 1-10.
4. Hommez GM, Coppens CR, De Moor RJ. Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings. *Int Endod J* 2002; 35(8): 680-689.
5. Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995; 28(1): 12-18.
6. Tronstad L, Asbjørnsen K, Døving L, Pedersen I, Eriksen HM. Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(5): 218-221.
7. Gillen BM, Looney SW, Gu LS, et al. Impact of the quality of coronal restoration versus the quality of root canal fillings on success of root canal treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2011; 37(7): 895-902.
8. Veríssimo DM, do Vale MS. Methodologies for assessment of apical and coronal leakage of endodontic filling materials: a critical review. *J Oral Sci* 2006; 48(3): 93-98.
9. Khayat A, Lee SJ, Torabinejad M. Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals. *J Endod* 1993; 19(9): 458-461.
10. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod* 1999; 25(1): 14-16.
11. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 1990; 16(12): 566-569.
12. Rechenberg DK, De-Deus G, Zehnder M. Potential systematic error in laboratory experiments on microbial leakage through filled root canals: review of published articles. *Int Endod J* 2011; 44(3): 183-194.
13. Lertjantarangkool P. *Comparison of sealing properties between zinc oxide eugenol and resin based root canal sealers using bacterial leakage model.* Master of Science (Endodontology). Naresuan University, 2015. (in Thai)

14. Swanson K, Madison S. An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part I. Time periods. *J Endod* 1987; 13(2): 56-59.
15. Magura ME, Kafrawy AH, Brown CE Jr, Newton CW. Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: An in vitro study. *J Endod* 1991; 17(7): 324-331.
16. Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D. Coronal leakage of obturated root canals after long-term storage using a polymicrobial marker. *J Endod* 1997; 23(10): 610-613.
17. Timpawat S, Amornchat C, Trisuwan WR. Bacterial Coronal Leakage after Obturation with Three Root Canal Sealers. *J Endod* 2001; 27(1): 36-39.
18. Yücel AÇ, Güler E, Güler AU, Ertaş E. Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers. *J Endod* 2006; 32(9): 890-893.
19. Brosco VH, Bernardineli N, Torres SA, et al. Bacterial leakage in root canals obturated by different techniques. Part 1: microbiologic evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105(1): e48-e53.
20. Schneider SW. A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971; 32(2): 271-275.
21. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate Enterococcus faecalis. *J Endod* 2010; 36(3): 520-523.
22. Peters OA, Koka RS. Preparation of coronal and radicular spaces. In : Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors. *Ingle's Endodontics.* 6th ed. Hamilton Ontario: BC Decker; 2008: 877-991.
23. Vilanova WV, Carvalho-Junior JR, Alfredo E, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT. Effect of intracanal irrigants on the bond strength of epoxy resin-based and methacrylate resin-based sealers to root canal walls. *Int Endod J* 2012; 45(1): 42-48.
24. Banenati FW. Obturation of the radicular space. In : Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors. *Ingle's Endodontics*. 6th ed. Hamilton Ontario: BC Decker; 2008: 1053-1087.
25. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against Enterococcus faecalis. *J Endod* 2009; 35(7): 1051-1055.
26. Roe-Carpenter DE. Anaerobe antimicrobial susceptibility testing. In : Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC, editors. *Antimicrobial susceptibility testing protocols:* Boca Raton, Florida: CRC Press; 2007: 139-172.
27. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90(5): 647-650.
28. Rechenberg DK, Thurnheer T, Zehnder M. Potential systematic error in laboratory experiments on microbial leakage through filled root canals: an experimental study. *Int Endod J* 2011; 44(9): 827-835.
29. Baumgartner G, Zehnder M, Paqué F. Enterococcus faecalis type strain leakage through root canals filled with gutta-percha/AH plus or Resilon/Epiphany. *J Endod* 2007; 33(1): 45-47.
30. Taşdemir T, Er K, Yildirim T, et al. Comparison of the sealing ability of three filling techniques in canals shaped with two different rotary systems: a bacterial leakage study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(3): e129-e134.
31. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study. *Restor Dent Endod* 2014; 39(4): 258-264.

32. Brosco VH, Bernardineli N, Torres SA, et al. Bacterial leakage in obturated root canals—part 2: a comparative histologic and microbiologic analyses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(5): 788-794.
33. Kwang S, Abbott P. The presence and distribution of bacteria in dentinal tubules of root filled teeth. *Int Endod J* 2014; 47(6): 600-610
34. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66(8): 1375-1379.
35. Ricucci D, Lin LM, Spångberg LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(4):609-621.
36. Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries – a histobacteriological study of treated cases. *Int Endod J* 2003; 36(11): 787-802.
37. Alves J, Walton R, Drake D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. *J Endod* 1998; 24(9): 587-591.
38. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol* 2012; 50(5): 1721-1724.
39. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 2009; 88(11): 969-981.
40. Qvist V. The effect of mastication on marginal adaptation of composite restorations in vivo. *J Dent Res* 1983; 62(8): 904-906.