การพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด

The presence of Porphyromonas gingivalis in Preterm delivery placenta

ทันตแพทย์อรรถพล ปัญญาภู

กลุ่มงานทันตกรรมโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 1 เชียงใหม่

บทคัดย่อ

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์ สามารถพบได้ภายในช่องปาก ในปัจจุบันมีการรายงานว่าสามารถพบเชื้อชนิดนี้ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย และมีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบอื่นๆ รวมถึงการคลอดก่อนกำหนด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกของหญิงตั้งครรภ์ ทำการเก็บชิ้นรกจากหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ 10 คนและหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด 10 คนหลังคลอด จากนั้นนำรกมาสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย นำไปทดสอบการพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดและในรกของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

คำสำคัญ: พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส, การคลอดก่อนกำหนด, รก

Abstract

Porphyromonas gingivalis is bacteria which is significant to the periodontal disease and can be found in oral cavity. Current studies suggest that Porphyromonas gingivalis can be found in the other organs and associated with many systemic diseases and also preterm delivery. The aim of this study was to identify the presence of Porphyromonas gingivalis in placenta. Placentas were collected from 10 normal delivery pregnants and 10 preterm delivery pregnants. The placentas were processed for DNA extraction and Porphyromonas gingivalis was detected using with polymerase chain reaction using specific primers. The results show a presence

of Porphyromonas gingivalis in preterm placenta and normal term placenta with none statistic significant (P > 0.05)

Keywords: Porphyromonas gingivalis, Preterm delivery, Placenta

บทนำ

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (Porphyromonas Gingivalis) เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่พึ่งออกซิเจนในการเจริญเติบโต (gram negative anaerobe bacteria) พบได้มากในช่องปากของคนเป็นโรคปริทันต์อักเสบ แบคทีเรียชนิดนี้ได้รับการศึกษาแล้วว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคปริทันต์[1] โดยมีปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ต่างๆ ที่สามารถส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย[2] เช่น แคปซูล (capsule) ที่ห่อหุ้มผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ มีความสามารถในการต่อต้านการจับกินของเม็ดเลือดขาว ไลโปโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocyte) หรือแมโครฟาจ (macrophage) ให้เกิดการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบขึ้นมา[3] นอกเหนือจากนี้แล้ว ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase) ในการทำลายเนื้อเยื่อ[4] ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ที่ค้ำจุนฟัน และส่งผลให้เกิดการสูญเสียฟันต่อไป ในปัจจุบันมีการศึกษาได้รายงานว่า เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส นอกจากจะมีความสัมพันธ์กับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์แล้ว ยังมีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบอื่นๆ ได้แก่ โรคเบาหวานชนิดที่ 2[5] โรคหัวใจและหลอดเลือด[6] โรครูมาตอยด์[7] และการคลอดก่อนกำหนดและเด็กแรกเกิดน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์[8] เนื่องจากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในอวัยวะอื่นๆ นอกเหนือจากภายในช่องปาก และมีการตั้งสมมติฐานการศึกษาว่าเชื้อชนิดนี้ มีความสัมพันธ์กับโรคในอวัยวะอื่นๆ เช่นกัน การศึกษาได้รายงานว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในน้ำเลี้ยงไขข้อ (synovial fluid) ของผู้ป่วยโรครูมาตอยด์[9] และอธิบายไว้ว่า เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถสร้างเอนไซม์ PADs หรือ peptidyle arginine deiminase ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแปลสัญญาณพันธุกรรม ทำให้ arginine หรือ methylarginine เปลี่ยนไปเป็น citrulline โปรตีนชนิดนี้จะมีความเกี่ยวเนื่องกับกระบวนการ citrullination ที่มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดโรคภูมิต้านตนเอง (autoimmune disease)[10] และยังมีการศึกษาที่แสดงการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่ลิ้นหัวใจ หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจและสิ่งสะสมบนผนังหลอดเลือดหัวใจของผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด[11] และยังสามารถตรวจพบเชื้อชนิดนี้ได้จากเนื้อเยื่อผนังหลอดเลือดโป่งพอง (aneurysmal wall) ของผู้ป่วยหลอดเลือดแดงใหญ่โป่งพองบริเวณช่องท้อง (abdominal aortic aneurysm)[12] Yoneda และคณะในปี 2012 ได้ตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยโรคตับชนิด non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) และได้รายงานว่า เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่ส่งผลต่อการพัฒนาและลุกลามของโรคตับชนิด NAFLD ถึง 2.615 เท่า[13] นอกจากนี้ การศึกษาของ Singhrao และคณะในปี 2015 ได้รายงานว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีความสัมพันธ์กับโอกาสการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยได้อธิบายไว้ว่า เมื่อมีการติดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสในช่องปากแล้ว เชื้อชนิดนี้สามารถผ่านไปยังระบบไหลเวียนโลหิตไปสู่สมอง เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มของร่างกายในบริเวณสมองและทำให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาทในสมอง[14] การศึกษาการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในอวัยวะรองรับการตั้งครรภ์และส่งผลต่อการคลอดก่อนกำหนดนั้น เริ่มทำงานศึกษาในสัตว์ทดลองก่อน โดยทำการฝังเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เข้าไปใต้ผิวหนังหรือบริเวณหลอดเลือดดำของ

สัตว์ทดลองที่กำลังตั้งครรภ์อยู่ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีการแพร่กระจายผ่านระบบหลอดเลือดจากบริเวณฝัง ไปยังรกมดลูก น้ำคร่ำ และตัวอ่อน (fetus) นอกจากนั้นแล้วยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนในครรภ์สัตว์ทดลอง เช่น การสลายตัว น้ำหนักของตัวอ่อนในครรภ์สัตว์ทดลองน้อยกว่าปกติ[15-17] การศึกษาในมนุษย์เป็นการศึกษาเชิงระบาดวิทยา โดยมีการศึกษาของ León และคณะในปี 2007 รายงานการพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในน้ำคร่ำหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด[18] และการศึกษาของ Ercan และคณะในปี 2015 สามารถตรวจพบยีน 16S rDNA ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในน้ำคร่ำของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด[19]

ส่วนการศึกษาในรกของมนุษย์ Barak และคณะในปี 2007 ได้รายงานการพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในเนื้อเยื่อรกของหญิงตั้งครรภ์ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าครรภ์เป็นพิษ (preclampsia) และต้องทำการผ่าตัดคลอด[20] การศึกษาของ Swati และคณะในปี 2012 ทำการศึกษาหญิงตั้งครรภ์ที่มีความดันโลหิตสูงในช่วงตั้งครรภ์และต้องรับการผ่าตัดคลอด สามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสในรกได้ 70% ของจำนวนหญิงตั้งครรภ์ที่ผิดปกติเหล่านั้น[21] ในปี 2013 Chaparro และคณะได้นำเสนอการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากหญิงตั้งครรภ์ที่มีความดันโลหิตสูงและครรภ์เป็นพิษในช่วงตั้งครรภ์เช่นกัน[22] การศึกษาของ Katz และคณะในปี 2009 ได้รายงานว่า พบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการเปรียบเทียบกับรกจากหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry)[23]

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการศึกษาที่ตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายและส่งผลต่อการเกิดโรคขึ้น นอกเหนือจากนั้น ยังสามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในอวัยวะรองรับการตั้งครรภ์และส่งผลต่อการตั้งครรภ์และการคลอดที่ผิดปกติในรูปแบบต่างๆ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด โดยก่อนหน้านี้มีเพียงการศึกษาเดียวที่รายงานการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาที่สนับสนุนการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า สามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด โดยใช้วิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่แตกต่างกันออกไป โดยมีสมมติฐานว่าสามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากหญิงตั้งครรภ์ได้ และสามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดมากกว่าในรกของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สถานที่ทำการศึกษา ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 1 เชียงใหม่ (โรงพยาบาลแม่และเด็ก) ระยะเวลาทำการศึกษา สิงหาคม 2559 - กุมภาพันธ์ 2560 โดยตัวอย่างรกทั้งหมด 20 ชิ้น ทำการเก็บมาจากประชากรกลุ่มตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ที่เข้าร่วมงานวิจัย 20 ราย หญิงตั้งครรภ์ทุกรายได้ฝากครรภ์และทำการคลอดที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพศูนย์อนามัยที่ 1 อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ตัวอย่างชิ้นรก 10 ชิ้น ได้มาจากกลุ่มตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ 10 ราย (รก 1 ชิ้น / 1 ราย) และตัวอย่างชิ้นรก 10 ชิ้น ได้มาจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด 10 ราย (รก 1 ชิ้น / 1 ราย) การกำหนดเกณฑ์การคลอดก่อนกำหนดอ้างอิงจากการวินิจฉัยขององค์การอนามัยโลกดังนี้[24]

จำแนกการเกิดตามอายุที่อยู่ในครรภ์หญิงตั้งครรภ์

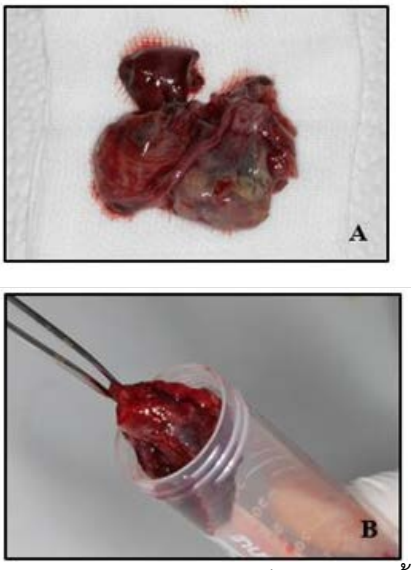
1. การคลอดก่อนกำหนด (Preterm labor) หมายถึงการคลอดทารกก่อนอายุครรภ์ 37 สัปดาห์
2. การคลอดตามกำหนด (Full term or Mature labor) หมายถึงการคลอดทารกที่มีอายุครรภ์ตั้งแต่ 37 สัปดาห์ถึง 41 สัปดาห์

เกณฑ์ข้อกำหนดหญิงตั้งครรภ์ที่สามารถเก็บรกได้

1. มีอายุ 20 – 35 ปี
2. ไม่พบภาวะตั้งครรภ์แบบแฝด
3. ไม่มีประวัติการคลอดก่อนกำหนด
4. ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาเช่น ยาประเภทสเตียรอยด์ ยาปฏิชีวะ ยาต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ภายในระยะเวลา 3 เดือนก่อนเข้าร่วมงานวิจัย
5. เป็นโรคทางระบบและมีปัจจัยเสี่ยงต่างๆที่ทำให้มีโอกาสคลอดก่อนกำหนดได้แก่ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง
6. มีประวัติสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์ระหว่างการตั้งครรภ์

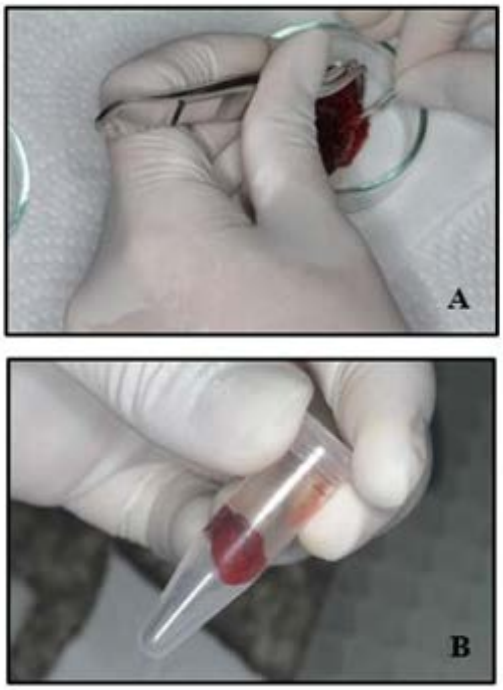
การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อรก (placenta tissue)

ภายหลังหญิงตั้งครรภ์ที่ได้เข้าร่วมงานวิจัยคลอด พยาบาลวิชาชีพประจำห้องคลอด ใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 15 ทำการสุ่มตัดเนื้อเยื่อรกภายหลังคลอด โดยตัดชิ้นเนื้อรกในตำแหน่งที่ใกล้กับทารก 1 ชิ้นและตำแหน่งที่ใกล้กับหญิงตั้งครรภ์ 1 ชิ้น จากนั้นล้างเนื้อเยื่อรกด้วยน้ำเกลือ (normal saline solution) และวางบนผ้าก๊อซ (gauze) เพื่อซับน้ำเกลือออกก่อนนำไปใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างและเก็บรักษาที่กล่องควบคุมความเย็น (รูป 1)



รูป 1 ตัวอย่างรก (A) และการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อรกในหลอดเก็บตัวอย่าง (B)

ทันตแพทย์ผู้วิจัยจะนำเนื้อเยื่อรกที่ได้มาตัดเป็นชิ้นให้มีขนาดโดยประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการตัดเนื้อเยื่อรกด้านที่ใกล้กับทารกและด้านที่ใกล้กับหญิงตั้งครรภ์ตำแหน่งละ 1 ชิ้น นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศา เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ต่อไป (รูป 2)



รูป 2 ชิ้นเนื้อรกขนาด 1 ลูกบาศกเซนติเมตรนำไปใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อ (A) หลอดเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อพร้อมชิ้นเนื้อรก (B)

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในห้องปฏิบัติการ

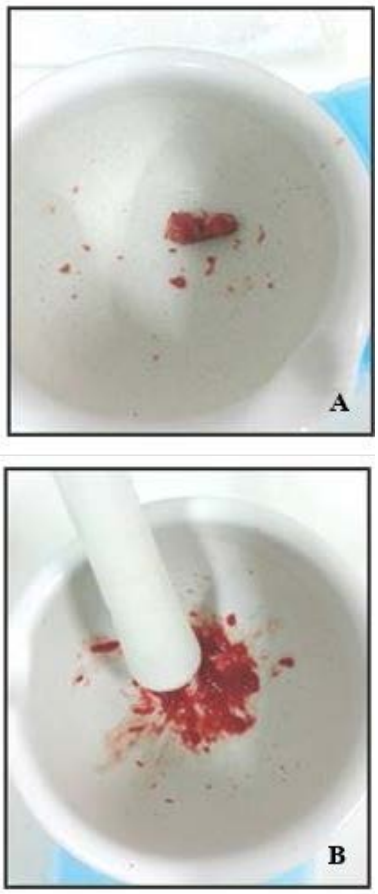
วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียจากรก

ในการสกัดแยกดีเอ็นเอแบคทีเรียจากรกจะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอของ QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA) (รูป 3)

รูป 3 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA) (แหล่งที่มา qiagen.com)

การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียจากชิ้นรกจะมีวิธีการตามที่ผู้ผลิตกำหนด มีวิธีโดยย่อดังนี้

1. หลังจากนำชิ้นรกไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสแล้ว จะนำชิ้นรกที่อยู่ในตำแหน่งใกล้กับมารดา 1 ชิ้นและจากตำแหน่งใกล้กับทารก 1 ชิ้น ไปบดในโกร่งบดสาร (mortar and pestle) ให้ละเอียด แล้วนำชิ้นเนื้อทั้งหมดมาผสมรวมกัน นำชิ้นเนื้อที่บดและผสมแล้วแบ่งส่วนออกมาให้มีน้ำหนัก 25 มิลลิกรัม (รูป 4) นำไปใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟ (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร



รูป 4 รกที่ถูกนำไปแช่ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (A) รกถูกนำมาบดด้วยโกร่งบดสาร (mortar and pestle) (B)

2. เติม Buffer ALT ลงไป 180 ไมโครลิตร เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 15 วินาที บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นำขึ้นมาเขย่าบนเครื่องผสมสารทุกๆ 20 นาทีในช่วงระหว่างการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ การย่อยเนื้อเยื่อจะใช้เวลาประมาณ 1 - 3 ชั่วโมง

3. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อไม่ให้มีส่วนผสมใดๆ ติดบริเวณฝาปิดหลอดเอพเพนดอร์ฟ ค่อย ๆ เติม Buffer AL ลงไป 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารอีกครั้งเป็นเวลา 15 วินาที นำไปแช่ในกล่องควบคุม (heat box) อุณหภูมิ 70 องศาเป็นเวลา 10 นาที

4. เติม ethanol (90 – 100 %) ลงไป ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปเขย่า

ด้วยเครื่องผสมสารอีกครั้งเป็นเวลา 15 วินาที นำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงไปในหลอด QIAamp mini spin column ที่เสียบไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 ×g (8000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAamp mini spin column ออกมาใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 ไมโครลิตรใหม่ ทิ้งส่วนของเหลวในหลอดเก็บตัวอย่างเก่าไป

5. เติมสารละลาย Buffer AW1 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 × g (8000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที นำ QIAamp mini spin column ออกมาใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 ไมโครลิตรใหม่อีกครั้ง

6. เติมสารละลาย Buffer AW2 500 ไมโครลิตรลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 20,000 × g (14,000 rpm) เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำ QIAamp mini spin column ออกมาใส่ใน collection tube ขนาด 2 ไมโครลิตรอันใหม่อีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที นำ QIAamp mini spin column มาใส่ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7. เติมสารละลาย Buffer AE หรือน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 ×g (8000 rpm) เป็นเวลา 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอออกมา นำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

การเตรียมส่วนผสม reaction mixture เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

1. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซต์ไตรฟอสเฟส (dNTP; Ferments, Burlington, Ont., Canada) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์

2. 10x PCR buffer (Qiagen®, Valencia, CA, USA) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์

3. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (Taq DNA polymerase; Qiagen®, Valencia, CA, USA.) ความเข้มข้น 1.25 ยูนิต

4. คู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษาความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นยีนในส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป (ubiquitous bacteria) และไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส นำมาขยายชิ้นส่วน อ้างอิงตามการศึกษาของ Ashimoto และคณะในปี 1996[25] (ตาราง 1)

5. นำ reaction mixture ที่เตรียมได้ในปริมาตร 45 ไมโครลิตร ผสมกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างต่างๆ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ตาราง 1 ไพรเมอร์จำเพาะของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแบคทีเรียทั่วไป (Ashimoto และคณะ 1996)

Periopathogen	Primer pairs (5’ – 3’)	Base position (amplicon length in bp)
P. gingivalis	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	729 - 1,132 (404)
Ubiquitous primer	GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC CCC GGG AAC GTA TTC ACC G	786 - 1,387 (602)

ชุดควบคุมผลบวก (positive control) ใช้การอ้างอิงดีเอ็นเอของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277 ชุดควบคุมผลลบ (negative control) ได้แก่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile deionized water)

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อขยายสัญญานดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

1. นำสารละลายที่เตรียมไว้ใส่ลงในเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Thermal cycler; Eppendorf Master cycler® Gradient, Geramany) (รูป 5) โดยทำการตั้งอุณหภูมิตามชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา อ้างอิงการศึกษาของ Ashimoto และคณะในปี 1996

รูป 5 เครื่อง Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Germany)

2. Ubiquitous primer เริ่มต้นด้วยขั้นตอน Initial denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการแยกเกลียวสายคู่ของดีเอ็นเอให้ออกจากกัน (denaturing) ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการจับของไพร์เมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพร์เมอร์ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจนครบ 36 รอบ อุณหภูมิสุดท้าย (final step) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เริ่มต้นด้วยขั้นตอน Initial denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจะเป็นอุณหภูมิที่จะทำให้สายคู่ของดีเอ็นเอแยกออกจากกันที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที จะมีการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจนครบทั้งหมด 36 รอบ โดยมีอุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที

การวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ทำการแยกผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยเครื่องแยกกระแสไฟฟ้าบนเจล (agarose gel) ร้อยละ 1.2 ใน Tris boric acid EDTA (TBE) ที่ 80 โวลต์ (รูป 6) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแถบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วย Ethidium bromide (EtBr2) 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาด นำแผ่นเจลไปส่องหาแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต เทียบกับแถบดีเอ็นเออ้างอิง โดยใช้ดีเอ็นเอ 1 kb DNA ladder (Fermentas, Burlington, Ont, Canada) จากนั้นทำการบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพรุ่น UVP Auto-Chemi and Software LAbwork 4.5 (AC1 Auto Darkroom Set-up & Operating Instruction, UK)

รูป 6 เครื่องแยกผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยกระแสไฟฟ้า (แหล่งที่มา bio-rad.com)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Statistical Package for Social Science (SPSS) version 23.0 ทำการวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนาแสดงความถี่เป็นร้อยละการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรก ของกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดและกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ และทำการวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงอนุมานเพื่อทำการเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรก ระหว่างกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดและกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติโดยใช้สถิติ Fisher's exact test กำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการศึกษา

รูป 7 แถบดีเอ็นเอของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด ขนาด 404 คู่เบส จากดีเอ็นเอตัวอย่างเทียบกับตัวควบคุมบวก

ช่องที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) 404 คู่เบส

ช่องที่ 2 แสดงตัวควบคุมลบที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

ช่องที่ 3 แสดงตัวควบคุมบวกที่มีเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

ช่องที่ 4-13 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ของกลุ่มตัวอย่างลำดับที่ 1-10

จากภาพเอกาโรสเจล พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ 2, 3, 4, 7 และ 9 สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่มีขนาด 404 คู่เบส

รูป 8 แถบดีเอ็นเอของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ ขนาด 404 คู่เบส จากดีเอ็นเอตัวอย่างเทียบกับตัวควบคุมบวก

ช่องที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) 404 คู่เบส

ช่องที่ 2 แสดงตัวควบคุมลบที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

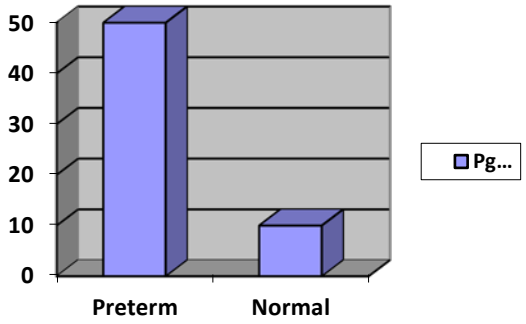
ช่องที่ 3 แสดงตัวควบคุมบวกที่มีเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

ช่องที่ 4-13 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ของกลุ่มตัวอย่างลำดับที่ 1-10

จากภาพเอกาโรสเจล พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ 3 สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ที่มีขนาด 404 คู่เบส

จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด ร้อยละ 50 (5 ราย) ตรวจพบดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ ร้อยละ 10 (1 ราย) จากสถิติ Fisher 's exact test พบว่า การตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดและจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่

คลอดตามเกณฑ์ปกติไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P = 0.141



รูป 9 แผนภูมิแท่งแสดงข้อมูลเป็นร้อยละการตรวจพบดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกจากกลุ่มหญิงตั้งครรภ์คลอดก่อนกำหนดทั้งหมด 10 ราย และกลุ่มหญิงตั้งครรภ์คลอดตามเกณฑ์ปกติ 10 ราย

วิจารณ์และสรุปผล

การคลอดก่อนกำหนดมีสาเหตุจากหลายปัจจัยเช่น เชื้อชาติ โภชนาการ การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์สถานะทางสังคม ความเครียด[26-30] แต่ปัจจัยที่มีผลมากที่สุดคือการติดเชื้อบริเวณมดลูกระหว่างตั้งครรภ์ ซึ่งถือเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญที่ทำให้เกิดการคลอดก่อนกำหนด[31-32] การศึกษาต่างๆ มีการสันนิษฐานว่าการติดเชื้อบริเวณมดลูกเกิดได้จาก 4 เส้นทางด้วยกันได้แก่ 1. การติดเชื้อแบคทีเรียจากช่องคลอดไปยังถึงมดลูก 2. การติดเชื้อแบคทีเรียจากภายในช่องท้องและส่งผ่านท่อนำไข่ (fallopian tubes) ไปยังมดลูก 3. มีการติดเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะอื่นๆ แบคทีเรียแพร่ผ่านกระแสโลหิตมายังรกและมดลูก 4. การติดเชื้อแบคทีเรียจากการตรวจครรภ์เช่นการเจาะตรวจน้ำคร่ำ[33] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์และสามารถตรวจพบได้ง่ายในช่องปาก สามารถแพร่ผ่านเส้นเลือดขนาดเล็กไปยังรกและมดลูก ส่งผลให้เกิดการคลอดก่อนกำหนดได้ การศึกษานี้สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกของหญิงตั้งครรภ์ แต่การตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้[20-23] การศึกษาอื่นๆ ยังสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ชนิดต่างๆ ในรก เช่น แอคทิโนบาซิลัส แอคทิโนมัยซีเต็มโคมิแทนส์ แทนเนอเรลลา ฟอร์ซิเทีย ทรีโพนีมา เดนติโคลา ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการตั้งครรภ์และคลอดที่ผิดปกติแบบต่างๆ[34,35] ทั้งนี้ยังมีการศึกษาที่สามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคปริทันต์ในน้ำคร่ำซึ่งมีความเกี่ยวเนื่องกับรกในหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด ดังเช่นการศึกษาของ Ercan และคณะในปี 2015 ทำการตรวจหายีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ในน้ำคร่ำของหญิงตั้งครรภ์ ผลการศึกษา พบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แทนเนอเรลลา ฟอร์ซิเทีย แคมไพโรแบคเตอร์ เรคตัส ในน้ำคร่ำของหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนด[19] การศึกษานี้ทำการศึกษาเชื้อก่อโรคปริทันต์พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เพียงชนิดเดียวเท่านั้น จากข้อจำกัดด้านงบประมาณ ดังนั้นถ้าสามารถทำการตรวจหาเชื้อก่อโรคปริทันต์ชนิดอื่นๆ ได้ในรก จะสามารถสันนิษฐานความเป็นไปได้ว่าเชื้อก่อโรคปริทันต์จากในช่องปากหญิงตั้งครรภ์ สามารถแพร่กระจายมายังรกและอาจส่งผลให้เกิดการคลอดก่อนกำหนดได้

สรุปผลงานการศึกษา สามารถตรวจพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดก่อนกำหนดและในรกหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดตามเกณฑ์ปกติ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กิตติกรรมประกาศ

1.คุณอุษณี คงขุนเทียนและคณะ พยาบาลวิชาชีพ ประจำโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 1 เชียงใหม่ ในการช่วยเก็บและจัดเตรียมรกจากหญิงตั้งครรภ์

2. ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

1. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25(2): 134-44.
2. Vernal R, Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Diaz-Guerra E, Silva A, et al. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. J Clin Periodontol 2014; 41(5): 451-9.
3. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro- inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. Arch Oral Biol 2014; 59(2): 167-75.
4. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J Periodontal Res 1997; 32(1): 120-5.
5. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2008; 15(2): 135-41.
6. Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? Ann Periodontol 1998; 3(1): 127-41.
7. Detert J, Pischon N, Burmester G, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. Arthritis Res Ther 2010; 12(5): 218.
8. Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes–systematic review. J Clin Periodontol 2013;40(s14).
9. Martinez- Martinez RE, Abud- Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW, Loyola-Rodríguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. J Clin Periodontol 2009; 36(12): 1004-10.
10. Liao F, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, Cheng X. *Porphyromonas gingivalis* may play an important role in the pathogenesis of periodontitis-associated rheumatoid arthritis. Med Hypotheses 2009; 72(6): 732-5.
11. Haraszthy V, Zambon J, Trevisan M, Zeid M, Genco R. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol 2000; 71(10): 1554-60.
12. Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, Umeda M, Huang Y, Ishikawa I. Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. Eur J Vasc Endovasc Surg 2004; 28(5): 553-8.
13. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, et al. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. BMC Gastroenterol 2012; 12(1): 1.
14. Singhrao SK, Harding A, Poole S, Kesavalu L, Crean S. *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. Mediators Inflamm 2015; 2015.
15. Boggess KA, Madianos PN, Preisser JS, Moise KJ, Offenbacher S. Chronic maternal and fetal *Porphyromonas gingivalis* exposure during pregnancy in rabbits. Am J Obstet Gynecol 2005; 192(2): 554-7.
16. Bélanger M, Reyes L, Von Deneen K, Reinhard MK, Progulske-Fox A, Brown MB. Colonization of maternal and fetal tissues by *Porphyromonas gingivalis* is strain-dependent in a rodent animal model. Am J Obstet Gynecol 2008; 199(1): 86.e1-e7.
17. Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of diverse oral bacteria to

murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. Infect Immun 2010; 78(4): 1789-96.

18. León R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M, et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. J Periodontol 2007; 78(7): 1249-55.
19. Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B, et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. Acta Odontol Scand 2013; 71(3-4): 553-9.
20. Barak S, Oettinger- Barak O, Machtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. J Periodontol 2007; 78(4): 670-6.
21. Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. Arch Gynecol Obstet 2012; 285(3): 613-9.
22. Chaparro A, Blanlot C, Ramirez V, Sanz A, Quintero A, Inostroza C, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and toll-like receptor 2 are associated with hypertensive disorders in placental tissue: a case–control study. J Periodontal Res 2013; 48(6): 802-9.
23. Katz J, Chegini N, Shiverick K, Lamont R. Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. J Dent Res 2009; 88(6): 575-8.
24. Offenbacher S, Jared H, O'reilly P, Wells S, Salvi G, Lawrence H, et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis-associated pregnancy complications. Ann Periodontol 1998; 3(1): 233-50.
25. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996; 11(4): 266-73.
26. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. Acta Obstet Gynecol Scand 2005; 84(6): 572-7.
27. Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-Grade Inflammation in Chronic Infectious Diseases. Ann N Y Acad Sci 2006; 1088(1): 251-64.
28. Mercer B, Goldenberg R, Das A, Moawad A, Iams J, Meis P, et al. The preterm prediction study: a clinical risk assessment system. Am J Obstet Gynecol 1996;174(6):1885-95.
29. Dole N, Savitz DA, Hertz-Picciotto I, Siega-Riz AM, McMahon MJ, Buekens P. Maternal stress and preterm birth. Am J Epidemiol 2003; 157(1): 14-24.
30. Lilliecreutz C, Larén J, Sydsjö G, Josefsson A. Effect of maternal stress during pregnancy on the risk for preterm birth. BMC Pregnancy Childbirth 2016; 16(1): 1.
31. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. Pediatr Res 1997; 42(1): 1-8.
32. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med 2000; 342(20): 1500-7.
33. Romero R, Avila C, Brekus CA, Morotti R. The role of systemic and intrauterine infection in preterm parturition. Ann N Y Acad Sci 1991; 622(1): 355-75.
34. Blanc V, O'Valle F, Pozo E, Puertas A, Leon R, Mesa F. Oral bacteria in placental tissues: increased molecular detection in pregnant periodontitis patients. Oral Dis 2015; 21(7): 905-12.
35. Davenport ES. Preterm low birthweight and the role of oral bacteria. J Oral Microbiol 2010; 2.