# การศึกษาความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี Real-time PCR และ การเพาะเลี้ยงเชื้อ

# Prevalence of *Enterococcus Faecalis* Detected by Real-Time PCR and Cultivation in Failed Root Canal Treated Teeth with Periradicular Lesions


**ภัทรมน ประไพสิทธิ์**

**Pattaramon Prapaisit**


**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา**
**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก**
**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Oral Health Sciences**
**Prince of Songkla University**
**2562**


**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

# การศึกษาความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี Real-time PCR และ การเพาะเลี้ยงเชื้อ

# Prevalence of *Enterococcus Faecalis* Detected by Real-Time PCR and Cultivation in Failed Root Canal Treated Teeth with Periradicular Lesions

**ภัทรมน ประไพสิทธิ์**

**Pattaramon Prapaisit**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา**
**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก**
**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Oral Health Sciences**
**Prince of Songkla University**
**2562**

**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การศึกษาความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี Real-time PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

**ผู้เขียน** นางสาวภัทรมน ประไพสิทธิ์

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

---

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

……..…..…

(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม**

……..…..…

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์)

**คณะกรรมการสอบ**

……...ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ (เชี่ยวชาญพิเศษ) ดร.สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ)

…….กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

…….กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์)

…….กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

……

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร. รวี เถียรไพศาล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(นางสาวภัทรมน ประไพสิทธิ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อนและไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวภัทรมน ประไพสิทธิ์)
นักศึกษา

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การศึกษาความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี Real-time PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

**ผู้เขียน** นางสาวภัทรมน ประไพสิทธิ์

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

**ปีการศึกษา** 2562

## บทคัดย่อ

*Enterococcus faecalis* ถูกพบได้บ่อยในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก และจากการศึกษาที่ผ่านมามีข้อมูลที่จำกัดเกี่ยวกับความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี real-time PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเก็บ 36 ตัวอย่างจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar และ selective medium สำหรับเชื้อ enterococci เพื่อหาเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งเชื้อดังกล่าวถูกวินิจฉัยโดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนี คุณสมบัติเฉพาะทางชีวเคมีและวิธีทางโมเลกุลและบันทึกปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. faecalis* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากเป็นร้อยละ 33.3 (11/33 ซี่) ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและร้อยละ 88.9 (32/36 ซี่) ด้วยวิธี real-time PCR นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดง 13 จาก 49 สายพันธุ์ (ร้อยละ 26.5) โดยเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงพบในฟันที่มีรูเปิดทางหนองไหลและมีอาการเมื่อเคาะ (ร้อยละ 100) ในขณะที่เชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดงพบลักษณะอาการดังกล่าวเพียงร้อยละ 12.5 สรุปได้ว่าการติดเชื้อภายในคลองรากฟันยังคงเป็นสาเหตุหลักของฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก โดยพบความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ร้อยละ 33.3 และร้อยละ 88.9 ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR ตามลำดับ และเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงมีแนวโน้มสัมพันธ์กับอาการแสดงทางคลินิกที่รุนแรงกว่า เป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีปัจจัยการก่อโรคที่รุนแรงกว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดงซึ่งต้องศึกษาเพื่อยืนยันต่อไป

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Prevalence of *Enterococcus Faecalis* Detected by Real-Time PCR and Cultivation in Failed Root Canal Treated Teeth with Periradicular Lesions |
| **Author** | Miss Pattaramon Prapaisit |
| **Major Program** | Oral Health Sciences |
| **Academic Year** | 2019 |

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* is commonly found in failed root canal treated teeth with periradicular lesions, and there is limited information about the prevalence of *E. faecalis* in failed root canal treated teeth with periradicular lesions in Thailand. Therefore, the objective of this study was to examine the prevalence of *E. faecalis* in failed root canal treated teeth with periradicular lesions by real-time PCR and cultivation. Thirty-six samples were collected from 36 root canals with periradicular lesions. All samples were cultured on blood agar and selective medium for detection of enterococci. *E. faecalis* was identified by colonial morphology, biochemical properties and molecular method, and a number of total bacteria and *E. faecalis* were recorded. Results showed that the prevalence of *E. faecalis* in the failed root canal treated teeth with periradicular lesions was 33.3% (11/33 samples) by cultivation and 88.9% (32/36 samples) by real-time PCR. Moreover, the hemolytic *E. faecalis* strains were found in 13 of 49 strains (26.5%). The hemolytic *E. faecalis* strains were found to be related to the teeth with sinus tract opening and sensitive/pain to percussion (100%) while only 12.5% of the non-hemolytic strains were found in such conditions. In conclusion, intraradicular infection was still the main cause of the failed root canal treated teeth with periradicular lesions and the prevalence of *E. faecalis* was 33.3% and 88.9% by culture and real-time PCR, respectively. The hemolytic *E. faecalis* strains were related to more severe clinical symptoms. This may be due to the hemolytic strains having more virulence factors than non-hemolytic strains, further investigations are needed.

# กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจาก ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพญ. เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา คำแนะนำและให้ความรู้ต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ทพ.สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพญ. สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยและคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยครั้งนี้รวมถึงหน่วยบัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆ เรื่อง

ขอขอบพระคุณ ดร. นันทิยา พาหุมันโต ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยอย่างสุดความสามารถและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ. บุญรัตน์ สัตพัน อ. ทพญ. มนทิรา สังข์ศิลชัย อาจารย์สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือและคำปรึกษาในการศึกษาครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตรจารย์ ดร.ทพญ. สุกัญญา เธียรวิวัฒน์ ที่ได้สละเวลาให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับสถิติในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง เพื่อนนักศึกษาหลังปริญญา สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือ ทั้งเรื่องการศึกษา และเรื่องอื่นๆ ตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า ที่มอบความรัก ความห่วงใย และกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา คุณงามความดีที่เกิดจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอมอบแด่ครอบครัวและคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาแก่ข้าพเจ้า

ภัทรมน ประไพสิทธิ์

# สารบัญ

**หน้า**


| | |
|---|---|
| บทคัดย่อ | (5) |
| Abstract | (6) |
| กิตติกรรมประกาศ | (7) |
| สารบัญ | (8) |
| รายการตาราง | (9) |
| รายการรูปภาพ | (10) |
| 1. บทนำ | |
| บทนำต้นเรื่อง | 1 |
| การทบทวนวรรณกรรม | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 9 |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย | 10 |
| 3. ผลการดำเนินงานวิจัย | 19 |
| 4. บทวิจารณ์ | 26 |
| 5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ | 30 |
| เอกสารอ้างอิง | 31 |
| ภาคผนวก | 38 |
| ประวัติผู้เขียน | 45 |

# รายการตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก | 6 |
| 2 | ข้อดีและข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ | 7 |
| 3 | ข้อดีและข้อจำกัดของการศึกษาระดับโมเลกุล | 9 |
| 4 | จำนวนซี่ฟันตัวอย่างที่พบเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากและข้อมูลของผู้ป่วย (n = 36) | 19 |
| 5 | ความชุกและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก (n = 36) เมื่อตรวจหาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR | 22 |
| 6 | ร้อยละของเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดง | 24 |
| 7 | ข้อมูลของผู้ป่วยและซี่ฟันที่พบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง | 25 |
| 8 | ความไวของการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR | 40 |

# รายการภาพประกอบ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | Enterococci จะเห็นเป็นโคโลนีใสร่วมกับมี zone สีดำบน Enterococcosel™ Agar | 15 |
| 2 | A. (1) โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5, (2) bile esculin ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ (3) motility media ตามลำดับ B. (1) bromocresol purple indicator ในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทนเกลือ (2) Enterococci จะย่อยสลาย esculin ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำและ (3) จุลินทรีย์ชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้จะเจริญอย่างจำกัดภายใน stab-line | 16 |
| 3 | ความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อเชื้อ *E. faecalis* โดยมีกลุ่มควบคุมแบบบวก (+) คือเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 และกลุ่มควบคุมแบบลบ (-) คือ เชื้อ *S. sanguinis* ATCC 10556 และเชื้อ *E. faecalis* ในตัวอย่างที่ได้จากคลองรากฟัน | 21 |
| 4 | Enterococci ที่แยกได้จากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟัน ที่มีรอยโรคปลายรากโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบน Enterococcosel™ Agar | 23 |
| 5 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* บนอาหาร blood agar ชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolytic) และสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic) | 23 |
| 6 | กราฟมาตรฐานของเชื้อ *E. faecalis* | 39 |
| 7 | กราฟมาตรฐานของแบคทีเรียทั้งหมด | 39 |

# บทที่ 1

# บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

การรักษาคลองรากฟันมีจุดมุ่งหมายเพื่อกำจัดการติดเชื้อภายในคลองรากฟันและป้องกันการติดเชื้อซ้ำโดยการอุดคลองรากฟัน อย่างไรก็ตามสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาคลองรากฟันล้มเหลวซึ่งทำให้เนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันยังคงอักเสบหลังการรักษา (posttreatment apical periodontitis ) นั้นมีสาเหตุจากการคงอยู่ของเชื้อภายหลังการรักษา (persistent infection) หรือการติดเชื้อซ้ำของคลองรากฟันที่ได้กำจัดเชื้อไปแล้ว (secondary infection) [1, 2] โดยพบว่าเชื้อ *Enterococcus faecalis* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในฟันที่รักษาคลองรากฟันแล้ว[2-10] นอกจากนี้ยังสามารถเจอเชื้อในกลุ่ม*Streptococcus, Dialister, Fusobacterium, Filifactor, Parvimonas, Prevotella, Propionibacterium*, *Pseudoramidobacter* และ *Candida* spp. ในฟันที่รักษาคลองรากฟันแล้วเช่นกัน[2-4, 6, 10-14]

เนื่องจากเชื้อ *E. faecalis* พบได้บ่อยในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากจึงมีการกล่าวว่าเชื้อชนิดนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดพยาธิสภาพปลายรากที่ดื้อต่อการรักษา สันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อ *E. faecalis* สามารถทนต่อกระบวนการฆ่าเชื้อและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมของคลองรากฟันที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการรักษาได้ โดยเชื้อ *E. faecalis* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) สามารถทนต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟัน[15]และสามารถอยู่ภายในคลองรากฟันแบบชนิดเดียว (single infection)[10] โดยไม่ต้องรับสารอาหารจากแบคทีเรียชนิดอื่น อีกทั้งยังสามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ (dentinal tubules)[16, 17]นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* ยังสามารถสร้างแผ่นชีวภาพ (biofilm) ที่ช่วยทำให้สามารถทนต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) แอนติบอดีและยาต้านจุลชีพได้เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นที่ไม่สามารถสร้างแผ่นชีวภาพ[18]

ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันมีผลรายงานที่หลากหลาย อยู่ในช่วงร้อยละ 24 – 77[2-5, 8, 10, 13, 19, 20] แต่ก็มีบางการศึกษาที่ไม่พบเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่รักษาคลองรากฟันแล้วร่วมกับมีรอยโรคปลายรากเช่นกัน[14, 21] ความชุกของ

จุลินทรีย์ในคลองรากฟันที่แตกต่างกันนี้ อาจเกิดจากเทคนิคที่ใช้ในการศึกษา ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกัน หรือความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ เป็นต้น ในส่วนของความแตกต่างทางภูมิศาสตร์นั้นมีรายงานสนับสนุนว่า อาจส่งอิทธิพลต่อส่วนประกอบของจุลินทรีย์ในช่องปากและการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์ ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ (colonization) ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์ ในรูปแบบแผ่นชีวภาพนั้นประกอบด้วย กลไกการป้องกันของร่างกาย พันธุกรรม และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นคุณภาพของน้ำที่ใช้บริโภค ความเครียด การสูบบุหรี่ ความถี่ในการพบทันตแพทย์ นิสัยการรับประทานอาหาร สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น [22]

ข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเชื้อในการศึกษาความชุกของเชื้อ *E. faecalis* คือ ต้องใช้เวลามาก ต้องควบคุมสภาวะระหว่างการสุ่มตัวอย่างและการขนส่งไปตรวจสอบความมีชีวิตของจุลินทรีย์ และผลที่ได้ขึ้นกับประสบการณ์ของผู้เพาะเลี้ยง ในทางตรงข้าม PCR นั้น ช่วยในการแยกจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วทั้งสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้และเพาะเลี้ยงไม่ได้ด้วยความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูง [23] มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีการศึกษาระดับโมเลกุล พบว่าวิธีการศึกษาระดับโมเลกุลนั้นมีความไวในการตรวจพบจุลินทรีย์จากตัวอย่างทางคลินิกมากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ [7, 9, 24, 25] และวิธี real-time PCR ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อวัดปริมาณที่มีอยู่จริงของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง

จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีข้อมูลที่เพียงพอเกี่ยวกับความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากในประเทศไทย จึงเป็นที่มาในการศึกษาครั้งนี้

# การทบทวนวรรณกรรม

## การคงอยู่ของรอยโรคปลายราก (Persistent apical periodontitis)

ความสำเร็จของการรักษาคลองรากฟันในฟันที่ติดเชื้อ มีการรายงานอยู่ในช่วงร้อยละ 76-86 [26-29] โดยสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาคลองรากฟันล้มเหลวคือการคงอยู่ของเชื้อภายหลังการรักษาคลองรากฟัน หรือการติดเชื้อซ้ำของคลองรากฟันที่ได้กำจัดเชื้อไปแล้ว[1] การควบคุมการปลอดเชื้อไม่เพียงพอ การออกแบบโพรงเข้าสู่คลองรากฟันไม่ดี การหลงเหลือบางคลองรากที่ไม่ได้รับการรักษา การทำความสะอาดคลองรากฟันไม่เพียงพอ และการรั่วซึมของวัสดุอุดชั่วคราวหรือถาวร เป็นปัญหาที่พบบ่อยซึ่งนำไปสู่การคงอยู่ของรอยโรคปลายราก แม้ว่าจะปฏิบัติตามขั้นตอนอย่างรอบคอบมากที่สุดก็ยังมีโอกาสที่จะเกิดการคงอยู่ของรอยโรคปลายรากได้ อาจเป็นเพราะกายวิภาคของระบบคลองรากฟันที่มีความซับซ้อนซึ่งทำให้บางส่วนของคลองรากฟันไม่ถูกทำความสะอาดและไม่สามารถอุดได้ด้วยเครื่องมือ วัสดุ และเทคนิคที่มีในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยจากภายนอกระบบคลองรากฟันที่สามารถขัดขวางการการหายของรอยโรคหลังการรักษาได้ สาเหตุที่ทำให้เกิดการคงอยู่ของรอยโรคปลายรากหลังการรักษาคลองรากฟัน แบ่งได้เป็นสาเหตุที่เกิดจากจุลินทรีย์ (microbial causes) และที่ไม่ได้เกิดจากจุลินทรีย์ (non-microbial causes)[1, 30]

สาเหตุจากจุลินทรีย์ พบว่าการมีอยู่ของเชื้อภายในคลองรากฟัน (intraradicular infection) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการคงอยู่ของรอยโรคปลายรากหลังการรักษาคลองรากฟัน โดยจุลินทรีย์ที่พบในคลองรากฟันที่ได้รับการรักษาคลองรากฟันมาแล้วนั้นส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก (gram-positive) รูปร่างกลม(cocci) ท่อน(rod) หรือ filaments เช่น *Actinomyces, Enterococcus* และ *Propionibacterium*[3, 4, 10, 13] เป็นต้น และการติดเชื้อภายนอกรากฟัน (extraradicular infection) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่มักเกี่ยวข้องคือ *Actinomyces* และ *Propionibacterium*[31, 32]

สาเหตุที่ไม่ได้เกิดจากจุลินทรีย์ เช่น วัสดุอุดคลองรากฟันหรือวัสดุอื่นๆ เกินออกไปนอกปลายราก ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอม (foreign body reaction) ซึ่งการสะสมของแมกโครแฟจ (macrophages) รอบๆกัตทาเพอร์ชา (gutta percha) อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้การหายของรอยโรครอบปลายรากแย่ลงในฟันที่รักษาคลองรากแล้วและมีวัสดุเกินออกไป[33] cholesterol crystals ซึ่งเกิดจาก inflammatory cell ที่ตายแล้วจะไประคายเคืองต่อเนื้อเยื่อรอบปลายราก[34] การเป็นถุงน้ำปลายรากฟัน (cyst apical periodontitis) พบว่า pocket cysts ซึ่งเป็นถุงน้ำที่มีทางเชื่อมต่อกับคลองรากฟัน สามารถหายได้หลังจากการรักษาคลองรากฟัน แต่หากเป็นถุงน้ำชนิด true cyst ซึ่งมีลักษณะเป็น self-sustaining ไม่ขึ้นกับการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน ถุงน้ำชนิดนี้มี

โอกาสหายน้อยหากรักษาด้วยวิธีการรักษาคลองรากฟันเพียงอย่างเดียว[35] หรือในบางกรณีที่ยังคงมีเงาดำบริเวณปลายรากฟัน อาจเป็นเพราะมีการหายแบบแผลเป็น (scar tissue healing)[36]

**การติดเชื้อภายในคลองรากฟัน (Intraradicular infection)**

การติดเชื้อภายในคลองรากฟันสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท ตามระยะเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์เข้ามาในคลองรากฟันคือ (1) การติดเชื้อปฐมภูมิ (primary infection) เกิดจากจุลินทรีย์ที่บุกรุกเข้ามาและตั้งรกรากในเนื้อเยื่อในที่ตายแล้ว (2) การติดเชื้อซ้ำของคลองรากฟันที่ได้กำจัดเชื้อไปแล้ว เกิดจากจุลินทรีย์ที่ไม่ปรากฏในการติดเชื้อปฐมภูมิ แต่เข้าสู่คลองรากฟันภายหลังการรักษา และ (3) การคงอยู่ของเชื้อภายหลังการรักษา เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเดียวกับการติดเชื้อปฐมภูมิหรือเชื้อที่เข้าสู่คลองรากฟันภายหลังการรักษาซึ่งดื้อต่อกระบวนการฆ่าเชื้อ และสามารถทนต่อสภาวะขาดแคลนอาหารในคลองรากฟันที่อุดแล้วได้[37]

จุลินทรีย์ที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อปฐมภูมิ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) พบได้ทั้งแกรมลบ (gram-negative) และแกรมบวก การศึกษาแบคทีเรียในการติดเชื้อปฐมภูมิ มีความแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา เช่น *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola, Porphyromonas endodontalis, Streptococcus* spp. เป็นต้น[2, 8, 23, 38, 39]

การติดเชื้อซ้ำของคลองรากฟันที่ได้กำจัดเชื้อไปแล้วและการคงอยู่ของเชื้อภายหลังการรักษา เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาคลองรากฟันล้มเหลว[2, 4, 8, 10, 40] โดยแบคทีเรียเหล่านี้มักอยู่ในส่วนที่เข้าถึงได้ยากและดื้อต่อกระบวนการรักษา แต่อย่างไรก็ตามความหลากหลายและความหนาแน่นของเชื้อจะลดลงหลังการรักษาคลองรากไปแล้ว [39, 41]โดยจำนวนของเชื้อที่ดื้อต่อการรักษาเหล่านี้อยู่ในช่วง $10^2$-$10^5$ ต่อตัวอย่าง ในขณะที่จำนวนของเชื้อในการติดเชื้อปฐมภูมิ จะอยู่ในช่วง $10^3$-$10^8$ ต่อตัวอย่าง

จากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ดื้อต่อการรักษานั้นส่วนใหญ่เป็นชนิดแกรมบวก ชนิดที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนหรือชนิดที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น *Streptococcus, Parvimonas micra, Propionibacterium* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus, Actinomyces* spp,, *Lactobacillus* spp., *E. faecalis,* และ *Olsenella uli* เป็นต้น[2, 42, 43] จะเห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกทนต่อการฆ่าเชื้อในกระบวนการรักษาและสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมของคลองรากฟันที่ได้รับการอุดคลองรากฟันแล้ว

**จุลินทรีย์ในฟันที่รักษาคลองรากฟันแล้ว**

จากหลายการศึกษาทั้งด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีการศึกษาระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecalis* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในฟันที่รักษาคลองรากฟันมาแล้ว[2-10, 39] จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดพยาธิสภาพปลายรากที่ดื้อต่อการรักษา

***Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)**

Enterococci เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ชนิดแกรมบวก รูปร่างกลม catalase-negative ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) สายพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่สลายเม็ดแดง (non-hemolytic) และเป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-motile)

เชื้อ *E. faecalis* เป็นเชื้อที่พบได้ในช่องปาก ทางเดินอาหารของมนุษย์ สัตว์ น้ำและอาหาร[44] สามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้นานถึง 30 นาที เจริญเติบโตได้ในช่วง pH 4.6 - 9.9 อีกทั้งเชื้อ *E. faecalis* ยังสามารถทนและเจริญเติบโตในเกลือน้ำดี (bile salts)ที่มีความเข้มข้นร้อยละ40 และโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 ได้[45] พบว่าเชื้อ *E. faecalis* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อภายในคลองรากฟันถึงร้อยละ 80 - 90 และ *Enterococcus* spp. มักแยกได้จากคลองรากฟันที่ได้รับการรักษาไปแล้ว[16, 46]

เชื้อ *E. faecalis* สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในฟันที่ทำการรักษาคลองรากฟันแล้ว ซึ่งต้องสามารถทนต่อกระบวนการฆ่าเชื้อและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมของคลองรากฟันที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการรักษาได้ สันนิษฐานว่าเกิดจากการที่เชื้อ *E. faecalis* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน มีความสามารถในการทนต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟันที่มีภาวะเป็นด่างสูง เนื่องจากเชื้อ *E. faecalis* มีระบบการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ทำให้คงระบบความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ได้ ส่งผลให้เซลล์อยู่ในสภาวะสมดุล[15] เชื้อ *E. faecalis* สามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้[16, 17] ซึ่งทำให้สามารถรอดพ้นจากการโดนกำจัดด้วยการขยายคลองรากฟันและน้ำยาล้างคลองรากฟัน นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* ยังมีความสามารถในการสร้างแผ่นชีวภาพที่ช่วยทำให้เชื้อสามารถทนต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิส แอนติบอดีและยาต้านจุลชีพได้มากถึง 1,000 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นที่ไม่สามารถสร้างแผ่นชีวภาพ[18] อีกทั้งเชื้อ *E. faecalis* สามารถอยู่ภายในคลองรากฟันแบบชนิดเดียวได้โดยไม่ต้องรับสารอาหารจากแบคทีเรียชนิดอื่น[10]

**ความชุกของเชื้อ *E. faecalis***

ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันพบอยู่ในช่วงร้อยละ24-77[19] จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าความชุกของเชื้อ *E. faecalis* มีความหลากหลายในแต่ละการศึกษา ดังตารางที่ 1 ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ความไวและความจำเพาะของเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา วิธีการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ Baumgartner และคณะ[22] ได้เสนอว่าอิทธิพลทางภูมิศาสตร์อาจเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างของจุลินทรีย์ในช่องปาก

**ตารางที่ 1** ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก

| **ผู้แต่ง, ปี** | **ประเทศ** | **วิธีการศึกษา** | **ความชุกของเชื้อ *E. faecalis*** |
|---|---|---|---|
| Molander et al. 1998[3] | สวีเดน | Culture | 32/68 (47%) |
| Sundqvist et al. 1998[10] | สวีเดน | Culture | 9/24 (38%) |
| Peciuliene et al. 2000[20] | ลิทัวเนีย | Culture | 14/20 (70%) |
| Hancock et al. 2001[13] | อเมริกาเหนือ | Culture | 10/33 (30.3%) |
| Pinheiro et al. 2003[4] | บราซิล | Culture | 27/51 (53%) |
| Pinheiro et al. 2003[47] | บราซิล | Culture | 11/24 (46%) |
| Siqueira & Rocas 2004[2] | บราซิล | PCR | 17/22 (77%) |
| Gomes et al. 2004[39] | บราซิล | Culture | 6/19 (32%) |
| Rocas et al. 2004[5] | บราซิล | PCR | 20/30 (67%) |
| Rocas et al. 2004[8] | เกาหลี | PCR | 9/14 (64%) |
| Fouad et al. 2005[48] | อเมริกา | PCR | 8/37 (22%) |
| Gomes et al. 2006[24] | บราซิล | PCR<br>Culture | 38/50 (76%)<br>21/50 (42%) |
| Sedgley et al.2006[9] | สวีเดน | qPCR<br>Culture | 43/48 (89.6%)<br>4/48 (8.3%) |
| Zoletti et al. 2006[7] | บราซิล | PCR<br>Culture | 18/23 (78%)<br>3/23 (13%) |
| Williams et al. 2006[25] | อเมริกา | qPCR<br>Culture | 6/14 (43%)<br>2/14 (14%) |
| Rocas & Siqueira 2012[6] | บราซิล | qPCR | 11/29 (38%) |
| Cheung et al. 2001[14] | จีน | Culture | ไม่พบเชื้อ *E. faecalis* |
| Rolph et al. 2001[21] | สหราชอาณาจักร | PCR | ไม่พบเชื้อ *E. faecalis* |

**การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Methods for microbial identification)**

**การเพาะเลี้ยงเชื้อ**

การเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับมาอย่างยาวนาน ในการยืนยันวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรีย การเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นกระบวนการที่จัดสรรสารอาหารและสภาพแวดล้อมให้เอื้อต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความดันบรรยากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องในการศึกษาจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ เริ่มต้นจากการเก็บตัวอย่าง นำส่งไปยังห้องปฏิบัติการ นำสารตัวอย่างมาปั่น ทำให้เจือจาง และเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและเวลาที่เหมาะสม หลังจากนั้นจำแนกแบคทีเรียตามลักษณะ phenotype เช่น ลักษณะของโคโลนี รูปร่างของเซลล์ การย้อมแกรม (gram staining) ทดสอบลักษณะทางชีวเคมี วิเคราะห์ end-production โดยใช้ก๊าซลิควิดโครมาโทกราฟี เป็นต้น ซึ่งมีข้อดีและข้อจำกัดดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ข้อดีและข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ[23]

| ข้อดี | ข้อจำกัด |
|---|---|
| - สามารถจำแนกเชื้อได้หลายชนิด<br>- ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกออกมาได้ | - ต้องใช้เวลามาก<br>- ผลที่ได้ขึ้นกับประสบการณ์ของผู้เพาะเลี้ยง<br>- มีความไวต่ำ (low sensitivity)<br>- ต้องควบคุมสภาวะระหว่างขนส่งไปตรวจสอบ<br>- ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวนมากได้<br>- ยากในการจำแนกเชื้อที่มีลักษณะไม่ชัดเจนหรือมีลักษณะที่เบี่ยงเบนไปจากปกติ |

จากข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงมีการพัฒนาวิธีการศึกษาระดับโมเลกุลขึ้น โดย 16S rRNA gene (rDNA) ถูกพัฒนาเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultivable bacteria) รวมทั้งจำแนกแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้แต่มีลักษณะที่เบี่ยงเบนไปจากปกติ ซึ่ง 16S rRNA sequencing สามารถให้ข้อมูลที่ชัดเจนได้แม้ตัวอย่างเชื้อจะมีปริมาณน้อย[23]

**การศึกษาระดับโมเลกุล**

**Polymerase Chain Reaction (PCR)**

PCR คือ กระบวนการสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA)โดยอาศัยหลักการ DNA replication มี 3 ขั้นตอน คือ (1) denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆจนกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส (2) annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆและใส่ไพร์เมอร์ (primer) ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (complementary base pair) ระหว่างไพร์เมอร์กับแม่แบบดีเอ็นเอ โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส และ (3) extension เป็นขั้นตอนการใส่ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่หรือเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอให้มากขึ้น โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส วิธี PCR แยกเชื้อได้อย่างรวดเร็วมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ(specificity) มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ[9, 23-25, 49] อย่างไรก็ตามวิธี PCR นั้นไม่สามารถวัดปริมาณของเชื้อที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง ดังนั้นวิธี real-time PCR จึงถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแก้ไขข้อจำกัดของวิธี PCR แบบธรรมดา ทำให้สามารถติดตาม exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งนำไปสู่การวัดปริมาณได้

**วิธี real-time PCR**

วิธี real-time PCR มีคุณสมบัติในการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตลอดทั้งปฏิกิริยา สารเคมีที่ใช้สำหรับ amplifying และการตรวจจับดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น มี 3 ชนิดด้วยกัน คือ SYBR-Green, TaqMan และ molecular beacon

SYBR-Green เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและราคาไม่แพงประกอบด้วย สีย้อมเรืองแสง (fluorescent) ที่จับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ ระหว่างขั้นตอน extension ปริมาณของสีย้อมที่จับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ก็จะเพิ่มมากขึ้น [23] ซึ่งมีข้อดีและข้อจำกัดดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ข้อดีและข้อจำกัดของการศึกษาระดับโมเลกุล[23]

| ข้อดี | ข้อจำกัด |
|---|---|
| - จำแนกแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้และแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้แต่มีลักษณะที่เบี่ยงเบนไปจากปกติ<br>- มีความไวและความจำเพาะสูง<br>- รวดเร็ว<br>- สามารถตรวจได้แม้มีการใช้ยาปฏิชีวนะ<br>- ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ตายแล้วได้ | - ค่าใช้จ่ายสูงกว่า |

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี real-time PCR และ การเพาะเลี้ยงเชื้อ

# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

## เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

1. เชื้อ *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (American Type Culture Collection, USA)
2. เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, USA)
3. เชื้อ *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 (American Type Culture Collection, USA)

## วัสดุ

1. Gates Glidden drills
2. K-files และ/หรือ H-files หรือ rotary NiTi instruments
3. น้ำเกลือ
4. กระดาษซับรูปกรวยแหลม (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland)
5. หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube)
6. RTF (reducing transport fluid)
7. PBS (phosphate-buffered saline)
8. Brain-heart infusion agar (Becton, Dickinson and Company, USA)
9. Enterococcosel™ Agar (Becton, Dickinson and Company, USA)
10. Blood agar (Becton, Dickinson and Company, USA)
11. อาหารที่มีส่วนประกอบของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 (6.5% NaCl medium)
12. อาหารที่มีส่วนประกอบของ bile esculin ความเข้มข้นร้อยละ 40 (40% bile esculin medium)
13. Motility test medium (Becton, Dickinson and Company, USA)
14. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 30
15. ชุดย้อมแกรมแบคทีเรีย (Himedia, India)
16. เอนไซม์ lysozyme (Amesco, USA)
17. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (PureDireX DNA extraction kit, Bio-Helix Co.,Ltd., Taiwan)

18. น้ำยา real-time PCR (SensiFAST™SYBR kit, Bioline Reagent Ltd., California, USA)

## อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความยาวราก (Root ZX; J Morita USA,Inc, Irvine, Calif)
2. เครื่องเขย่าสาร (Vortex: New York, USA)
3. Autopipette ขนาด 10, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อขนาด 400 ลิตร (Binder; Scientific promotion Co., LTD., USA)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, USA)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (MIKRO 200; Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Germany)
7. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Machine)
8. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (PowerPac™ Basic Power supply; Bio-Rad, USA)
9. ชุดถ่ายภาพจากเจล (EC Imaging system W/410 Camera; Ultra-Violet products LTD., UK)
10. เครื่อง real-time PCR (CFX96 Touch™ Real-Time PCR detection system; Bio-Rad, USA)

## วิธีดำเนินการ

การศึกษานี้ผ่านการพิจารณาในคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ คือ EC6110-36-P-LR

**1. การคัดเลือกผู้ป่วย (Patient selection)**

ผู้ป่วยที่ได้รับการส่งต่อเพื่อรักษาคลองรากฟันซ้ำ (nonsurgical root canal retreatment) จากการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลวโดยประเมินทางคลินิกและ/หรือภาพรังสี ก่อนเข้าร่วมการศึกษาผู้ป่วยต้องให้ความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร โดยมีเกณฑ์ในการคัดเข้าของผู้ร่วมวิจัยดังนี้

- ฟันแท้ที่มีการสร้างรากฟันโดยสมบูรณ์และได้รับการรักษาคลองรากฟันเสร็จสิ้นแล้วอย่างน้อย 1 ปี
- ฟันที่ได้รับการรักษาคลองรากฟันมาแล้วและมีรอยโรคปลายรากเมื่อประเมินจากภาพรังสี ร่วมกับไม่มีหรือมีอาการแสดงทางคลินิก เช่น พบรูเปิดทางหนองไหล (sinus tract opening) รูเปิดหนองผ่านทางร่องลึกปริทันต์ (deep narrow pocket) เจ็บเมื่อกัด (pain on biting) เคาะเจ็บ (pain to percussion) มีอาการกดเจ็บ (tenderness to palpation) เป็นต้น
- สามารถใส่แผ่นยางกันน้ำลายได้
- ซี่ฟันที่เลือกต้องไม่มีร่องลึกปริทันต์เกิน 4 มิลลิเมตร

เกณฑ์ในการคัดออกคือ

- ไม่มีวัสดุบูรณะที่ส่วนตัวฟัน

ในกรณีฟันหลายรากให้เลือกคลองรากที่มีวัสดุอุดคลองรากฟันที่มีความสัมพันธ์กับรอยโรคปลายรากและ/หรือคลองรากที่มีขนาดใหญ่ที่สุด

**2. ขนาดกลุ่มตัวอย่าง (Sample size)**

จากการศึกษาก่อนหน้า[9] พบความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันด้วยวิธี real-time PCR และการเพาะเลี้ยงเชื้อร้อยละ 89.6 และ 8.3 ตามลำดับ กำหนดจำนวนกลุ่มตัวอย่างสำหรับการประมาณอัตราส่วน (determination of sample size for estimating proportions) ดังสมการ[50]

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2}$$

จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมจากการใช้ วิธี real-time PCR เพื่อหาความชุกของเชื้อคำนวณได้ดังนี้

$z$ = 1.96

$d$ = 0.10

$p = 0.896$

$q = 0.104$

$$n = \frac{(1.96)^2\,(0.896)(0.104)}{(0.10)^2}$$

$$n = 36$$

จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมจากการใช้ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อหาความชุกของเชื้อคำนวณได้ดังนี้

$z$ = 1.96

$d$ = 0.10

$p = 0.083$

$q = 0.917$

$$n = \frac{(1.96)^2\,(0.083)(0.917)}{(0.10)^2}$$

$$n = 30$$

ดังนั้น จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการเพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันคือ 36 ตัวอย่าง ซึ่งยึดตามจำนวนที่คำนวณได้จากวิธี real-time PCR

**3. การเก็บตัวอย่าง (Sample collection)**

ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง ข้อมูลที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่ตรวจพบ (microbial finding) ของผู้ป่วยแต่ละคนจะถูกบันทึกในแบบฟอร์ม

- ข้อมูลทั่วไป ได้แก่ เพศ อายุ ซี่ฟัน
- อาการแสดงทางคลินิก ประกอบด้วย ลักษณะของอาการปวด สภาพของเนื้อเยื่อรอบๆซี่ฟัน รูเปิดทางหนองไหล เจ็บเมื่อกัด เคาะเจ็บหรือเสียว มีอาการกดเจ็บ
- ลักษณะการบูรณะส่วนตัวฟันเช่นอุดด้วยเรซินคอมโพสิต อะมัลกัมหรือครอบฟัน เป็นต้น และคุณภาพของวัสดุบูรณะ โดยจะประเมินเป็น Good เมื่อคุณภาพของ

วัสดุบูรณะอยู่ในเกณฑ์ดี และประเมินเป็น Poor เมื่อคุณภาพของวัสดุบูรณะไม่เป็นที่น่าพอใจ เช่น พบฟันผุซ้ำใต้วัสดุบุรณะ วัสดุบูรณะแตก ชำรุด เป็นต้น

- ข้อมูลจากภาพถ่ายรังสี ประเมินคุณภาพของวัสดุอุดคลองรากฟัน ช่องว่างระหว่างวัสดุอุดคลองรากฟัน ระยะห่างของวัสดุอุดคลองรากฟันกับปลายรากฟัน โดยแบ่งเป็น อยู่ในช่วง 0 - 2 มิลลิเมตรจากปลายรากฟัน มากกว่า 2 มิลลิเมตรจากปลายรากฟัน และวัสดุเกินออกไปนอกปลายรากฟัน รวมถึงลักษณะของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน

การเก็บตัวอย่างเริ่มจาก กำจัดแผ่นคราบจุลินทรีย์บริเวณซี่ฟันและใส่แผ่นยางกันน้ำลาย ทำความสะอาดบริเวณทำงานด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ตามด้วยโซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 5 เพื่อหยุดการทำงานของโซเดียมไฮโปคลอไรท์[51]

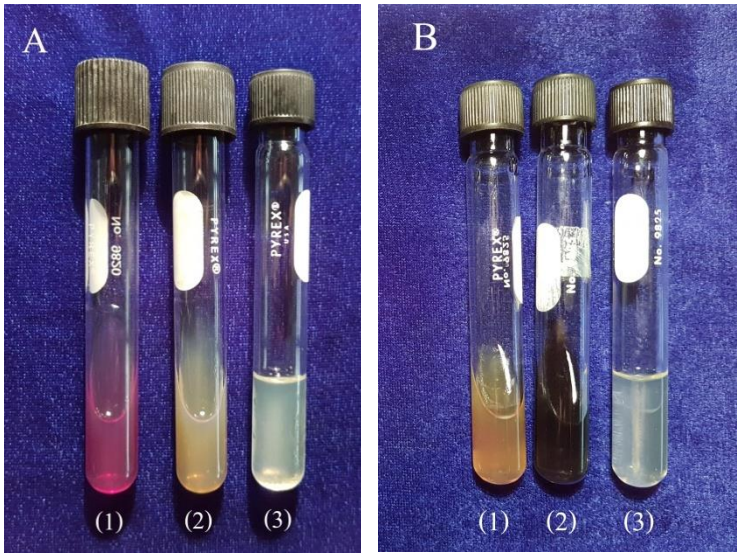
กรอเปิดทางเข้าสู่คลองรากฟันด้วยหัวกรอคาร์ไบด์หรือหัวกรอกากเพชรแบบความเร็วสูงจนพบวัสดุอุดคลองรากฟัน รื้อกัตตาเปอร์ชาด้วย Gates Glidden drills, K-files และ/หรือ H-files หรือ rotary NiTi instrumentsโดยไม่ใช้ตัวทำละลายใดๆ ตรวจสอบภายในคลองรากฟันโดยใช้แว่นขยายและ/หรือการถ่ายภาพรังสีเพื่อยืนยันว่ารื้อกัตตาเปอร์ชาออกทั้งหมดแล้ว จากนั้นใส่น้ำเกลือ (sterile saline solution) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเข้าสู่คลองรากฟัน ตะไบผนังคลองรากฟันโดยรอบ (circumferential filing) ด้วย #25 H-files ในทิศทางขึ้นลงจำนวน 20 ครั้งที่ระดับสั้นกว่าปลายราก 1 มิลลิเมตร ซึ่งประเมินจากภาพรังสีและ/หรืออุปกรณ์หยั่งปลายราก (Root ZX; J Morita USA,Inc, Irvine, Calif) ใส่กระดาษซับรูปกรวยแหลมขนาดกลาง (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) 2 ชิ้นพร้อมกันที่ระดับเดียวกันเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อดูดซับของเหลวในคลองรากฟัน แล้วนำกระดาษซับรูปกรวยแหลม 2 ชิ้นใส่ในหลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ที่บรรจุ RTF (reducing transport fluid) 1 มิลลิลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์โดยต้องนำไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 3 ชั่วโมง

**4. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Culture procedure)**

นำตัวอย่างจากคลองรากฟันมาเขย่าในเครื่องผสมเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ 20 ไมโครลิตรของแต่ละตัวอย่างมาเจือจาง (10-fold serial dilution) ด้วย phosphate-buffered saline นำตัวอย่าง (undiluted) และตัวอย่างที่เจือจางแล้วอย่างละ 10 ไมโครลิตรมาเพาะเลี้ยงบน brain-heart infusion agar เติมเลือดและวิตามินเค เพื่อหาแบคทีเรียทั้งหมด (total bacteria) และนำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรมา spread บน Enterococcosel™ Agar เพื่อใช้คัดเลือก enterococci เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobically) ด้วยไนโตรเจนร้อยละ 80 ไฮโดรเจนร้อยละ 10 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียทั้งหมดจะถูกนับ

โคโลนีที่ถูกระบุว่าเป็น enterococci จะเห็นเป็นโคโลนีใสร่วมกับมี zone สีดำ เกิดจากการย่อยสลาย bile esculin (รูปที่ 1) จะถูกนำไปทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) โดยการ streak บนอาหาร blood agar ที่เตรียมขึ้นใหม่ คุณลักษณะที่ใช้ระบุว่าเป็นเชื้อ *E. faecalis* คือ แกรมบวก รูปร่างกลม catalase-negative เป็นแบคทีเรียชนิดที่เคลื่อนที่ไม่ได้ และสามารถเจริญในอาหารที่มีส่วนประกอบของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 ดังรูปที่ 2 นำเชื้อที่ให้ผลชีวเคมีดังที่ได้กล่าวไปแล้วมายืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้ ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. faecalis* เก็บตัวเชื้อที่คัดแยกได้ใน skim milk ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

**รูปที่ 1** Enterococci จะเห็นเป็นโคโลนีใสร่วมกับมี zone สีดำบน Enterococcosel™ Agar




**รูปที่ 2** A. (1) โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5, (2) bile esculin ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ (3) motility media ตามลำดับ

B. (1) bromocresol purple indicator ในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทนเกลือ (2) Enterococci จะย่อยสลาย esculin ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำและ (3) จุลินทรีย์ชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้จะเจริญอย่างจำกัดภายใน stab-line

**5. การบ่งชี้ของเชื้อ *E. faecalis* ด้วยวิธี PCR**

**5.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)**

นำตัวอย่างเชื้อจากข้อ 4 ที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *E. faecalis* มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (PureDireX DNA extraction kit) นำดีเอ็นเอที่ได้มาหาตรวจสอบปริมาณโดยใช้วิธีด้วยอิเล็กโตรโฟริสิส (electrophoresis)

**5.2 วิธี PCR**

การระบุเชื้อ *E. faecalis* โดยใช้ PCR amplification ของลำดับ16S rRNA gene ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. faecalis* (5'-GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG-3'และ5'-CCGTCAGGGGACGTTCAG-3')[2]

ปฏิกิริยา PCR ใช้สารทั้งหมด 50 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 5 ไมโครลิตรของสารสกัดดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ 1 ไมโครโมลาร์ 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) 2 มิลลิโมลาร์ 1.25 U ของ *Tag* DNA polymerase (Invitrogen, Canada) และ 0.2 มิลลิโมลาร์ของแต่ละ deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen, Canada) โดยใช้ 5 ไมโครลิตรของสารสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก และกลุ่มควบคุม

แบบลบคือ เชื้อ *S. sanguinis* ATCC 10556 การทำงานของ PCR ประกอบด้วย การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้น 35 รอบของการจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) สำหรับเชื้อ *E. faecalis* ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพร์เมอร์ (extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย (final step) วิเคราะห์ PCR amplicons ด้วยอิเล็กโตรโฟริสิสในอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ1.5 - 2 ที่ 80 โวลต์ใน Tris-acetate-EDTA buffer ซึ่งเจลดังกล่าวจะถูกย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

**6. การหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. faecalis* โดยใช้วิธี real-time PCR**

นำตัวอย่างจากคลองรากฟันที่เหลือจากข้อ 3 มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อ *E. faecalis* โดยใช้วิธี real-time PCR

**6.1 การทำกราฟมาตรฐานของการศึกษา**

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 สำหรับทำกราฟมาตรฐานของเชื้อ *E. faecalis* และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 สำหรับทำกราฟมาตรฐานของแบคทีเรียทั้งหมด โดยทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 ให้ได้ปริมาณ $10^{1}$-$10^{10}$ CFU/mL และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ให้ได้ปริมาณ $10^{1}$-$10^{14}$ CFU/mL นำตัวอย่างดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรมาเติมในน้ำยา real-time (SensiFAST™SYBR kit, Bioline Reagent Ltd., California, USA) ซึ่งมีไพร์เมอร์จำเพาะต่อเชื้อที่ศึกษา ได้แก่ total bacteria (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' และ 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3')[52] และเชื้อ *E. faecalis* (5'-GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG-3' และ 5'-CCGTCAGGGGACGTTCAG-3')[2] นำเข้าเครื่อง real-time PCR (CFX96 Touch™ Real-Time PCR detection system Bio-Rad, USA) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น 40 รอบของ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ตามด้วย annealing temperatures ซึ่งจะมีความแตกต่างกันของเชื้อที่ศึกษา ประกอบด้วย 60 องศาเซลเซียส สำหรับ total bacteria และเชื้อ *E. faecalis* เป็นเวลา 20 วินาที ตามด้วย polymerizing temperature ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที เพื่อหา threshold cycle (Ct) หลังจากนั้นนำค่าปริมาณเชื้อที่นับได้และค่า Ct ที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน

**6.2 การหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่เก็บได้จากคลองรากฟัน**

สารสกัดดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครลิตร ในน้ำยา real-time (Sensi-FAST™SYBR kit, Bioline Reagent Ltd., California, USA) ที่มีไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อที่ศึกษาดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้อ 6.1 นำเข้าเครื่อง real-time PCR (CFX96 Touch™ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, USA) ตามปฏิกิริยาดังที่ได้กล่าวไปแล้ว หลังจากนั้นนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณตามสูตรที่ได้จากกราฟมาตรฐานข้างต้น

**7. การวิเคราะห์ข้อมูล**

7.1 ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* รายงานเป็นอัตราร้อยละของตัวอย่างที่พบ

7.2 ปริมาณเชื้อ *E. faecalis* และแบคทีเรียทั้งหมดรายงานเป็น log CFU/mL

7.3 ความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR โดยใช้ Spearman's rho

7.4 ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ เช่น เพศ ซี่ฟัน อาการ รูเปิดทางหนองไหล เคาะเจ็บหรือเสียว คุณภาพของวัสดุบูรณะ คุณภาพของวัสดุอุดคลองรากฟัน ระยะห่างของวัสดุอุดคลองรากฟันกับปลายรากฟันกับการพบเชื้อ *E. faecalis* โดยใช้ Chi-Square

# บทที่ 3

# ผลการดำเนินงานวิจัย

## ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ได้จากคลองรากฟันทั้งหมด 36 ซี่ ซึ่งได้จากฟันหน้าจำนวน 12 ซี่ ฟันกรามน้อยจำนวน 10 ซี่ และฟันกรามจำนวน 14 ซี่ ผู้ป่วยมีอายุตั้งแต่ 22 - 68 ปี อายุเฉลี่ย 46.25 ± 13.32 ปี โดยแบ่งเป็นเพศหญิงจำนวน 22 คน เพศชาย 14 คน ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่มีอาการปวดก่อนทำการรักษา มีเพียง 2 ซี่จากตัวอย่างทั้งหมด 36 ซี่ที่มีอาการปวด พบรูเปิดทางหนองไหลจำนวน 26 ซี่ มีอาการเสียวหรือปวดเมื่อเคาะจำนวน 13 ซี่ บูรณะด้วยครอบฟันจำนวน 10 ซี่ ที่เหลือบูรณะส่วนตัวฟันด้วยวัสดุอุด โดยคุณภาพของวัสดุบูรณะอยู่ในเกณฑ์ดี มีเพียง 3 ซี่ที่พบฟันผุซ้ำใต้วัสดุบูรณะ เมื่อประเมินระยะห่างของวัสดุอุดคลองรากฟันกับปลายรากฟันจากภาพรังสี โดยอยู่ในช่วง 0 – 2 มิลลิเมตร จำนวน 31 ซี่ ห่างมากกว่า 2 มิลลิเมตรจำนวน 5 ซี่ เส้นผ่าศูนย์กลางของรอยโรคปลายรากมีขนาดตั้งแต่ 2-13 มิลลิเมตร เฉลี่ย 5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** จำนวนซี่ฟันตัวอย่างที่พบเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากและข้อมูลของผู้ป่วย (n = 36)

| | | | **Cultivation (n = 11)** | **Real-time PCR (n = 32)** |
|---|---|---|---|---|
| **Sex** | **Male** | 14 | 5 | 12 |
| | **Female** | 22 | 6 | 20 |
| **Tooth** | **Anterior** | 12 | 5 | 10 |
| | **Posterior** | 24 | 6 | 22 |
| **Symptoms** | **No** | 34 | 11 | 31 |
| | **Yes** | 2 | 0 | 1 |
| **Sinus tract opening** | **No** | 26 | 8 | 23 |
| | **Yes** | 10 | 3 | 9 |

**ตารางที่ 4** (ต่อ)

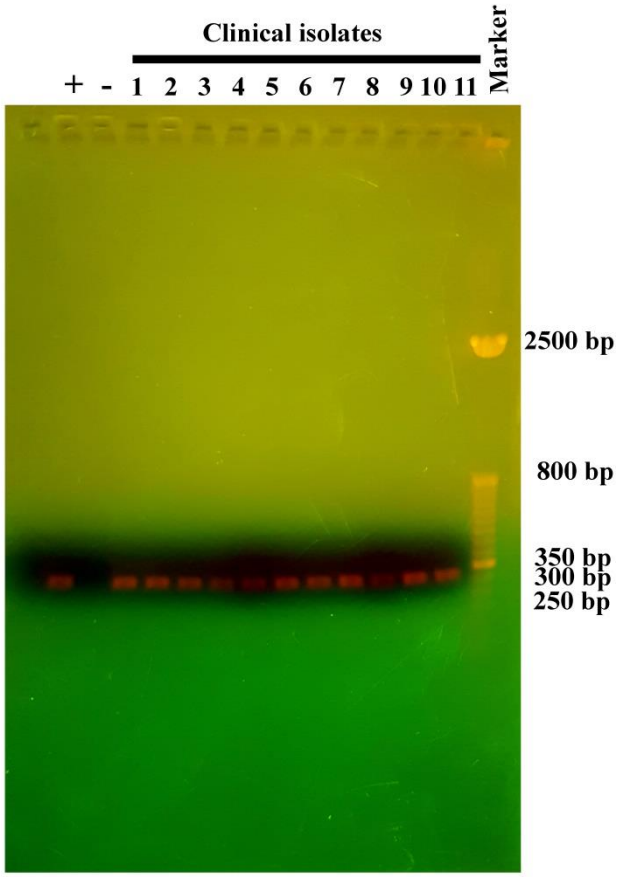
| | | | Cultivation (n = 11) | Real-time PCR (n = 32) |
|---|---|---|---|---|
| **Percussion** | **Negative** | 23 | 7 | 20 |
| | **Positive** | 11 | 3 | 10 |
| | **Pain** | 2 | 1 | 2 |
| **Restoration*** | **Intracoronal** | 26 | 6 | 23 |
| | **Extracoronal** | 10 | 5 | 9 |
| **Quality of restoration**** | **Good** | 33 | 10 | 29 |
| | **Poor** | 3 | 1 | 3 |
| **Void in the root filling** | **No** | 24 | 5 | 20 |
| | **Yes** | 12 | 6 | 12 |
| **Apical limit of the root filling** | **0-2 mm** | 31 | 10 | 27 |
| | **>2 mm** | 5 | 1 | 5 |

* Intracoronal restoration คือ การบูรณะส่วนตัวฟันด้วยการอุดด้วยวัสดุต่างๆ เช่น เรซินคอมโพสิต อะมัลกัม เป็นต้น Extracoronal restoration คือ การบูรณะส่วนตัวฟันด้วยครอบฟัน

** Good คือ คุณภาพของวัสดุบูรณะอยู่ในเกณฑ์ดี Poor คือคุณภาพของวัสดุบูรณะไม่เป็นที่น่าพอใจ เช่น พบฟันผุซ้ำใต้วัสดุบูรณะ วัสดุบูรณะแตก ชำรุด เป็นต้น

**การตรวจสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์**

ไพร์เมอร์ถูกนำมาหาความจำเพาะก่อนใช้งาน โดยนำลำดับของไพร์เมอร์เข้าโปรแกรมสำหรับตรวจสอบไพร์เมอร์ พบว่าสามารถจับกับ template ของเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 ได้ร้อยละ 100 ไพร์เมอร์ที่เลือกให้ขนาด PCR product 310 bp นำไปทดสอบความจำเพาะบน gel analysis ซึ่งสามารถตรวจจับเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 ซึ่งเป็นกลุ่มควบแบบบวกได้ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบลบโดยในการศึกษานี้เลือกใช้เชื้อ *S. sanguinis* ATCC 10556 เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถพบได้บ่อยในช่องปาก ดังรูปที่ 3




**รูปที่ 3** ความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อเชื้อ *E. faecalis* โดยมีกลุ่มควบคุมแบบบวก (+) คือ เชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 และกลุ่มควบคุมแบบลบ (-) คือ เชื้อ *S. sanguinis* ATCC 10556 และเชื้อ *E. faecalis* ในตัวอย่างที่ได้จากคลองรากฟัน

**การเปรียบเทียบความชุกและปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. faecalis* ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR**

การตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 36 ซี่ นำมาตรวจด้วย 2 วิธีคือ การเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PRC โดยพบว่าเมื่อตรวจด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถตรวจพบแบคทีเรียได้ 33 ซี่ (ร้อยละ 91.7) ในขณะที่เมื่อตรวจด้วยวิธี real-time PRC สามารถตรวจพบแบคทีเรียได้ทั้ง 36 ซี่ (ร้อยละ 100)

เมื่อทำการตรวจหาเชื้อ *E. faecalis* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่าง 11 ซี่จาก 33 ซี่ (ร้อยละ 33.3) และเมื่อตรวจด้วยวิธี real-time PRC สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่าง 32 ซี่จาก 36 ซี่ (ร้อยละ 88.9) ดังแสดงในตารางที่ 5

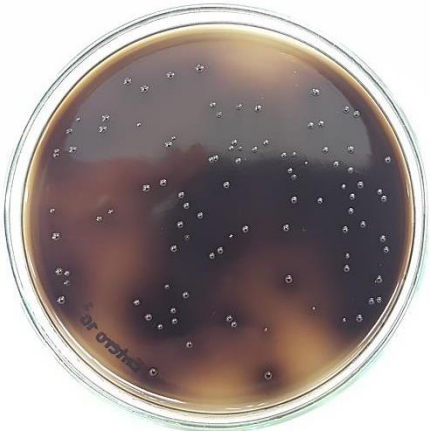
จากข้อมูลพบว่าวิธี real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวมากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อร้อยละ 84.3 เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเชื้อที่ตรวจได้พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อพบแบคทีเรียทั้งหมดเฉลี่ย 3.1 ± 1.0 log CFU/mL และเชื้อ *E. faecalis* เฉลี่ย 2.9 ± 1.1 log CFU/mL เมื่อตรวจด้วยวิธี real-time PRC พบแบคทีเรียทั้งหมดเฉลี่ย 5.9 ± 1.5 log CFU/mL และเชื้อ *E. faecalis* เฉลี่ย 4.0 ± 2.1 log CFU/mL นอกจากนี้ปริมาณเชื้อ *E. faecalis* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า $p$ = 0.000, r = 0.753 กล่าวคือหากปริมาณเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาก ปริมาณเชื้อจากวิธี real-time PCR ก็จะมากเช่นกัน และข้อมูลจากวิธี real-time PCR พบเชื้อ *E. faecalis* ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตั้งแต่ 0.3 – 1.0 เฉลี่ยเป็น 0.6 ต่อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก ดังแสดงในตารางที่ 5

นอกจากนี้พบว่าปัจจัยต่างๆเช่น เพศ ซี่ฟัน อาการ รูเปิดทางหนองไหล เคาะเจ็บหรือเสียว คุณภาพของวัสดุบูรณะ คุณภาพของวัสดุอุดคลองรากฟัน ระยะห่างของวัสดุอุดคลองรากฟันกับปลายรากฟันไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการพบเชื้อ *E. faecalis*

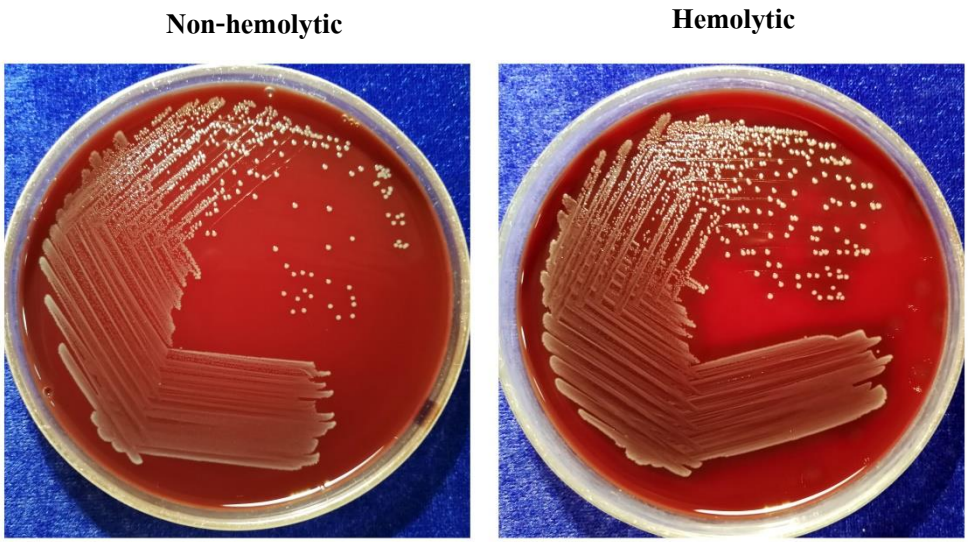
**ตารางที่ 5** ความชุกและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก (n = 36) เมื่อตรวจหาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR

| | | **Cultivation** | **Real-time PCR** |
|---|---|---|---|
| **Prevalence** | **Total bacteria** | 33/36 (91.7%) | 36/36 (100%) |
| | ***E. faecalis*** | 11/33 (33.3%) | 32/36 (88.9%) |
| **Cell numbers** | **Total bacteria** | 3.1 ± 1.0 | 5.9 ± 1.5 |
| **(log CFU/mL)** | ***E. faecalis*** | 2.9 ± 1.1 | 4.0 ± 2.1 |
| ***E. faecalis* : total bacteria (min - max)** | | 0.5 - 1.0 | 0.3 - 1.0 |
| ***E. faecalis* : total bacteria (mean)** | | 0.8 | 0.6 |

หลังจากทำการแยกเชื้อ *E. faecalis* จากตัวอย่างที่เก็บได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบน Enterococcosel™ Agar (รูปที่ 4) สามารถเก็บแยกเชื้อได้ 49 สายพันธุ์ นำเชื้อดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar พบว่า 13 จาก 49 สายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic) (รูปที่ 5) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 26.5 โดยเชื้อ *E. faecalis* ดังกล่าวแยกได้จากผู้ป่วย 3 คนจากผู้ป่วย 11 คนที่สามารถแยกเชื้อได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อคิดเป็นร้อยละ 27.3 (ตารางที่ 6)



**รูปที่ 4** Enterococci ที่แยกได้จากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบน Enterococcosel™ Agar




**รูปที่ 5** ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* บนอาหาร blood agar ชนิดไม่สลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolytic) และสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic)

**ตารางที่ 6** ร้อยละของเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดง

| ***E. faecalis*** | **Isolates (%)**<br>**n = 49** | **Case (%)***<br>**n = 11** |
|---|---|---|
| **Hemolytic** | 13/49 (26.5%) | 3/11 (27.3%) |
| **Non-hemolytic** | 36/49 (73.5%) | 9/11 (81.8%) |

* มี 1 ตัวอย่างที่พบเชื้อ *E. faecalis* ทั้งที่สลายเม็ดเลือดแดงและไม่สลายเม็ดเลือดแดง

จากข้อมูลของผู้ป่วยและซี่ฟันที่พบเชื้อ *E. faecalis* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. faecalis* ไม่แตกต่างกันทั้งในกลุ่มที่เชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงและไม่สลายเม็ดเลือดแดง ทุกตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อ *E. faecalis* ได้นั้นพบว่าได้จากผู้ป่วยที่ไม่มีอาการปวด เชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงพบในฟันที่มีรูเปิดทางหนองไหลร้อยละ 100 (2/2 ซี่) ซึ่งมากกว่าที่พบในกลุ่มที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง (ร้อยละ 12.5) และเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงทั้งหมดได้มาจากซี่ฟันที่มีอาการเมื่อเคาะ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดงซึ่งพบมีอาการเมื่อเคาะเพียงร้อยละ 12.5 นอกจากนี้ยังพบว่ารอยโรคที่ปลายรากฟันมีขนาดเฉลี่ย 8.3 มิลลิเมตรในกลุ่มที่เชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าในกลุ่มที่เชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดได้โดยมีขนาดเฉลี่ย 3.9 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 7 นอกจากนี้มี 1 ตัวอย่างที่พบเชื้อ *E. faecalis* ทั้งที่สลายเม็ดเลือดแดงและไม่สลายเม็ดเลือดแดง โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. faecalis* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ 2.5 และ 1.5 log CFU/mL ตามลำดับ และโดยวิธี real-time PCR 4.9 และ 3.4 log CFU/ mL ตามลำดับ ซึ่งได้มาจากผู้ป่วยที่ไม่มีอาการก่อนการรักษา มีอาการเมื่อเคาะแต่ไม่พบรูเปิดทางหนองไหล และมีรอยโรคปลายรากขนาด 2 มิลลิเมตร

**ตารางที่ 7** ข้อมูลของผู้ป่วยและซี่ฟันที่พบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง

| | | | ***E. faecalis*** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Hemolytic (n = 2)** | **Non-hemolytic (n=8)** |
| **Cell numbers (log CFU/mL)** | **Cultivation** | **Total bacteria** | 4.0 ± 0.0 | 3.6 ± 1.3 |
| | | ***E. faecalis*** | 2.9 ± 1.0 | 3.1 ± 1.0 |
| | **Real-time PCR** | **Total bacteria** | 8.3 ± 0.0 | 7.6 ± 1.0 |
| | | ***E. faecalis*** | 7.5 ±0.4 | 6.4 ± 1.2 |
| **Sinus tract opening** | | **No** | - | 7/8 (87.5%) |
| | | **Yes** | 2/2 (100%) | 1/8 (12.5%) |
| **Percussion** | | **Negative** | - | 7/8 (87.5%) |
| | | **Positive / Pain** | 2/2 (100%) | 1/8 (12.5%) |
| **Diameter of lesion (mm)** | | | 8.3 | 3.9 |

# บทที่ 4

# บทวิจารณ์

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าเชื้อ *E. faecalis* พบได้บ่อยในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก[2-10] และมีโอกาสที่จะพบเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันมากกว่าในฟันที่เป็นการติดเชื้อปฐมภูมิถึง 9 เท่า[5] สันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อ *E. faecalis* สามารถทนต่อกระบวนการรักษาคลองรากฟันตามมาตรฐานได้ โดยสามารถทนต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟัน[15] มีความไวต่ำต่อน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้างคลองรากฟัน[53]และคลินดามัยซิน (clindamycin)[54] สามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟัน [16, 17] ทำให้สามารถหลบเลี่ยงจากการกำจัดด้วยเครื่องมือขยายคลองรากฟัน นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอาหารจำกัดได้เป็นเวลาหลายเดือน โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในคลองรากฟันที่ได้รับการอุดคลองรากฟันแล้วนั้นได้รับสารอาหารจากของเหลวภายในท่อเนื้อฟันและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน[55] ซึ่งเป็นสารลักษณะคล้ายซีรั่มที่ได้รับจากกระดูกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยรอบและอาจมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์[16] นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* ยังมีการแสดงออกของยีนที่ช่วยในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมต่างๆได้[56]

การศึกษาความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากโดยส่วนใหญ่จะทำด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อหรือวิธีการศึกษาระดับโมเลกุล จากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีการศึกษาระดับโมเลกุลนั้นมีความไวและประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *E. faecalis* มากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ[7, 9, 23, 25, 49, 57] Real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถตรวจจับดีเอ็นเอจากเชื้อที่ตายแล้วและเชื้อที่มีชีวิตที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ รวมถึงเชื้อที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้[9] โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีลักษณะ phenotype เบี่ยงเบนไปจากปกติ เป็นเทคนิคที่ทำได้รวดเร็วและมีการปนเปื้อนต่ำ[58] สามารถระบุเชื้อและปริมาณได้อย่างแม่นยำ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ *E. faecalis* ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้เข้าใจลักษณะ phenotype ร่วมถึงพยาธิกำเนิดที่ก่อให้เกิดโรคในคลองรากฟันได้มากยิ่งขึ้น

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากร้อยละ 33.3 (11/33 ซี่) เมื่อตรวจด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่เมื่อทำการตรวจด้วยวิธี real-time PCR พบความชุกของเชื้อที่สูงกว่าคือร้อยละ 88.9 (32/36 ซี่) ซึ่งใกล้เคียงกับหลายๆการศึกษาที่ทำการศึกษาในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอย

โรคปลายรากเช่นเดียวกัน โดยมีการรายงานความชุกของเชื้อ *E. faecalis* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ร้อยละ 30.3 – 47[3, 10, 13, 24, 39, 47] และร้อยละ 64 – 89.6 จากวิธี PCR และ real-time PCR[2, 5, 7-9, 24] อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้แตกต่างกับผลการศึกษาของ Fouad และคณะ[48]และ Rocas และ Siqueira [6] ที่ใช้วิธีการศึกษาระดับโมเลกุลแต่พบความชุกของเชื้อ *E. faecalis* เพียงร้อยละ 22 และ 38 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีบางการศึกษาที่ไม่พบเชื้อ *E. faecalis* เลย[14, 21] ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจาก วิธีการเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน ความแตกต่างทางภูมิศาสตร์[22, 59] ลักษณะการรั่วของวัสดุบูรณะส่วนตัวฟัน อาหารที่รับประทานที่แตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร[48, 60, 61] นอกจากนี้วิธีการและขั้นตอนในการรักษาคลองรากฟันก็อาจมีผลต่อการพบเชื้อ *E. faecalis* เช่น ชนิดของน้ำยาล้างคลองรากฟัน สารมาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟัน โดยในประเทศไทยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นสารมาตรฐานที่ใส่ในคลองรากฟัน อาจมีผลต่อความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่นๆที่อาจใช้สารใส่ในคลองรากฟันที่แตกต่างไป เช่น ไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (iodine potassium-iodide) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ดีกว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์[62]

ในการศึกษานี้ไม่สามารถแยกแบคทีเรียด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก 3 ซี่จาก 36 ซี่ คิดเป็นร้อยละ 8.3 ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไม่สามารถแยกแบคทีเรียจากบางตัวอย่างได้เช่นกัน โดยไม่สามารถแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วงร้อยละ 15 - 56[3, 4, 10, 13, 14, 20, 46] ทั้งนี้อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การที่เชื้ออยู่ในท่อเนื้อฟันหรืออยู่ในตำแหน่งที่กระดาษซับรูปกรวยแหลมไม่สามารถเก็บเชื้อได้ วัสดุอุดคลองรากที่เหลือภายในคลองรากฟันไปปิดกั้นไม่ให้น้ำเกลือที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเข้าถึงบริเวณที่มีเชื้ออยู่[3] หรือการที่เชื้อสัมผัสกับอากาศระหว่างการเก็บตัวอย่างหรือการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจไปทำลายเชื้อกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน[63] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้พยายามลดข้อจำกัดเหล่านี้โดยมีการตะไบผนังคลองรากฟันโดยรอบเพื่อให้มีโอกาสได้เชื้อที่อยู่ท่อเนื้อฟันออกมามากขึ้นและนำตัวอย่างจากคลองรากฟันที่ได้ไปยังห้องปฏิบัติการ โดยทันทีเพื่อช่วยลดความเสี่ยงที่แบคทีเรียจะถูกทำลายระหว่างการนำส่ง

การที่ไม่สามารถแยกเชื้อ *E. faecalis* จากคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR จากบางตัวอย่างได้นั้น มีความเป็นไปได้ที่รอยโรคปลายรากที่เกิดขึ้นอาจไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อภายในคลองรากฟันซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว รอยโรคปลายรากดังกล่าวอาจเป็นถุงน้ำปลายรากฟัน (periapical cyst) ปฏิกิริยาของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอม (foreign body reaction) หรือเป็นการติดเชื้อภายนอกคลองรากฟันซึ่งส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับเชื้อชนิดอื่นก็เป็นได้[30]

จากข้อมูลปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. faecalis* ผลจากวิธี real-time PCR พบเชื้อ *E. faecalis* ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดได้ตั้งแต่ร้อยละ 24.7 - 95.7 เฉลี่ยเป็นร้อยละ 64.3 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Sedgley และคณะ[9] และ Rocas และคณะ[6] ซึ่งพบเชื้อ *E. faecalis* ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.14 – 100 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของเชื้อ *E. faecalis* ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยคือ 0.8 ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ได้จากวิธี real-time PCR คือ 0.6 ทั้งนี้อาจเกิดจากความไวในการตรวจพบเชื้อของแต่ละวิธี โดยวิธี PCR นั้นสามารถตรวจพบแบคทีเรียในตัวอย่างได้แม้มีปริมาณเพียง 1-10 เซลล์ แต่หากใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องมีแบคทีเรียปริมาณ $10^4$ -$10^5$ เซลล์ถึงจะสามารถตรวจพบได้และต้องมีแบคทีเรียปริมาณ $10^3$ เซลล์จึงจะสามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อเลือกใช้ selective media[49] ดังนั้นปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในตัวอย่างต้องมีปริมาณมากถึงจะสามารถตรวจพบด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี real-time PCR ที่มีความไวสูง สามารถตรวจจับดีเอ็นเอที่หลงเหลืออยู่ ดีเอ็นเอจากเชื้อที่ตายแล้วและจากเชื้อที่มีชีวิตที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้[9] จึงทำให้ปริมาณของเชื้อ *E. faecalis* ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อสูงกว่าวิธี real-time PCR

เมื่อนำเชื้อ *E. faecalis* ที่แยกได้จาก selective media มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar แล้วนำไปยืนยันด้วยการตรวจทางชีวเคมีคือ motility test ซึ่งเชื้อ *E. faecalis* จะเจริญอย่างจำกัดภายใน stab-line และสามารถเจริญบนอาหารที่มีส่วนประกอบของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และบนอาหารที่มีส่วนประกอบของเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 ได้ และนำเชื้อดังกล่าวมายืนยันทางโมเลกุลด้วยวิธี PCR โดยใช้ ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. faecalis* จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดพบว่ามี 13 จาก 49 สายพันธุ์ที่สลายเม็ดเลือดแดงคิดเป็นร้อยละ 26.5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Semedo และคณะ[64] ซึ่งพบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงจากตัวอย่างทางคลินิกร้อยละ 33 และการศึกษาของ Sedgley และคณะ[65] พบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงจากตัวอย่าง oral rinse ของผู้ป่วยที่มีประวัติการรักษาคลองรากฟันร้อยละ 36.4 อย่างไรก็ตาม Reynaud af Geijersstam และคณะ[66] พบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากเพียงร้อยละ 9

จากการศึกษาของ Ike และคณะ[67] พบว่าสายพันธุ์ที่สลายเม็ดเลือดแดงแสดงลักษณะของการดื้อยาได้บ่อยกว่าสายพันธุ์ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดงแสดงให้ว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงอาจก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงมากกว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งเชื้อ *E. faecalis* ทั้ง 13 สายพันธุ์ที่สลายเม็ดเลือดแดงนี้แยกได้จากฟันที่มีอาการเมื่อเคาะและพบรูเปิดทางหนองไหลทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือด

แดงพบได้ในฟันที่มีอาการดังกล่าวเพียงร้อยละ 12.5 เชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงเกิดจาก cytolysin ซึ่งเป็น toxin ที่พบได้ในเชื้อ *E. faecalis* โดย cytolysin จะถูกผลิตออกมามากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และปัจจัยทางสภาพแวดล้อมของบริเวณที่มีการติดเชื้อจะกระตุ้นการทำงานของยีนชนิดนี้[68] ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อ *E. faecalis* กับอาการและความรุนแรงของโรคจึงเป็นหัวข้อที่ควรศึกษาในรายละเอียดต่อไป นอกจากนี้มีหนึ่งตัวอย่างที่พบเชื้อ *E. faecalis* ทั้งที่สลายเม็ดเลือดแดงและไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งได้จากซี่ฟันที่มีอาการเมื่อเคาะ แต่ไม่พบรูเปิดทางหนองไหล สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอาสาสมัครหนึ่งคนสามารถพบเชื้อ *E. faecalis* ได้หลายสายพันธุ์[66, 69]

เมื่อนำปัจจัย เพศ ซี่ฟัน อาการ รูเปิดทางหนองไหล เคาะเจ็บหรือเสียว คุณภาพของวัสดุบูรณะ คุณภาพของวัสดุอุดคลองรากฟัน ระยะห่างของวัสดุอุดคลองรากฟันกับปลายรากฟัน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ[7, 70] และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคปลายรากก็ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ *E .faecalis* แม้ว่าใน primary apical periodontitis จำนวนสายพันธุ์และปริมาณเชื้อจะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับขนาดของรอยโรคปลายราก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Peciuliene และคณะ[46] ที่กล่าวว่าความแตกต่างของปริมาณเชื้อไม่ได้สะท้อนถึงขนาดของรอยโรคปลายรากในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก

การศึกษานี้สามารถแยกเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงจากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก และมีการบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับซี่ฟัน อาการแสดงทางคลินิกและลักษณะของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันของซี่ฟันดังกล่าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาปัจจัยการก่อโรค (virulence factor) และความสามารถในการเกิดโรค (pathogenesis) ต่อไป

# บทที่ 5

# บทสรุปและข้อเสนอแนะ

## สรุปผลการวิจัย

การติดเชื้อภายในคลองรากฟันยังคงเป็นสาเหตุหลักของฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก โดยการศึกษานี้พบความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากร้อยละ 33.3 (11/33 ซี่) ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อและร้อยละ 88.9 (32/36 ซี่) ด้วยวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecalis* อาจมีส่วนเกี่ยวข้องและเป็นสาเหตุของฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงคิดเป็นร้อยละ 26.5 (13/49 สายพันธุ์) และเชื้อ *E. faecalis* ที่สลายเม็ดเลือดแดงมีแนวโน้มสัมพันธ์กับอาการแสดงทางคลินิกที่รุนแรงกว่า เป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีปัจจัยการก่อโรคที่รุนแรงกว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งต้องทำการศึกษาเพื่อยืนยันต่อไป

## ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้มีความเข้าใจบทบาทของจุลินทรีย์ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากมากขึ้น ควรมีการศึกษาจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่อยู่ในคลองรากฟันร่วมด้วย นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* ที่แยกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ควรนำไปศึกษาปัจจัยการก่อโรคและความสามารถในการเกิดโรคเพื่อให้เกิดความเข้าใจเชื้อ *E. faecalis* มากยิ่งขึ้น

# เอกสารอ้างอิง


1. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. ***Int Endod J*** 2001; 34: 1-10.
2. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2004; 97: 85-94.
3. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. ***Int Endod J*** 1998; 31: 1-7.
4. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. ***Int Endod J*** 2003; 36: 1-11.
5. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. ***J Endod*** 2004; 30: 315-20.
6. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. ***J Clin Microbiol*** 2012; 50: 1721-4.
7. Zoletti GO, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Identification of Enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. ***J Endod*** 2006; 32: 722-6.
8. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. ***J Endod*** 2004; 30: 504-8.
9. Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root canals. ***J Endod*** 2006; 32: 173-7.
10. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 1998; 85: 86-93.

11. Antunes HS, Rocas IN, Alves FR, Siqueira JF, Jr. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. ***J Endod*** 2015; 41: 1037-42.

12. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. ***Anaerobe*** 2017; 48: 12-8.

13. Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2001; 91: 579-86.

14. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. ***Oral Microbiol Immunol*** 2001; 16: 332-7.

15. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. ***Int Endod J*** 2002; 35: 221-8.

16. Love RM. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. ***Int Endod J*** 2001; 34: 399-405.

17. Siqueira JF, Jr., De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. ***J Endod*** 1996; 22: 308-10.

18. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. ***J Endod*** 2002; 28: 689-93.

19. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. ***J Endod*** 2006; 32: 93-8.

20. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population. ***J Endod*** 2000; 26: 593-5.

21. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. ***J Clin Microbiol*** 2001; 39: 3282-9.

22. Baumgartner JC, Siqueira JF, Jr., Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. ***J Endod*** 2004; 30: 141-4.

23. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. ***J Endod*** 2005; 31: 411-23.

24. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2006; 102: 247-53.

25. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of E. faecalis by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. ***J Endod*** 2006; 32: 715-21.

26. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. ***Int Endod J*** 2011; 44: 583-609.

27. de Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, Marquis V, Farzaneh M, Abitbol S, et al. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study--phase 4: initial treatment. ***J Endod*** 2008; 34: 258-63.

28. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spangberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2011; 112: 825-42.

29. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. ***J Endod*** 1990; 16: 498-504.

30. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. ***Int Endod J*** 2006; 39: 249-81.

31. Sjogren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of Arachnia propionica in periapical tissue. ***Int Endod J*** 1988; 21: 277-82.

32. Sundqvist G, Reuterving CO. Isolation of Actinomyces israelii from periapical lesion. ***J Endod*** 1980; 6: 602-6.

33. Sjogren U, Sundqvist G, Nair PN. Tissue reaction to gutta-percha particles of various sizes when implanted subcutaneously in guinea pigs. ***Eur J Oral Sci*** 1995; 103: 313-21.

34. Nair PN, Sjogren U, Sundqvist G. Cholesterol crystals as an etiological factor in non-resolving chronic inflammation: an experimental study in guinea pigs. ***Eur J Oral Sci*** 1998; 106: 644-50.

35. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. ***J Endod*** 1980; 6: 845-8.

36. Nair PN, Sjogren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 1999; 87: 617-27.

37. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2002; 94: 281-93.

38. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. ***J Clin Microbiol*** 2002; 40: 3223-31.

39. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. ***Oral Microbiol Immunol*** 2004; 19: 71-6.

40. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. ***Oral Microbiol Immunol*** 2008; 23: 275-81.

41. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. ***Int Endod J*** 2006; 39: 484-92.

42. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. ***J Endod*** 2010; 36: 45-52.

43. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. ***Oral Microbiol Immunol*** 2007; 22: 19-23.

44. Portenier I, Haapasalo M, Waltimo T. Enterococcus faecalis– the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. ***Endod Topics*** 2003; 6: 135-59.

45. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. ***Microbiology*** 2009; 155: 1749-57.

46. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. ***Int Endod J*** 2001; 34: 429-34.

47. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. ***Oral Microbiol Immunol*** 2003; 18: 100-3.

48. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2005; 99: 112-8.

49. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. ***J Dent*** 2003; 31: 333-9.

50. Daniel WW. Biostatistics: a foundation for analysis in the health science. 6 ed. Singapore: John Wiley & Sons, Inc.; 1995.

51. Ng YL, Spratt D, Sriskantharajah S, Gulabivala K. Evaluation of protocols for field decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. ***J Endod*** 2003; 29: 317-20.

52. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. ***Microbiology*** 2002; 148: 257-66.

53. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. ***Endod Dent Traumatol*** 1990; 6: 142-9.

54. Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis. ***Int Endod J*** 1990; 23: 113-8.

55. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of Enterococcus faecalis in human serum. ***Oral Microbiol Immunol*** 2003; 18: 234-9.

56. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. ***Clin Microbiol Rev*** 1994; 7: 462-78.

57. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. ***J Clin Microbiol*** 2002; 40: 1698-704.

58. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? ***Nat Rev Microbiol*** 2004; 2: 151-9.

59. Siqueira JF, Jung IY, Rocas IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2005; 99: 641-7.

60. Kampfer J, Gohring TN, Attin T, Zehnder M. Leakage of food-borne Enterococcus faecalis through temporary fillings in a simulated oral environment. ***Int Endod J*** 2007; 40: 471-7.

61. Vidana R, Rashid MU, Ozenci V, Weintraub A, Lund B. The origin of endodontic Enterococcus faecalis explored by comparison of virulence factor patterns and antibiotic resistance to that of isolates from stool samples, blood cultures and food. ***Int Endod J*** 2016; 49: 343-51.

62. Safavi KE, Spangberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. ***J Endod*** 1990; 16: 207-10.

63. Loesche WJ. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. ***Appl Microbiol*** 1969; 18: 723-7.

64. Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci. ***J Clin Microbiol*** 2003; 41: 2569-76.

65. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. ***Oral Microbiol Immunol*** 2004; 19: 95-101.

66. Reynaud af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Roslie E, Peciuliene V, et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of

Finnish and Lithuanian endodontic Enterococcus faecalis isolates. ***Oral Microbiol Immunol*** 2007; 22: 87-94.

67. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by Enterococcus (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections. ***J Clin Microbiol*** 1987; 25: 1524-8.

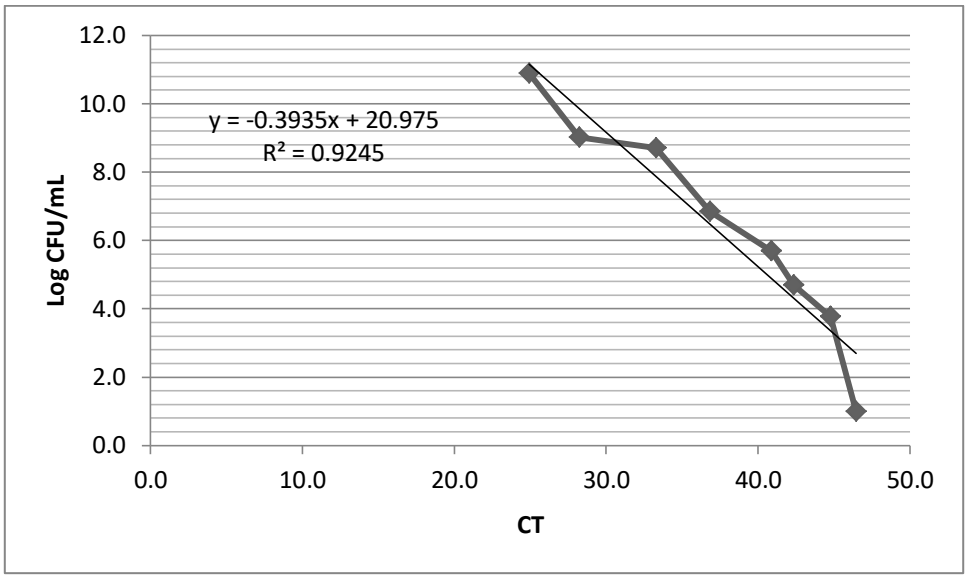
68. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. ***Crit Rev Oral Biol Med*** 2004; 15: 308-20.

69. Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BP, Drucker DB. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. ***Oral Microbiol Immunol*** 2006; 21: 137-44.

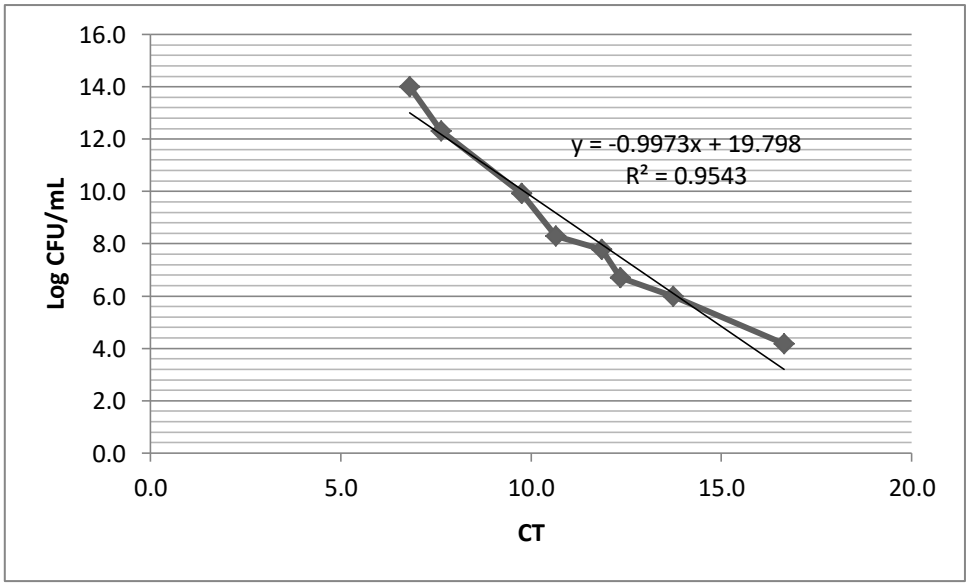
70. Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of Enterococcus faecalis in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. ***Int J Oral Sci*** 2012; 4: 19-23.

# ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**




**รูปที่ 6** กราฟมาตรฐานของเชื้อ *E. faecalis*




**รูปที่ 7** กราฟมาตรฐานของแบคทีเรียทั้งหมด

## ภาคผนวก ข

**ตารางที่ 8** ความไวของการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี real-time PCR

| Case | Cultivation | Real-time PCR | Sensitivity | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *E. faecalis* (log CFU/mL) | *E. faecalis* (log CFU/mL) | Cultivation | Real-time PCR | % Sensitivity of real-time PCR above cultivation |
| **1** | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **2** | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **3** | 4.0 | 8.6 | 46.0 | 100 | 54.0 |
| **4** | 0.0 | 3.7 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **5** | 2.0 | 4.3 | 47.0 | 100 | 53.0 |
| **6** | 0.0 | 2.8 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **7** | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **8** | 2.8 | 6.4 | 44.0 | 100 | 56.0 |
| **9** | 3.9 | 7.9 | 48.7 | 100 | 51.3 |
| **12** | 3.3 | 6.9 | 48.1 | 100 | 51.9 |
| **13** | 4.6 | 6.6 | 70.2 | 100 | 29.8 |
| **14** | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **16** | 0.0 | 2.1 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **17** | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **18** | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **19** | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **21** | 0.0 | 2.4 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **22** | 0.0 | 2.7 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **23** | 0.0 | 4.8 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **24** | 0.0 | 3.6 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **25** | 0.0 | 2.7 | 0.0 | 100 | 100.0 |

**ตารางที่ 8** (ต่อ)

| Case | Cultivation | Real-time PCR | Sensitivity | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis*** **(log CFU/mL)** | ***E. faecalis*** **(log CFU/mL)** | **Cultivation** | **Real-time PCR** | **% Sensitivity of real-time PCR above cultivation** |
| **26** | 1.8 | 7.0 | 26.3 | 100 | 73.7 |
| **27** | 3.6 | 5.9 | 60.7 | 100 | 39.3 |
| **28** | 0.0 | 2.6 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **29** | 0.0 | 2.5 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **30** | 1.5 | 3.4 | 43.5 | 100 | 56.5 |
| **31** | 0.0 | 2.4 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **32** | 2.4 | 5.6 | 43.8 | 100 | 56.2 |
| **33** | 1.7 | 6.9 | 24.7 | 100 | 75.3 |
| **34** | 0.0 | 4.7 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **35** | 0.0 | 4.5 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **36** | 0.0 | 4.6 | 0.0 | 100 | 100.0 |
| **Mean** | | | | | 84.3 |

หมายเหตุ: มี 4 ตัวอย่างที่ถูกตัดออกเนื่องจากไม่พบเชื้อ *E. faecalis* ด้วยวิธี real-time PCR

# ภาคผนวก ค

## หนังสือรับรองผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
อาคาร 1 ชั้น 5 ห้อง 504
โทรศัพท์. 074-287533, 074-287504

คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
15 ถนนกาญจนวณิชย์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

### หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า

**โครงการวิจัยเรื่อง** ความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี Real-Time Quantitative PCR (qPCR) และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

**รหัสโครงการ** EC6110-36-P-LR

**หัวหน้าโครงการ** ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล

**สังกัด** ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์

**ผู้ร่วมวิจัย** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ / ทันตแพทย์หญิงภัทรมน ประไพสิทธิ์

**สังกัด** ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์

**เอกสารที่รับรอง:**

- ☑ แบบเสนอโครงการวิจัย
- ☑ โครงร่างการวิจัย
- ☑ ใบเชิญชวน
- ☑ ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา
- ☑ อื่น ๆ
  - ☑ แบบบันทึกข้อมูล

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย (Research Ethics Committee) ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาศึกษาการวิจัยในคนของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

**บรรจุในวาระการประชุมครั้งที่** 10/2561 **วาระที่** 3.2.1 **วันที่** 8 พฤศจิกายน 2561

**ขอให้ผู้วิจัยรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย ทุก ๆ 12 เดือน และยื่นต่ออายุก่อนถึงวันหมดอายุอย่างน้อย 30 วัน** (กรณีโครงการวิจัยเข้าข่าย Exemption Determination ไม่ต้องรายงานความก้าวหน้าต่อคณะกรรมการจริยธรรม แต่ขอให้รายงานสรุปโครงการวิจัยเมื่อสิ้นสุดโครงการ)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.ไชยรัตน์ เฉลิมรัตนโรจน์)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

**วันที่รับรอง :** 25 ตุลาคม 2561

**วันหมดอายุ :** 24 ตุลาคม 2562

# หนังสือแจ้งผลการพิจารณาแก้ไขเปลี่ยนแปลง/เพิ่มเติมโครงการวิจัย

ที่ อว. 6801.03/ 1578

คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
15 ถนนกาญจนวณิชย์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

**หนังสือแจ้งผล**
**การพิจารณาการแก้ไขเปลี่ยนแปลง/เพิ่มเติมโครงการวิจัย**

วันที่ 29 พฤศจิกายน 2562

**เรื่อง** ผลการประเมินด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ รายงานการแก้ไขเพิ่มเติมโครงการวิจัย

**เรียน** ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล ภาควิชาโอษฐวิทยา

ตามที่ท่านเสนอ รายงานการขอเปลี่ยนแปลง/เพิ่มเติมโครงการวิจัย (Amendment) เพื่อขอรับพิจารณา

**รหัสโครงการ** EC6110-36-P-LR

**เรื่อง** (ภาษาไทย) การศึกษาความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี real-time PCR และ การเพาะเลี้ยงเชื้อ

(ภาษาอังกฤษ) Prevalence of Enterococcus faecalis detected by real-time PCR and cultivation in failed root canal treated teeth with periradicular lesions

**หัวหน้าโครงการ** ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล

**รายการที่ขอแก้ไขเพิ่มเติมประกอบด้วย**

1. ขอเปลี่ยนแปลงชื่อโครงการ ภาษาไทย **จาก** ความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี Real-time quantitative PCR (qPCR) และการเพาะเลี้ยงเชื้อ **เป็น การศึกษาความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี real-time PCR และ การเพาะเลี้ยงเชื้อ**
2. ขอเปลี่ยนแปลงชื่อโครงการ ภาษาอังกฤษ **จาก** Prevalence of *Enterococcus faecalis* by Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Cultivation in Failed Root Canal Treated Teeth with Periradicular Lesions **เป็น** Prevalence of ***Enterococcus faecalis*** **detected by real-time PCR and cultivation in failed root canal treated teeth with periradicular lesions**

/รายงาน..

รายงานดังกล่าว ได้รับทราบในที่ประชุมคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ครั้งที่ 12/2562 เมื่อวันที่ 26 ธันวาคม 2562

คณะกรรมการมีมติคือ **รับรอง**

จึงเรียนมาเพื่อทราบ และขอให้ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยด้วยขั้นตอนและเอกสารที่ได้รับการรับรองและเป็นปัจจุบัน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)
เลขานุการคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
คณะทันตแพทยศาสตร์

# ประวัติผู้เขียน

**ชื่อ สกุล** นางสาวภัทรมน ประไพสิทธิ์

**รหัสประจำตัวนักศึกษา** 5910820012

**วุฒิการศึกษา**

| วุฒิ | ชื่อสถาบัน | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
|---|---|---|
| ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | 2556 |

**ทุนการศึกษา**

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2561 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2561 จากกองทุนวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน**

ทันตแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลระโนด อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา

**การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน**

ภัทรมน ประไพสิทธิ์, รวี เถียรไพศาล, เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์. ความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ.การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติมหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9; วันศุกร์ที่ 29 พฤศจิกายน 2562; ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. นนทบุรี, ประเทศไทย; 2562: 1872-86