Thesis Title Oral Bacteria Species in Patients with Acute Endodontic Abscess/Cellulitis and Their Coaggregation Effects on Bacterial Killing of Polymorphonuclear Phagocytes

Author Mrs. Saengusa Khemaleelakul

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn	Chair person
Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombat	Member
Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul	Member

ABSTRACT

Acute periradicular abscesses are polymicrobial infections originated from endodontic origin. Specific mixtures of microbial species that are implicated in the pathogenesis of periradicular diseases are still unknown, but it is conceivable that the most frequently isolated microbial species may make a major contribution to the ecology of the community colonizing the root canal system and consequently to the degree of pathogenicity of the consortium. In the present study, purulence from 17 patients with acute endodontic abscesses/cellulitis were obtained by needle aspiration and processed under anaerobic conditions. Bacteria were isolated and identified by biochemical or 16S rRNA gene sequencing methods. All 17 aspirates contained a mix of microorganisms. The mean number of strains per sample was 7.3. A total of 125 strains of bacteria were isolated from 17 aspirates. Of 125 strains, 68 strains were anaerobes and 57 strains were aerobes. Anaerobes were the dominant bacteria in 82% (14/17) of the cases. *Prevotella* and *Peptostreptococcus* were frequently found to dominate the mixture. The genera of bacteria most frequently encountered were *Prevotella*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Peptostreptococcus*.

Biofilms and microbial aggregates are common mechanisms for the survival of bacteria in nature. These microbial interactions may contribute to their pathogenic effects on abscess/cellulitis formation. We determined the autoaggregation and coaggregation among bacterial pairs from each of 10 abscess samples by conventional visual assay and a novel fluorescent dye-staining technique in combination with confocal laser- scanning microscopy. Autoaggregation was found in 56.45% (35/62) of strains tested. Coaggregation of bacteria was demonstrated for 15.85% (29/183) of bacterial pairs using the visual assay and 80.87% (148/183) using the dye-staining assay. Coaggregation was observed for each of the 15 genera assayed, especially *Prevotella*, *Streptococcus,* and *Fusobacterium.* Intrageneric coaggregation was found among the members of the genus *Prevotella, Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Corynebacterium.*

The role of microbial coaggregation on the killing ability of PMNs was then demonstrated by bacterial killing assay and fluorescent microscopic observation, using a coaggregated bacterial pairs (*S. gordonii and P. melaninogenicus*) and spontaneously occurring coaggregation-defective mutants of *P. melaninogenicus* (A2, H3, H11). Under the condition tested in this study, coaggregation between the bacterial pairs caused greater bacterial killing by the PMNs and seemed to promote more PMN accumulation and cytolysis than the counterparts containing coaggregation-defective mutants.

In conclusion, the present results confirm the existence of mixed infection with the predominance of anaerobic bacteria in acute endodontic abscesses/cellulitis. The frequency of *Prevotella* spp. suggests the possible key role of this species in acute endodontic infections. The dye-staining coaggregation assay is a useful and highly sensitive tool to examine the coaggregation ability of bacteria. The ability of *Prevotella* spp. to generate intrageneric and multiple intergeneric coaggregations may play a key role in pathogenicity of endodontic infection. Coaggregated bacteria were better killed by PMNs but promoted more PMN accumulation and local death. This phenomenon is a major cause for tissue breakdown in acute phases of periradicular infection.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยคลองรากฟันอักเสบแบบเฉียบพลัน และผลของการจับกลุ่มของเชื้อต่อการถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว

ผู้เขียน นางแสงอุษา เขมาลีลากุล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สุมาลี พฤกษากร ประธานกรรมการ
รศ. ดร. นพพร สิทธิสมบัติ กรรมการ
รศ. ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

การอักเสบแบบเฉียบพลันบริเวณรอบปลายรากฟันเป็นผลมาจากมีการติดเชื้อหลายชนิดร่วมกันภายในคลองรากฟัน เชื้อที่เป็นสาเหตุหลักยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเชื้อที่ถูกตรวจพบได้บ่อยในรอยโรคน่าจะมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดสภาวะซึ่งอาจมีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของกลุ่มเชื้อดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาประชากรเชื้อจากตัวอย่างหนองซึ่งเจาะดูดมาจากรอยโรคของผู้ป่วยที่มีอาการคลองรากฟันอักเสบแบบเฉียบพลันจำนวน 17 ตัวอย่าง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อบริสุทธิ์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี หรือวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้าง $_{16}$S rRNA ผลการศึกษาพบว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดร่วมกันทั้ง 17 ตัวอย่าง โดยเฉลี่ย 7.3 ชนิด/ตัวอย่าง เชื้อที่แยกได้มีจำนวนทั้งสิ้น 125 ชนิด แบ่งออกเป็นชนิดไม่ใช้ออกซิเจน 68 ชนิด และชนิดที่ใช้ออกซิเจน 57 ชนิด ประชากรส่วนใหญ่ของเชื้อที่แยกได้ใน 82% (14/17) ของตัวอย่างเป็นเชื้อชนิดไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งมักจะอยู่ในกลุ่ม *Prevotella* และ *Peptostreptococcus* ส่วนเชื้อที่พบได้บ่อยคือกลุ่ม *Prevotella Streptococcus, Corynebacterium, Staphylococcus* และ *Peptostreptococcus*.

การจับกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียเป็นก้อนหรือแผ่นจุลินทรีย์ เป็นกลไกหนึ่งที่เชื้อแบคทีเรียใช้เพื่อการอยู่รอดในธรรมชาติ การจับกลุ่มกันของเชื้อดังกล่าวนี้อาจมีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพ

ในการอักเสบแบบเฉียบพลัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบความสามารถในการจับกลุ่มกันของเชื้อที่แยกได้จาก 10 ตัวอย่าง โดยทดสอบทั้งการจับกลุ่มกันเองของเชื้อเดียวกัน ตลอดจนการจับกลุ่มระหว่างเชื้อ 2 ชนิดจากตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งได้วัดผลโดยวิธีประเมินด้วยตาเปล่า และวิธีที่ได้ประยุกต์ขึ้นมาใหม่ คือการย้อมเชื้อด้วยสีย้อมชนิดฟลูออเรสเซนท์ร่วมกับการสังเกตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคัล ผลการศึกษาพบว่า 56.45% (35/62) ของเชื้อที่ทดสอบสามารถจับกลุ่มกันเองได้ พบการจับกลุ่มระหว่างเชื้อ 15.85% (29/183 คู่) เมื่อใช้วิธีประเมินด้วยตาเปล่า และ 80.87% (148/183 คู่) เมื่อทดสอบโดยใช้สีย้อม อีกทั้งยังตรวจพบการจับกลุ่มของเชื้อในทุก genus ที่นำมาทดสอบ โดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม *Prevotella, Streptococcus* และ *Fusobacterium* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อในกลุ่ม *Prevotella, Streptococcus, Staphylococcus* และ *Corynebacterium* สามารถเกิดการจับกลุ่มระหว่างเชื้อที่อยู่ใน genus เดียวกันด้วย

จากนั้นได้ทำการทดสอบผลของการจับกลุ่มของเชื้อต่อการถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้วิธีวัดปริมาณเชื้อที่ถูกทำลาย ร่วมกับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนท์ ในการศึกษานี้ใช้เชื้อ *Streptococcus gordonii* และเชื้อ *Prevotella melaninogenicus* ซึ่งสามารถจับกลุ่มกันได้ดี ร่วมกับเชื้อ *P. melaninogenicus* ชนิดกลายพันธุ์ซึ่งไม่สามารถจับกลุ่มกับเชื้อ *S. gordonii* ได้ ผลการศึกษาพบว่า การจับกลุ่มของเชื้อดังกล่าวมีผลทำให้เชื้อถูกทำลายได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่จับกลุ่ม ในขณะเดียวกันก็กระตุ้นให้มีการมารวมตัวกันและเกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่าด้วย

โดยสรุป ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดคลองรากฟันอักเสบแบบเฉียบพลัน ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อชนิดไม่ใช้ออกซิเจน การพบเชื้อ *Prevotella* ได้บ่อยและมีปริมาณสูงชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของเชื้อกลุ่มนี้ในการก่อโรค การย้อมเชื้อด้วยสีย้อมชนิดฟลูออเรสเซนท์จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงวิธีหนึ่งในการศึกษาการจับกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย การที่เชื้อกลุ่ม *Prevotella* มีความสามารถในการจับกลุ่มได้กับเชื้ออื่นทั้งที่อยู่ใน genus เดียวกันและต่าง genus อาจมีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของฟันที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียที่จับกลุ่มกันนั้นจะถูกกำจัดได้ดีโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว แต่ก็ทำให้เกิดการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นอย่างมาก ซึ่งปรากฏการณ์นี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อในขบวนการอักเสบแบบเฉียบพลันจนเกิดเป็นฝีหนองขึ้น