

จุดประสงค์ เพื่อตรวจหาแบคทีเรียชนิด Black-pigment bacteroides 4 สายพันธุ์ *Porphyromonas gingivaris*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*.

*Enterococcus faecalis* *Actinomyces israelii* *Candida albicans* ในคลองรากฟันภายหลังการขยายคลองรากฟันและหลังผล culture negative ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) วัสดุและวิธีการ เก็บตัวอย่างน้ำในคลองรากฟันรากเดียวที่มีการอักเสบติดเชื้อในคลองรากฟัน จำนวน 10 ซี่ โดยทำการเก็บน้ำในคลองรากฟันใน 2 ช่วงเวลา คือ หลังการขยายคลองรากฟันและหลังผล culture negative (20 ตัวอย่าง) จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำน้ำจากคลองรากฟันไปเพาะเลี้ยงใน Thioglycollate broth สภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนที่สองนำน้ำจากคลองรากฟันไปเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเลือด 5 % ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ส่วนที่สาม นำน้ำจากคลองรากฟันไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาแบคทีเรีย Black-pigmented bacteroides 4 สายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* *Actinomyces israelii* *Candida albicans* ที่สนใจด้วยเทคนิค PCR วิเคราะห์ปริมาณไฮยาลูโรแนนด้วยเทคนิค Competitive ELISA

ผลการทดลอง จำนวน 7 ตัวอย่างมีการขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงในหลอด Thioglycollate broth และผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเลือด 5% ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่าปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 และมี 1 ตัวอย่างที่พบลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลดำ ส่วนผลการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR แสดงให้เห็นว่า จำนวน 19 จาก 20 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหลังการขยายคลองรากฟันและหลังผล culture negative แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่เป็นเป้าหมาย ไม่พบแบคทีเรีย black-pigmented bacteroides ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ศึกษา *Enterococcus faecalis* *Actinomyces israelii* *Candida albicans*

สรุป เทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียขณะที่ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Thioglycollate broth และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเลือด 5% ตรวจไม่พบแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปวิเคราะห์ สายพันธุ์ที่เป็นเป้าหมายปรากฏว่าทุกตัวอย่างไม่พบ Black-pigmented bacteroides ทั้ง 4 สายพันธุ์ รวมทั้ง *Enterococcus faecalis* *Actinomyces israelii* *Candida albicans* สามสารตรวจพบไฮยาลูโรแนน ในน้ำของคลองรากฟัน และไม่พบวาระดับของไฮยาลูโรแนนสัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียที่ตรวจพบได้จากการศึกษาในครั้งนี้

**Objective:** This study was to detect the presence of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans* and hyaluronan in root canal exudates. **Methodology:** After mechanical instrumentation and after negative culture results, using multiplex polymerase chain reactions (PCR). Exudates of 10 single-root canals with endodontic infection were collected after mechanical instrumentation and after negative culture result. Bacteria were cultured (1) in thioglycollate broth and (2) in blood agar media under either aerobic or anaerobic conditions and the number of colony forming units/ml (CFUs/ml) were counted. The DNA of all twenty samples were extracted in order to detect black-pigmented bacteroides (BPB) by multiplex PCR. Two different multiplex PCRs were used (one for the two *Porphyromonas* species and the other for the two *Prevotella* species), each one using a primer pair specific for each selected species. Hyaluronan was determined by competitive ELISA. **Results:** Seven samples cultured in the thioglycollate broth under aerobic conditions had positive results. The number of bacteria counted in blood agar media under either aerobic or anaerobic conditions tended to decrease after the second sample collection. Black colonies were found in only one sample. The PCR results showed nineteen out of twenty samples were positively detected after either mechanical instrumentation or negative culture result. Using multiplex PCR the four selected species of BPB were not found in any of the samples. This study demonstrated that PCR can detect the presence of bacteria when culture techniques using thioglycollate broth and blood agar media yield negative results. However, the four selected species of BPB and also *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans* were not found in our experimental conditions. The correlation coefficient and p value for HA and total bacterial colonization were 0.405\* and 0.014 respectively. For HA and anaerobes were -0.064 and 0.710 and those for HA and aerobes were 0.266 and 0.116. **Conclusion:** It can be concluded that HA concentration could be measured in root canal exudates. And, HA has a potential to be used as a useful biomarker of disease activity in endodontics infection.