



ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดีเผลสมโพรบโอดิกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์
ในน้ำลายของมนุษย์

EFFECT OF PROBIOTIC FERMENTED MILK ON SALIVARY
STREPTOCOCCUS MUTANS COUNT

ดรุณี ชุมรอย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์
ในน้ำลายของมนุษย์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมทั่วไปชั้นสูง
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECT OF PROBIOTIC FERMENTED MILK ON SALIVARY
STREPTOCOCCUS MUTANS COUNT



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(aster of Science (Advanced General Dentistry))
Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University
2019
Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์
ในน้ำลายของมนุษย์
ของ
ดรุณี ชุมโรย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมทั่วไปชั้นสูง
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรสวรรค์ ธนธรวงศ์)	(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชพิน เหล่าวานิช ศรีสัจจะ ลักษณ์)

ชื่อเรื่อง	ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลายของมนุษย์
ผู้วิจัย	ดรุณี ชุมรอย
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. พรสวรรค์ ธนธรวงศ์

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเชื้อโพรไบโอติกส์ชนิดแลคโตบาซิลลัส พาราคาเชอี ในนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมัลชัน® ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์ ผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 34 คนถูกคัดเลือกเข้าสู่วิจัย โดยมีรูปแบบการวิจัยเป็นแบบสุ่ม ปกปิดทางเดียวแบบไขว้ ระยะเวลาในการวิจัยแบ่งเป็น 4 ช่วง คือ ช่วงเตรียมสภาพ 1 ช่วง, ช่วงดำเนินการทดลอง 2 ช่วง และช่วงล้าง 1 ช่วง โดยในระหว่างช่วงดำเนินการวิจัย ผู้เข้าร่วมวิจัยต้องดื่มนมผสมโพรไบโอติกส์หรือน้ำเปล่า เป็นเวลา 10 วัน เก็บน้ำลายของผู้เข้าร่วมวิจัยก่อนและหลังช่วงดำเนินการทดลองแต่ละช่วง เพื่อวิเคราะห์จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยการนับ ผลการทดลอง พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หลังดื่มนมผสมโพรไบโอติกส์ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนดื่มนม, ในทางตรงข้ามไม่พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หลังดื่มน้ำเปล่าเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนดื่มน้ำเปล่า, นอกจากนั้นพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หลังดื่มนมผสมโพรไบโอติกส์ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังดื่มน้ำเปล่า, และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนดื่มน้ำเปล่าและก่อนดื่มนมผสมโพรไบโอติกส์ พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้นในช่องปากกับค่าความเป็นกรดต่างของน้ำลาย สรุป การดื่มนมผสมโพรไบโอติกส์เป็นประจำทุกวันสามารถลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายได้ ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดฟันผุได้

คำสำคัญ : นมโพรไบโอติกส์, จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย, เชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเชอี, โรคฟันผุ

Title	EFFECT OF PROBIOTIC FERMENTED MILK ON SALIVARY <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> COUNT
Author	DARUNEE CHOOMROY
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Bhornsawan Thanathornwong

The objective of this study is to investigate the effects of probiotic milk containing *Lactobacillus paracasei* on *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) counts in saliva. The design of this study was as follows: Thirty four participants were recruited in this single-blinded, randomized and controlled crossover study. The study design also included 4 periods which consisted of a run in period, two intervention periods and a washout period. During the intervention periods, the participants were either given probiotic milk or control for 10 days, then the pre and post intervention salivary samples were subjected to microbiological evaluation. Finally, the numbers of *S. mutans* were taken by identifying the morphology of the colony. The result revealed the following: there was a significant reduction in the *S. mutans* count after drinking probiotic milk ($p<0.001$). On the contrary, no significant change in the *S. mutans* count between the baseline and after drinking water. Moreover, the *S. mutans* count after probiotic milk consumption was significantly lower than after water consumption ($p<0.001$). There were no significant differences in the *S. mutans* count between probiotic milk and water consumption at the baseline. The significant correlation between *S. mutans* count and the pH of saliva at the baseline was also identified ($r=0.41$, $p=0.017$). In conclusion, The daily consumption of milk containing probiotic bacteria can reduce levels of *S. mutans* and may contribute to the prevention of dental caries.

Keyword : Probiotic fermented milk, Salivary *Streptococcus mutans* count, *Lactobacillus paracasei*, Dental caries

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากความกรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก รศ.ดร.ทพญ.พรสวรรค์ ธนธรวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้ง อ.ทพญ.พิมพ์สุภาคนุญ มงคลรักษา และ อ.ทพญ.ดร.สุธีรา เตชะธนะวัฒน์ ผู้คอยให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนสำเร็จเรียบร้อยสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชชพิน เหล่าวานิช ศรีสัจจะลักษณ์ ที่สละเวลามาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ และพิจารณาผลการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาทันตกรรมทั่วไป และภาควิชาโสตศอนาสิกวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความรู้ และคำปรึกษา พร้อมทั้งบุคลากรคณะทันตแพทยศาสตร์ ที่เข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ตลอดจนครูบาอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน ขอขอบคุณกัลยาณมิตรรอบข้างทุก ๆ ท่าน ที่คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา

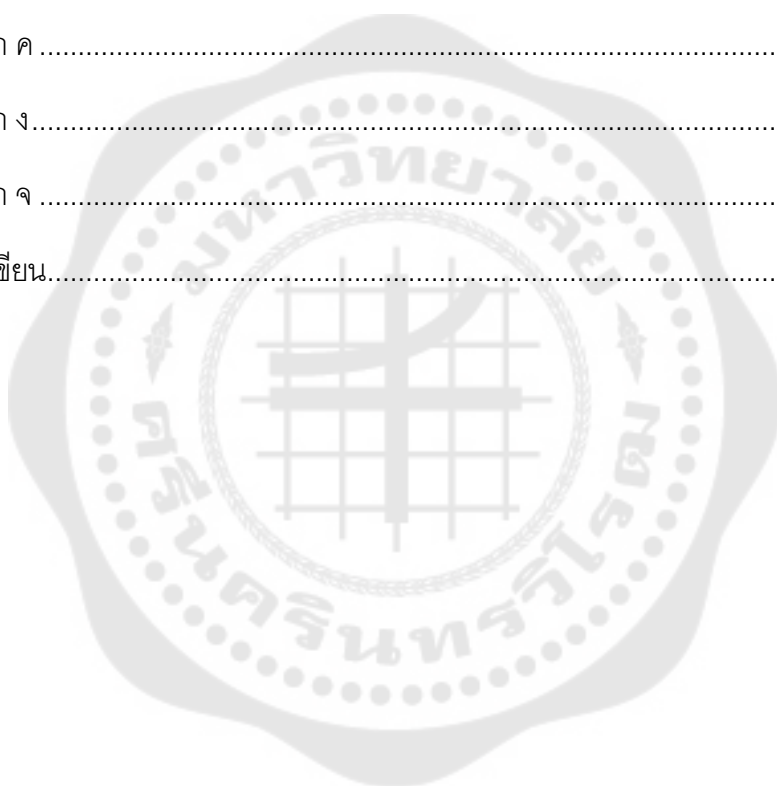
ดรุณี ชุมรอย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
คำถามวิจัย.....	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	6
ตัวแปรที่ศึกษา.....	7
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	7
กรอบแนวคิดวิจัย.....	8
สมมติฐานการวิจัย.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
โรคพิษณุ	9
ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคพิษณุ	9
การป้องกันและควบคุมพิษณุ	12
เชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์.....	14

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	15
โพรไบโอติกส์.....	19
โพรไบโอติกส์กับการรักษาโรคในช่องปาก	20
เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย.....	28
ผลข้างเคียงจากโพรไบโอติกส์	29
บทที่ 3 วิธีการวิจัย.....	31
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง.....	31
วัสดุที่ใช้ในการวิจัย	32
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	32
วิธีวิจัย.....	33
การเตรียมนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมัลส์®	33
การเตรียมผู้เข้าร่วมวิจัย.....	35
การเก็บตัวอย่างน้ำลาย	37
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไมดิส ซาลิวาเรียส แบคทีราซิน อะการ์.....	38
การหาปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์	38
การเก็บรวบรวมข้อมูล	41
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	41
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	42
ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัย.....	42
ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์.....	42
ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพักกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น....	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล	49

สรุปผลการวิจัย.....	49
อภิปรายผล	49
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก	65
ภาคผนวก ข	66
ภาคผนวก ค	69
ภาคผนวก ง.....	72
ภาคผนวก จ	76
ประวัติผู้เขียน.....	79



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ตัวอย่างของอาหารคัดเลือกชนิดแบคทีเรีย	17
ตาราง 2 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของโพรไบโอติกส์ต่อโรคฟันผุในช่องปากมนุษย์	23
ตาราง 3 ตัวอย่างเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาเป็นโพรไบโอติกส์.....	29
ตาราง 4 รายละเอียดของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ที่ใช้ในการวิจัย.....	34
ตาราง 5 เกณฑ์ในการประเมินสภาวะปริทันต์	36
ตาราง 6 ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยเมื่อเริ่มต้นโครงการ	42
ตาราง 7 จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในหน่วยโคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) ใน 4 ช่วงเวลา คือ ก่อนดื่มนม, หลังดื่มนม, ก่อนดื่มน้ำและหลังดื่มน้ำ จำแนกตามกลุ่มการทดลอง	45
ตาราง 8 ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก กับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น..	48
ตาราง 9 บันทึกข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมวิจัย	72
ตาราง 10 บันทึกจำนวนเชื้อที่นับได้ในแต่ละครั้ง	74
ตาราง 11 เปรียบเทียบผลของการลดลงของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนและหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์และน้ำ ภายในกลุ่มเดียวกันและระหว่างกลุ่ม. 76	
ตาราง 12 ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก กับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น..	78

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย	8
ภาพประกอบ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการเกิดโรคพิษ.....	9
ภาพประกอบ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทริปโตไนส์ แอกลีเซอินซินติเอคาร์ (tryptone yeast extract cysteine agar) (a) ลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์บนอาหารเลือด (blood agar) (b)	15
ภาพประกอบ 4 นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สูตรที่วางจำหน่ายในประเทศไทย ...	33
ภาพประกอบ 5 นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมัลชัน สูตรน้ำตาลร้อยละ 0.1	35
ภาพประกอบ 6 ระยะเวลาตลอดการดำเนินการทดลอง	37
ภาพประกอบ 7 เชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไมติสซาลิวาเรียสแบคทีราซิน อะการ์.....	39
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไมติสซาลิวาเรียส แบคทีราซิน อะการ์มีลักษณะ ทึบ ขรุขระ ผิวหนูนุ่มเรียบ	40
ภาพประกอบ 9 การเจือจางสารละลายด้วยวิธีซีเรียล ไดลูชัน (Serial dilution)	40
ภาพประกอบ 10 การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	41
ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างลักษณะและปริมาณโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไมติส ซาลิวาเรียส แบคทีราซินก่อนดื่ม (a), หลังดื่ม (b), ก่อนดื่มน้ำ (c) และหลังดื่มน้ำ (d) จากการมองด้วยตาเปล่า.....	43
ภาพประกอบ 12 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไมติส ซาลิวาเรียส แบคทีราซินจากการมองผ่านกล้องไมโครสโคป (microscope).....	44
ภาพประกอบ 13 แผนภาพกล่องแสดงจำนวนเชื้อที่นับได้ในแต่ละครั้ง	47
ภาพประกอบ 14 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ก่อนดื่มนมและก่อนดื่มน้ำของกลุ่มทดลอง A.....	54
ภาพประกอบ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ตั้งต้น	56

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคฟันผุเป็นปัญหาทางสุขภาพช่องปากที่มีความชุกสูง พบได้ในประชากรทุกเพศ ทุกวัย และทุกเชื้อชาติ จากการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากของประชากรไทยครั้งล่าสุด ปี 2560 ของ กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย พบว่า เด็กอายุ 3 ปี ซึ่งเป็นช่วงแรกที่มีฟันน้ำนมขึ้นครบ มีความชุกของการเกิดฟันผุและไม่ได้รับการบูรณะถึงร้อยละ 52.0 และพบความชุกสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่ออายุ 5 ปี ถึงร้อยละ 73.8 ส่วนการเกิดฟันผุในฟันแท้ ซึ่งทำการสำรวจในกลุ่มเด็กวัยเรียนอายุ 12 ปี พบความชุกของการเกิดฟันผุและไม่ได้รับการบูรณะร้อยละ 31 เด็กวัยรุ่นอายุ 15 ปี พบความชุกของการเกิดฟันผุร้อยละ 40.1 กลุ่มวัยทำงานอายุ 35-44 ปี มีค่าดัชนีผุ จุด ถอน สูงกว่าร้อยละ 90 และสูงขึ้นตามลำดับเมื่ออายุมากขึ้น จากผลสำรวจเหล่านี้เห็นได้ว่า ฟันผุเป็นปัญหาทางสุขภาพที่พบในประชากรจำนวนมากในทุกกลุ่มอายุ หากมีฟันผุที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องทันเวลาจะนำมาสู่การสูญเสียฟันในอนาคตและหากไม่มีการใส่ฟันทดแทนจะนำมาสู่ปัญหาอื่น ๆ อย่างไม่จบสิ้น ส่งผลต่อการใช้ชีวิตประจำวัน และคุณภาพชีวิตที่ลดลงอย่างชัดเจน จึงจำเป็นต้องหาแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษา เพื่อป้องกันผลกระทบที่จะเกิดขึ้นตามมา

ฟันผุมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยประกอบกัน ปัจจัยหลักสำคัญ 4 ปัจจัย คือ เชื้อจุลินทรีย์, อาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตแป้งและน้ำตาล, องค์ประกอบต่าง ๆ ในช่องปากของผู้ป่วย (เช่น ลักษณะผิวฟันหรือคุณภาพของน้ำลาย) และระยะเวลาที่ฟันสัมผัสกับกรด ในสภาวะปกติภายในช่องปากจะมีกระบวนการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุ โดยมีทั้งการสูญเสียแร่ธาตุจากตัวฟัน (demineralization) และการคืนกลับแร่ธาตุสู่ตัวฟัน (remineralization) อย่างสมดุล แต่ในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นชีวภาพ (biofilm) ย่อยสลายอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และสร้างผลผลิตที่มีความเป็นกรด หรือมีปัจจัยใดก็ตามที่ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำลงจนถึงระดับวิกฤต (critical pH) คือ 5.2-5.5 จะส่งผลให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุมากกว่าการได้รับกลับคืน และถ้าเกิดขึ้นบ่อยครั้งจะทำให้เกิดฟันผุได้^[1, 2] เชื้อในแผ่นชีวภาพที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุมีหลายชนิด ได้แก่ กลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (mutans streptococci หรือ MS) คือ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มแลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*) กลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (Non-mutans streptococci) และกลุ่มยีสต์ (Yeast)^[3, 4] ในอดีตถึง

ปัจจุบัน มีการศึกษาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์มีศักยภาพในการก่อโรคได้สูงและสัมพันธ์กับสาเหตุของโรคฟันผุมากที่สุด^[5,6] เชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ สามารถสร้างกรดทนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดได้ดี สามารถสร้างสารเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิวต่าง ๆ ในช่องปาก รวมทั้งบริเวณผิวฟันได้ดี โดยในขั้นตอนเริ่มต้นจะไม่จำเป็นต้องใช้น้ำตาล แต่ในขั้นตอนต่อไปจะใช้โมเลกุลกลูโคสจากน้ำตาลในการสร้างสารประกอบที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ คือ เดกซ์เทรน (dextran) และมิวแทน (mutan) ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยให้เชื้อสามารถยึดเกาะเพิ่มจำนวนบนผิวฟัน และยังช่วยให้เชื้อที่ก่อโรคฟันผุชนิดอื่น ๆ เข้ามายึดเกาะเกิดเป็นแผ่นชีวภาพบนผิวฟันได้มากขึ้น นอกจากนี้กรดที่เชื้อสร้างออกมายังมีผลให้แผ่นชีวภาพมีสภาวะเป็นกรด ส่งผลให้มีการคัดเลือกเชื้อที่ทนกรด ทำให้เชื้อบางชนิดที่ไม่ทนกรดมีชีวิตรอดอยู่ต่อไปไม่ได้ เชื้อที่ทนกรดจึงเจริญเข้าแทนที่และเชื้อให้เชื้ออื่นที่สามารถทนต่อกรดได้เจริญเติบโตด้วยเช่นกัน ทำให้เกิดฟันผุได้ง่ายจากสภาวะในช่องปากที่เป็นกรดตลอดเวลา^[7]

แนวทางในการป้องกันฟันผุมีหลายรูปแบบ สามารถแบ่งออกเป็นวิธีที่มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดสาเหตุโดยตรงที่ทำให้ฟันผุ เช่น การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นชีวภาพ การให้คำแนะนำเพื่อควบคุมการรับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของแป้งและน้ำตาล การใช้น้ำตาลเทียมทดแทนน้ำตาล ซูโครส (sucrose) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีที่มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยคืนกลับแร่ธาตุ เช่น การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผสมฟลูออไรด์ (fluoride) การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผสมแคลเซียมฟอสเฟต (calciumphosphate) เป็นต้น^[8] รวมถึงวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มีคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) เป็นส่วนประกอบ จากการใช้วิธีพื้นฐานดังกล่าว พบว่าสามารถช่วยลดการเกิดฟันผุได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่ความชุกของการเกิดฟันผุก็ยังคงสูงอยู่และในปัจจุบันพบว่าเชื้อก่อโรคในช่องปากหลายชนิดมีความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้น ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเริ่มใช้ไม่ได้ผล เช่น เพนนิซิลลิน (penicillin), อิริโทรไมซิน (erythromycin), เตตราซัยคลิน (tetracyclin), เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) และเมโทรนิดาโซล (metronidazole) ทั้งยังมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น อากาศอาเจียน, ท้องเสีย และมีคราบสีเกิดขึ้นที่ฟัน หลายประเทศจึงต้องหาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ป้องกันและรักษาโรคในช่องปากที่มีความปลอดภัยไม่มีผลข้างเคียง มีประสิทธิภาพดี และราคาถูกลง จึงมีความพยายามที่จะศึกษาวิธีการใหม่ ๆ ที่จะนำมาช่วยเสริมวิธีเดิมที่ใช้กันอยู่วิธีหนึ่งในนั้น คือ การนำโพรไบโอติกส์มาช่วยลดการเกิดฟันผุ

องค์การอนามัยโลกได้ให้คำนิยามว่าโพรไบโอติกส์ คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ จะส่งผลดีต่อสุขภาพร่างกาย อาจให้ผลในการช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ได้^[9] ความเชื่อที่ว่าโพรไบโอติกส์มีอิทธิพลต่อสุขภาพของมนุษย์ ได้เกิดขึ้นในช่วง

ศตวรรษที่ 20 เมื่อ DR.Elise Metchnikoff ได้ตั้งข้อสังเกตว่า เชื้อดัดแลบที่ชาวบัลแกเรียมีอายุยืนยาว น่าจะมาจากการบริโภคโยเกิร์ต (yogurt) ที่มีส่วนประกอบของแบคทีเรียที่มีชื่อว่า แลคโตบาซิลลัส บัลแกริกัส (*Lactobacillus bulgaricus*) เป็นประจำ จึงเกิดแนวคิดที่ว่านอกจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแล้ว ในธรรมชาติยังมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพที่ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรค รุกรานเข้าสู่ร่างกายอีกด้วย โดยโพรไบโอติกส์ที่สามารถหาได้ใกล้ตัวมนุษย์มากที่สุดคือ เชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่มีอยู่แล้วในร่างกายของมนุษย์^[10]

มีการศึกษาที่สนับสนุนถึงความสัมพันธ์ของที่มาและชนิดของเชื้อประจำถิ่นกับการเกิดฟันผุ พบว่ารูปแบบของการคลอดสามารถกำหนดชนิดของเชื้อประจำถิ่นในช่องปากได้ โดยทารกที่คลอดด้วยวิธีธรรมชาติผ่านทางช่องคลอดของมารดา จะได้รับเชื้อโพรไบโอติกส์ ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ดี บริเวณช่องคลอดของมารดาเข้าไปตั้งถิ่นฐานในช่องปากและลำไส้ของทารก^[11] เชื้อเหล่านี้อาจช่วยให้เชื้อที่ก่อโรคฟันผุเข้ามารุกรานได้ช้าลง ในขณะที่ทารกที่คลอดโดยการผ่าคลอดจะมีปริมาณเชื้อที่ดีน้อยกว่าในช่วงเดือนแรกหลังคลอด^[12] ผลการศึกษานี้ได้สนับสนุนแนวคิดว่า การนำเอาโพรไบโอติกส์แบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันฟันผุ โดยคุณสมบัติของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส์ประกอบด้วย 1) เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์อยู่แล้ว 2) เป็นประโยชน์และไม่ก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย 3) สามารถมีชีวิตอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดได้ (กรณีที่ใช้ในระบบทางเดินอาหาร) 4) สามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดี 5) มีฤทธิ์ยับยั้งหรือกำจัดเชื้อก่อโรค^[10] เชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ถูกนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุ หรือยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดฟันผุมักเป็นกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) ได้แก่ แลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*)^[13-18] บิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacteria*)^[19-23] และสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*)^[24] โดยแลคโตบาซิลไลเป็นเชื้อที่มีการนำมาศึกษาประสิทธิภาพมากที่สุด ในบรรดาเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง กำจัดเชื้อก่อโรคหรือเชื้อที่ก่อโรคฟันผุของโพรไบโอติกส์ คือ 1) เข้าจับกับเชื้อก่อโรคเพื่อลดฤทธิ์ในการก่อโรค 2) แข่งกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับพื้นผิวต่าง ๆ ในร่างกาย 3) แย่งอาหารหรือปัจจัยต่าง ๆ ที่เชื้อก่อโรคต้องใช้ในการเจริญเติบโต 4) สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งในรูปแบบต่าง ๆ เช่น สารอนุมูลอิสระ (free radicals), แบคเทอริโอซิน (bacteriocin), กรดอินทรีย์ (organic acid), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด (acidic substance) 5) ยับยั้งการผลิตและการออกฤทธิ์ของสารพิษจากเชื้อก่อโรค 6) กระตุ้นและช่วยปรับสมดุลระบบภูมิคุ้มกันทั้งที่มีมาแต่กำเนิดและที่ได้มาภายหลัง เพื่อให้สามารถต่อต้านกับเชื้อก่อโรคได้ดีขึ้น^[10]

ผลิตภัณฑ์หรืออาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์โดยส่วนใหญ่ จะผลิตออกมาใน 4 รูปแบบ ดังนี้^[10] 1) ผสมในเครื่องดื่ม เช่น น้ำผลไม้, น้ำหวาน และน้ำดื่ม เป็นต้น 2) ผสมกับสารจำพวก โพรไบโอติกส์เพื่อให้ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (โพรไบโอติกส์ คือ สารอาหารที่มนุษย์ย่อยนำไปใช้ประโยชน์ ไม่ได้ ซึ่งจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ อาหารกลุ่มนี้มักเป็น คาร์โบไฮเดรตสายสั้นหรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลจำนวนไม่กี่โมเลกุล ซึ่งไม่ถูกย่อยในกระเพาะและลำไส้เล็กของมนุษย์ จึงเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และกลายเป็น อาหารจำเพาะของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น แลคโตบาซิลไล, บิฟิโดแบคทีเรีย) 3) ผสมใน ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมผง, เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของนม, โยเกิร์ต และเนยแข็ง เป็นต้น 4) ผลิตในรูปแบบของอาหารเสริม อาจมีลักษณะเป็นเม็ด (tablet), หมากฝรั่ง (chewing gum), เม็ดอม (lozenges), ยาหยด (drops) หรือเป็นผงใส่ในหลอดสำหรับดูด (straw) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่เป็น รูปแบบดั้งเดิม คือ ผสมอยู่ในโยเกิร์ต และผลิตภัณฑ์จากนมอื่น ๆ ซึ่งน่าจะเป็นรูปแบบที่ใกล้เคียง ธรรมชาติมากที่สุด การผสมกับนมยังมีข้อดีอีกหลายประการ คือ นมเป็นสารอาหารหลักที่จำเป็น ในการเจริญเติบโต ซึ่งทารกและเด็กต้องได้รับประทานอยู่แล้ว มีส่วนประกอบที่ช่วยคืนกลับแร่ธาตุ ให้แก่ฟัน เช่น สารเคซีน (casein), แคลเซียม (calcium) และฟอสฟอรัส (phosphorus)^[25] สามารถผลิตออกมาในรูปแบบนมผง ซึ่งใช้ได้ง่าย ผลิตภัณฑ์มีอายุนาน และช่วยเก็บรักษา โพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตได้ดี^[26] ปริมาณหรือความเข้มข้นของโพรไบโอติกส์ที่แนะนำให้เติมลงใน ผลิตภัณฑ์ เพื่อให้การป้องกันหรือรักษาโรคเกิดประสิทธิภาพสูงสุด อาจมีปริมาณที่แตกต่างกัน ไป ขึ้นอยู่กับโรคที่รักษาและสายพันธุ์ที่นำมาใช้ โดยทั่วไปแนะนำให้มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10^7 - 10^8 โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (colony-forming unit per milliliter หรือ CFU/mL)^[27-29] นอกจากนี้ หากต้องนำมาใช้เพื่อลดการเกิดฟันผุ ผลิตภัณฑ์นั้นไม่ควรมีส่วนผสมของน้ำตาล

ในปัจจุบันมีการนำโพรไบโอติกส์ มาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุอย่าง แพร่หลายโดยศึกษาหาสายพันธุ์, รูปแบบ, ปริมาณ, ความถี่ และช่วงอายุที่ควรให้ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ เป็นประโยชน์ในการวางแผนการนำมาใช้ต่อไปในอนาคต อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายใน ท้องตลาดของประเทศไทยมีการผสมโพรไบโอติกส์ชนิดต่าง ๆ กันไปทั้งแบบสายพันธุ์เดี่ยวและ หลายสายพันธุ์ เช่น นมเบรียวพร้อมดื่มเมจิ ไพเจน โปรไฟว์ (Meiji paigen pro5®) มีจุลินทรีย์แลคโต บาซิลลัส บัลการิคัส (*Lactobacillus bulgaricus*), สเตรปโตคอคคัส เทอโมฟิลัส (*Streptococcus thermophilus*) และแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี (*Lactobacillus paracasei*), โยเกิร์ตพร้อมดื่มดัชชี ดูโอ โพรไบโอติกส์ (Dutchy duo probiotics®) มีจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส (*Lactobacillus bulgaricus*), สเตรปโตคอคคัส เทอโมฟิลัส (*Streptococcus*

thermophilus), บิฟิโดแบคทีเรียแลคทิส (*Bifidobacterium lactis*) และแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส (*Lactobacillus rhamnosus*), นมเปรี้ยวพร้อมดื่มปาร์ตี้ แดรี่ (Party dairy®) มีจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี (*Lactobacillus paracasei*), นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยาคุลต์ (Yakult®) มีจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส คาเซอี สายพันธุ์ชิโรต้า (*Lactobacillus casei* Shirota strain), นมเปรี้ยวพร้อมดื่มดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมุลัส (Dutchmill delight IMULUS®) มีจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี (*Lactobacillus paracasei*), โยเกิร์ตพร้อมดื่มโยลิดา โพรไบโอ (Yolida probio®) มีจุลินทรีย์บิฟิโดแบคทีเรียแลคทิส (*Bifidobacterium lactis*), แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลัส (*Lactobacillus acidophilus*), แลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี (*Lactobacillus paracasei*), สเตรปโตคอคคัส เทอโมฟิลัส (*Streptococcus thermophilus*) และแลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส (*Lactobacillus bulgaricus*) และนมเปรี้ยวพร้อมดื่มบีทาเก้น สุตรพร้อมมันเนย (Betagen light®) มีจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส คาเซอี (*Lactobacillus casei*) เป็นต้น ซึ่งคนทั่วไปสามารถเลือกซื้อดื่มได้ง่าย และสามารถดื่มได้ในทุกวัน โดยผลิตภัณฑ์ที่วางขายในท้องตลาดประเทศไทยเหล่านี้ มีการเติมโพรไบโอติกส์ในผลิตภัณฑ์และทำการตลาดเพื่อหวังผลช่วยในด้านระบบขับถ่าย, กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นส่วนใหญ่ ยังไม่มีผลิตภัณฑ์ใดที่เติมโพรไบโอติกส์แล้วทำการตลาดเน้นไปที่การช่วยป้องกันฟันผุ อาจเป็นเพราะยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังในด้านนี้สำหรับประเทศไทย จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของผลิตภัณฑ์ผสมโพรไบโอติกส์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดประเทศไทยต่อจำนวนเชื้อก่อโรคฟันผุ โดยตั้งสมมติฐานว่าหากโพรไบโอติกส์สามารถทำให้เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ลดจำนวนลงได้ จะช่วยให้ความเสี่ยงต่อการเกิดฟันผุลดลงตามไปด้วย

คำถามวิจัย

นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมุลัส® มีผลต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคฟันผุหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทำการศึกษาผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมุลัส® ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายของมนุษย์

ความสำคัญของการวิจัย

ฟันผุมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยประกอบกัน ปัจจัยหลักสำคัญ 4 ปัจจัย คือ เชื้อจุลินทรีย์, อาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตแป้งและน้ำตาล, องค์ประกอบต่าง ๆ ในช่องปากของผู้ป่วย (เช่น ลักษณะผิวฟันหรือคุณภาพของน้ำลาย) และระยะเวลาที่ฟันสัมผัสกับกรด นับตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันได้มีการหาแนวทางในการป้องกันฟันผุหลากหลายวิธี ทั้งวิธีที่มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดสาเหตุโดยตรงที่ทำให้ฟันผุ เช่น การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นชีวภาพ การให้คำแนะนำเพื่อควบคุมการรับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของแป้งและน้ำตาล เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีที่มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยคืนกลับแร่ธาตุ เช่น การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผสมฟลูออไรด์ (fluoride) การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผสมแคลเซียมฟอสเฟต เป็นต้น อีกทั้งยังมีวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มีคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) เป็นส่วนประกอบ จากการใช่วิธีพื้นฐานดังกล่าว พบว่าสามารถช่วยลดการเกิดฟันผุได้ผลในระดับหนึ่ง แต่ความชุกของการเกิดฟันผุก็ยังคงสูงอยู่ จึงมีความพยายามที่จะศึกษาวิธีการใหม่ ๆ ที่จะนำมาช่วยเสริมวิธีเดิมที่ใช้กันอยู่ วิธีหนึ่งในนั้น คือ การนำโพรไบโอติกส์มาช่วยลดการเกิดฟันผุ ซึ่งโพรไบโอติกส์ที่สามารถหาได้ใกล้ตัวมนุษย์มากที่สุด คือ เชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่แล้วในร่างกาย และในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดเป็นจำนวนมากที่มีการเติมโพรไบโอติกส์เพื่อหวังผลต่าง ๆ กันไป เช่น ช่วยในระบบขับถ่าย, ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลิตภัณฑ์ที่สามารถหาซื้อได้ในท้องตลาดและมีการเติมโพรไบโอติกส์ว่ามีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย ซึ่งเป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการก่อโรคฟันผุได้สูง และสัมพันธ์กับสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุมากที่สุด โดยหากโพรไบโอติกส์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ ทำให้สามารถกำจัดปัจจัยเสี่ยงในการก่อโรคฟันผุได้อีกวิธี

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาวิจัยแบบ สุ่มอำพรางทางเดียวมีกลุ่มควบคุมแบบไขว้กลุ่ม (single-blind randomized controlled crossover research) ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่ได้จากน้ำลายมนุษย์ก่อนและหลังการดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดักซ์มิลล์ ดีไลท์ อิมุลัส® โดยการนับจำนวนเชื้อเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อดูผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดักซ์มิลล์ ดีไลท์ อิมุลัส® ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยจะทำการเปรียบเทียบทั้งภายในกลุ่ม (intragroup comparison) และระหว่างกลุ่ม (intergroup comparison)

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ผสมโพรไบโอติกส์ (นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อีมูลส์®)

ตัวแปรตาม ได้แก่ จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

นิยามศัพท์เฉพาะ

Probiotics หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ จะส่งผลดีต่อสุขภาพร่างกาย อาจให้ผลในการช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ได้

Prebiotics หมายถึง สารอาหารที่มนุษย์ย่อยนำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ ซึ่งจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ อาหารกลุ่มนี้มักเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นหรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลจำนวนไม่กี่โมเลกุล ซึ่งไม่ถูกย่อยในกระเพาะและลำไส้เล็กของมนุษย์ จึงเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และกลายเป็นอาหารจำเพาะของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น แลคโตบาซิลไล บิฟิโดแบคทีเรีย

Streptococcus mutans หมายถึง เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

Lactic acid bacteria หมายถึง กลุ่มเชื้อที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นพลังงานและหมักน้ำตาลแบบไม่ใช้ออกซิเจนให้ผลิตผลเป็นกรดแลคติก

Lactobacilli หมายถึง เชื้อแลคโตบาซิลลัส

Bifidobacterium หมายถึง เชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย

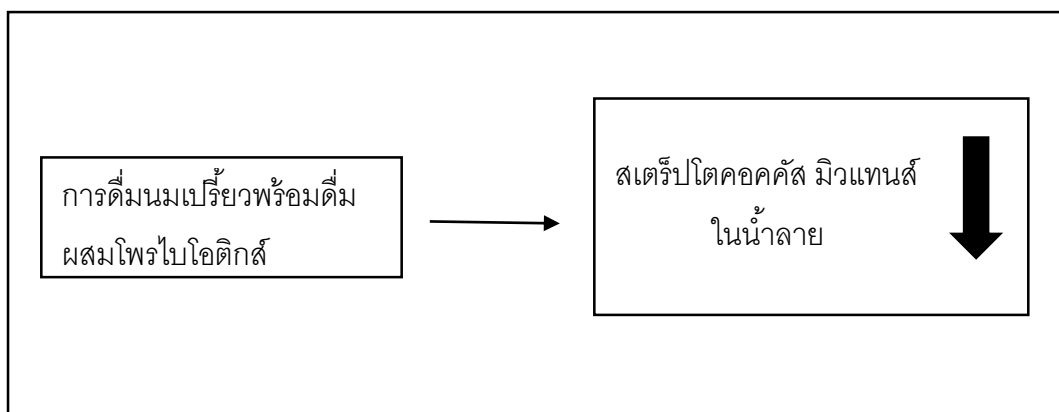
Biofilm หมายถึง ชุมชนของเชื้อโรค

Normal flora หมายถึง เชื้อประจำถิ่น

Acquired pellicle หมายถึง แผ่นคราบน้ำตาล

Dental plaque biofilms หมายถึง คราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน

กรอบแนวคิดวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย

สมมติฐานการวิจัย

การดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อีมูลส์® มีผลลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายของมนุษย์

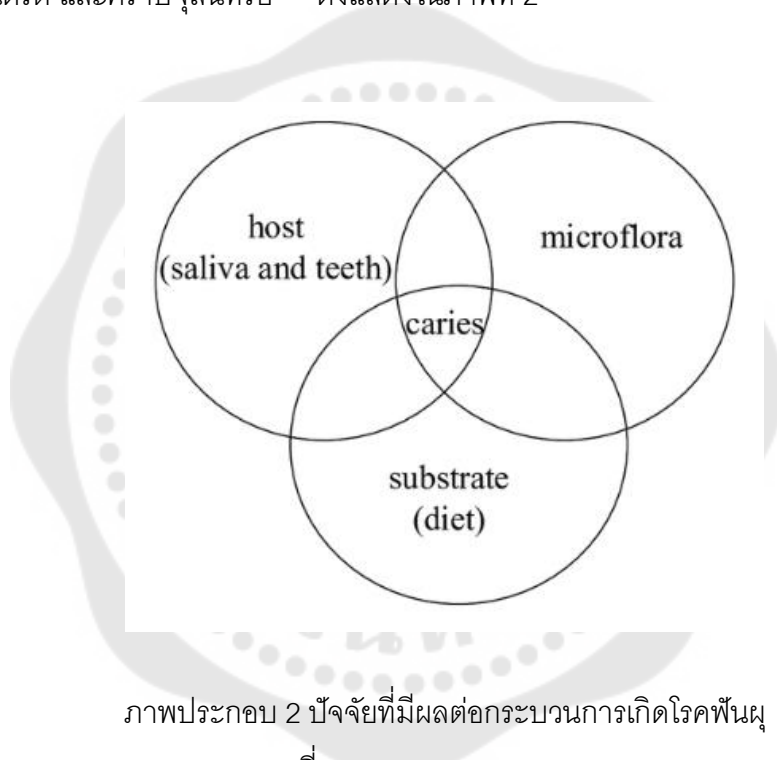
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคฟันผุ

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ

โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน ได้แก่ ปัจจัยภายในตัวของบุคคลหรือโฮสต์ (host) คือ ฟัน, น้ำลาย และแผ่นคราบน้ำลาย (acquired pellicle), อาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และคราบจุลินทรีย์^[30] ดังแสดงในภาพที่ 2



1.ปัจจัยโฮสต์ คือฟัน, น้ำลาย และแผ่นคราบน้ำลาย ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเกิดโรคฟันผุ
ดังนี้

1.1 ฟัน ตำแหน่ง, รูปร่าง, ส่วนประกอบ, โครงสร้าง และอายุของฟัน มีผลต่อกระบวนการเกิดโรคฟันผุ ฟันจะมีความต้านทานต่อการเกิดโรคฟันผุสูงขึ้นหลังจากที่ขึ้นมาในช่องปาก ถ้าสามารถลดการละลายของเคลือบฟันจากกรด จะสามารถลดโอกาสการเกิดฟันผุและเพิ่มความต้านทานต่อการผุของฟันได้ เคลือบฟันของฟันที่เพิ่งขึ้นมาในช่องปากจะมีโอกาสเกิดการผุได้ง่าย แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นความเสี่ยงต่อการเกิดฟันผุลดลง เนื่องจากฟันผ่านกระบวนการสะสมแร่

ธาตุมากขึ้น (maturation process) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของผิวเคลือบฟันและมีการสะสมสารอินทรีย์ในช่องว่างที่เกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุ ซึ่งช่วยในการป้องกันโรคฟันผุ เพราะแร่ธาตุที่สะสมใหม่จะละลายยากกว่าแร่ธาตุเดิม โดยในระหว่างสูญเสียแร่ธาตุ จะมีการสูญเสียอะพาไทต์ (apatite) ที่มีคาร์บอนเนตมากกว่าและมีอะพาไทต์ที่มีคาร์บอนเนตน้อย แต่มีฟลูออไรด์สูงเข้ามาแทนที่ ผลึกซึ่งมีการตกตะกอนใหม่จะใหญ่ขึ้นกว่าผลึกดั้งเดิมทำให้มีบริเวณที่มีการสะสมแร่ธาตุของเคลือบฟันมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นเหตุให้ฟันมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุน้อยลงเมื่ออายุมากขึ้น^[31]

1.2 น้ำลาย อัตราการไหลและส่วนประกอบของน้ำลายเป็นปัจจัยสำคัญ ที่จะปรับเปลี่ยนกระบวนการเกิดโรคฟันผุ กลไกของน้ำลายในการป้องกันโรคฟันผุ ได้แก่ การชะล้างทำให้กรดเจือจางลง และบัฟเฟอร์(buffer) กรดจากคราบจุลินทรีย์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ และยังมีส่วนประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ซึ่งยับยั้งการสูญเสียแร่ธาตุ ส่งเสริมการคืนแร่ธาตุรวมทั้งช่วยในกระบวนการซ่อมแซม สภาวะฟันผุลุกลามจะสัมพันธ์กับการสูญเสียการทำงานของน้ำลาย^[32]

1.3 แผ่นคราบน้ำลาย (acquired pellicle) เป็นคราบอินทรีย์ซึ่งไม่มีเซลล์และเชื้อจุลินทรีย์ อยู่ระหว่างคราบจุลินทรีย์และผิวเคลือบฟัน แผ่นคราบน้ำลายจะเกิดได้ทั่วไปและจะเกิดก่อนคราบจุลินทรีย์ สารอินทรีย์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องในการสร้างแผ่นคราบน้ำลาย ได้แก่ น้ำลาย, ส่วนประกอบหรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์, น้ำเหลืองเหงือก (gingival fluid), เลือด, อาหาร และของเหลวจากเคลือบฟัน แผ่นคราบน้ำลายจะสร้างขึ้น โดยการเกาะอย่างเฉพาะเจาะจง (selective adsorption) ของไกลโคโปรตีนและโปรตีนในน้ำลาย ส่วนประกอบอินทรีย์เหล่านี้ในน้ำลายจะสามารถเกาะผิวเคลือบฟันและมักเกาะอย่างรวดเร็วกับผิวเคลือบฟันที่ทำความสะอาดด้วยผงขัดฟิมีส (pumice) แล้ว แผ่นคราบน้ำลายนี้จะต้องใช้เวลาในการแก่ตัว (maturation) อยู่ช่วงระยะหนึ่งก่อนที่จะป้องกันกรดได้สูงสุด^[33] และอาจต้องใช้เวลา 7 วันหรือมากกว่านั้น การใช้ยาสีฟันที่มีผงขัดหยาบ สารฟอกสีและขัดฟันบ่อย ๆ จะกำจัดแผ่นคราบน้ำลายและเกิดผลเสียต่อผิวเคลือบฟัน เพราะเคลือบฟันจะมีโอกาสสูญเสียแร่ธาตุจากกรดเพิ่มขึ้น การสร้างแผ่นคราบน้ำลายมีผลต่อการซ่อมแซมผิวเคลือบฟัน หลังจากที่ผิวเคลือบฟันถูกกรดกัดกร่อนหรือมีรอยขีดข่วนเพียง 1-2 ชั่วโมง จะมีการสร้างแผ่นน้ำลายที่ผิวเคลือบฟันขึ้นเป็นกระบวนการซ่อมแซมผิวเคลือบฟัน

2. ปัจจัยอาหาร

ความถี่ของการรับประทานอาหารคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายได้จะมีความสัมพันธ์สูงสุดกับการเกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ลักษณะอาหารเหนียวที่ติดฟัน, การมีสารป้องกันฟันผุ (แคลเซียม ฟอสเฟต และฟลูออไรด์) และชนิดของคาร์โบไฮเดรต โดยคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน (แป้ง) จะทำให้ฟันผุยากกว่าน้ำตาลที่ไม่ซับซ้อน (ซูโครส, กลูโคส, ฟรุกโตส)^[34] ซึ่งซูโครสเป็นน้ำตาลที่ทำให้ฟันผุสูงสุด เนื่องจากแบคทีเรียสามารถนำกลูโคสไปใช้สร้างกลูแคน (glucan) นอกเซลล์ได้ ขณะที่แป้งจะละลายยากในช่องปาก และมีอัตราการซึมผ่านคราบจุลินทรีย์ต่ำ เพราะต้องแตกตัวเป็นมอลโตส (maltose) โดยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ในน้ำลายก่อนที่จะซึมผ่านคราบจุลินทรีย์จะนำไปใช้ ด้วยเหตุนี้แป้งส่วนใหญ่จะถูกชะล้างออกไปจากช่องปากก่อนที่จะมีการแตกตัว การที่ซูโครสทำให้ฟันผุได้ง่ายนั้นส่วนหนึ่งเป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ซูโครสไปสร้างพอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) ซึ่งทำให้สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans* หรือ *S. mutans*) เกาะที่คราบจุลินทรีย์ได้ง่าย^[35] ในการศึกษาฟันผุในช่องปาก คราบจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วย *S. mutans* ซึ่งสร้างจากการเพาะเลี้ยงด้วยซูโครสจะส่งเสริมการสูญเสียแร่ธาตุจากฟันดีกว่าคราบจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของคราบจุลินทรีย์ อันเป็นผลจาก *S. mutans* สร้างกลูแคนจากซูโครส ซึ่งกลูแคนนี้เป็นสารที่ไม่ละลายและอยู่นอกเซลล์ สารนี้จะทำให้การซึมผ่านของคาร์โบไฮเดรตในอาหารเข้าสู่คราบจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้น

3. คราบจุลินทรีย์ (dental plaque biofilms)

เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในคราบจุลินทรีย์เป็นตัวสำคัญในกระบวนการเกิดโรคฟันผุ ได้แก่ กลุ่มมิวแทน สเตรปโตคอคคัส (mutans streptococci หรือ MS) เช่น สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans* หรือ *S. mutans*) สเตรปโตคอคคัส ซอบรีนัส (*Streptococcus sobrinus* หรือ *S. sobrinus*) นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์แลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*) แอ็คทีโนไมซิส (*Actinomyces*) กลุ่มนอนมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส (Non-mutans streptococci) และยีสต์ (Yeast) ความรุนแรงของเชื้อจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างกรดต่อเนื่องที่ pH ต่ำ ๆ ทำให้ฟันสูญเสียแร่ธาตุ โดยเมื่อมีการใช้คาร์โบไฮเดรตจากอาหารจนหมด เชื้อจุลินทรีย์จะสามารถสร้างและใช้พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์และในเซลล์มาสร้างกรด การสร้างกลูแคนซึ่งไม่ละลายน้ำ จะช่วยในการเกาะของ MS ที่คราบจุลินทรีย์ และปรับเปลี่ยนการซึมผ่านของคราบจุลินทรีย์ ทำให้ยับยั้งสารอาหาร (dietary substrates) ซึมเข้าสู่ชั้นลึกลงไปของคราบจุลินทรีย์ที่ใกล้ผิวฟัน คุณสมบัติของ MS ดังกล่าวนี้นี้จึงมีบทบาทในการเกิดโรคฟันผุมาก^[3]

การป้องกันและควบคุมฟันผุ

จากสาเหตุและกลไกการเกิดโรคฟันผุที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นหลักการของการควบคุมโรคฟันผุสามารถทำได้โดยการควบคุมคราบจุลินทรีย์จากการแปรงฟัน และดูแลอนามัยในช่องปากเป็นประจำ การลดปริมาณและความถี่ในการบริโภคอาหารจำพวกน้ำตาล ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถควบคุมฟันผุได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามมีทางเลือกที่สามารถนำมาเสริมการป้องกันฟันผุ ดังนี้

1. การใช้น้ำตาลเทียมแทนน้ำตาลซูโครส (sugar substitutes) น้ำตาลที่มักใช้ทดแทนได้แก่ น้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แซคคาริน แอสปาแตม สารเหล่านี้ให้ความหวานหากแต่ไม่เกิดกรดแลคติก จึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ

2. การใช้ฟลูออไรด์ ฟลูออไรด์ช่วยป้องกันฟันผุได้ โดยหากมีการใช้ฟลูออไรด์ระหว่างกระบวนการสร้างผิวเคลือบฟัน (amelogenesis) ของเด็ก ฟลูออไรด์จะแทนที่กลุ่มไฮโดรซิล จะเกิดการสร้างฟลูออโรอะพาไทท์ ซึ่งละลายในกรดได้ยากกว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ นอกจากนี้ฟลูออไรด์ยังช่วยในกระบวนการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ของฟันผุระยะแรกในรอยผุ ซึ่งเกิดที่ผิวเคลือบฟันและเนื้อฟัน และฟลูออไรด์ขัดขวางการสร้างคราบจุลินทรีย์ โดยการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการสร้างอาหารและคราบจุลินทรีย์ วิธีการใช้ฟลูออไรด์เพื่อป้องกันฟันผุที่มีความคุ้มค่าสูง (cost effectiveness) ที่มีรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา คือ การเติมฟลูออไรด์ในน้ำประปาที่ใช้ดื่มด้วยความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม ซึ่งความเข้มข้นในการเติมฟลูออไรด์อาจน้อยกว่า 1 พีพีเอ็ม โดยเฉพาะในประเทศที่มีอากาศร้อน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดฟันตกกระ อันเนื่องจากการดื่มน้ำที่มีฟลูออไรด์ในแต่ละวันเป็นปริมาณมาก อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน จะเน้นการใช้ฟลูออไรด์เฉพาะที่ เช่น ในรูปแบบของยาสีฟันผสมฟลูออไรด์ น้ำยาบ้วนปาก เจลทาเฉพาะที่ และจะให้ใช้ยาเม็ดฟลูออไรด์เฉพาะกับบุคคลที่มีความเสี่ยงต่อโรคฟันผุสูง เพื่อป้องกันการเกิดฟันตกกระอันเนื่องจากการใช้ฟลูออไรด์ทางระบบ

3. การใช้สารเคลือบหลุมร่องฟัน (sealants) การใช้สารซีแลนต์นี้กักหลุมและรอยแยกของฟันเพื่อป้องกันฟันผูด้านบดเคี้ยว ควรใช้ก่อนการเกิดรอยโรคฟันผุ และใช้ได้กับฟันผุระยะแรกไม่ให้อุกลามต่อไป

4. การใช้สารต้านจุลชีพ ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ สารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีประสิทธิภาพดีในการขัดขวางการสร้างคราบจุลินทรีย์ โดยการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ลดการยึดเกาะของผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเกาะเซลล์เยื่อผิวในช่องปาก และแบคทีเรียไม่สามารถเกาะระหว่างแบคทีเรียด้วย

กันเอง เป็นการขัดขวางการสร้างควาบกจุลินทรีย์ และมิวแทนส์ สเตริปโตคอคไคเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความไว (susceptible) ต่อคลอเฮกซิดีน จึงมีผลโดยตรงในการควบคุมฟันผุ การใช้สารละลายคลอเฮกซิดีนมักใช้ในระยะสั้น เนื่องจากมีข้อเสียที่รชาติ

5. การใช้วัคซีน การกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันโดยการใช้แอนติเจน I และ II ซึ่งเป็นแอนติเจนของผนังเซลล์แบคทีเรีย หรือใช้แอนติเจนของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างกลูแคน แอนติเจนที่ใช้เหล่านั้น มีความสำคัญต่อการก่อการยึดเกาะของมิวแทนส์ สเตริปโตคอคไค ผลการทดลองในหนูและลิง พบฟันผุในสัตว์ทดลองลดลง โดยภูมิต้านทานที่สร้างจากการกระตุ้นของแอนติเจนสามารถขัดขวางการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเชื้อมิวแทนส์ สเตริปโตคอคไค อย่างไรก็ตามพบว่า แอนติบอดีที่สร้างได้หลังจากการกระตุ้นมีปฏิกิริยาข้าม (cross-react) กับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ จึงเป็นเหตุผลที่ไม่มีการนำมาทดลองในคน ประกอบกับโรคฟันผุไม่ใช่โรคที่คุกคามจนเสียชีวิตในทันที ดังนั้นการใช้วิธีป้องกันอื่น ๆ ดังกล่าวข้างต้นจึงเป็นทางเลือกมากกว่าการใช้วัคซีน อย่างไรก็ตามมีการสร้างแอนติบอดีชนิด sIgA ได้จากพืช โดยการกระตุ้นด้วยแอนติเจน I และ II และพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถคงทนในช่องปากได้ดีกว่าชนิด IgA เมื่อทดลองนำมาใช้ทาที่ผิวฟัน ดังนั้น sIgA นี้อาจมีประโยชน์ในการป้องกันฟันผุในอนาคต

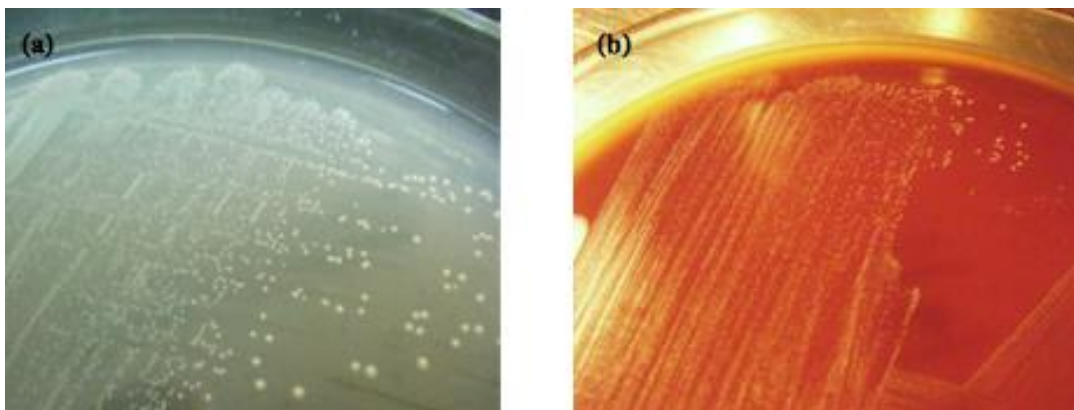
6. การรักษาแบบแทนที่ (replacement therapy) ปัจจุบันเทคโนโลยีได้ก้าวหน้าไปมาก ได้มีการสร้างแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย (mutant) ของมิวแทนส์ สเตริปโตคอคไคดังกล่าวข้างต้น จึงมีความคิดในการนำมิวแทนส์ สเตริปโตคอคไคสายพันธุ์กลายที่ไม่มีเอนไซม์แลคเตส ดีไฮโดรจีเนส หรือไม่มีเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส มาแทนที่สายพันธุ์เดิมที่มีอยู่ในช่องปาก ซึ่งจะทำให้ไม่เกิดฟันผุ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดที่ต้องศึกษาอีกมากหากจะนำมาใช้จริง

จากการใช้วิธีพื้นฐานดังกล่าว พบว่าสามารถช่วยลดการเกิดฟันผุได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่ความชุกของการเกิดฟันผุก็ยังคงสูงอยู่ จึงมีความพยายามที่จะศึกษาวิธีการใหม่ ๆ ที่จะนำมาช่วยเสริมวิธีเดิมที่ใช้กันอยู่ วิธีหนึ่งในนั้น คือ การนำโพรไบโอติกส์มาช่วยลดการเกิดฟันผุ ซึ่งโพรไบโอติกส์ที่สามารถหาได้ใกล้ตัวมนุษย์มากที่สุด คือ เชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่แล้วในร่างกาย และในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดเป็นจำนวนมากที่มีการเติมโพรไบโอติกส์เพื่อหวังผลต่าง ๆ กันไป เช่น ช่วยในระบบขับถ่าย, กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลิตภัณฑ์ที่สามารถหาซื้อได้ในท้องตลาดและมีการเติมโพรไบโอติกส์ ว่ามีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อสเตริปโตคอคคัส มิวแทนส์ในช่องปาก ซึ่งเป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการก่อโรคฟันผุได้สูง และสัมพันธ์

กับสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุมากที่สุด โดยหากโพรไบโอติกส์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ ทำให้สามารถกำจัดปัจจัยเสี่ยงในการก่อโรคฟันผุได้อีกวิธี

เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (gram-positive cocci) ขนาด 0.5-0.75 μm เรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ หรือสายยาวปานกลาง ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสภาวะเป็นกรดหรืออาหารแข็ง เซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ๆ ขนาด 1.5-3 μm โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากช่องปากจะพบรูปร่างแบบนี้ได้บ่อย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) เมื่อทดสอบคะตะเลส (catalase) ให้ผลลบ ถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหารเลือด (blood agar หรือ BA) และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) เป็นเวลา 2 วัน โคโลนีจะมีสีขาวหรือสีเทา รูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน (irregular) ขนาด 0.5-1.0 μm ตามแสดงในภาพที่ 3 บางครั้งโคโลนีจะค่อนข้างเหนียว มีแนวโน้มที่จะเกาะติดบนผิวอาหาร ไม่ละลายเมื่อดูดแดง (alpha or non-hemolytic) แต่มีโอกาพบ beta-hemolytic บนอาหารที่มีส่วนผสมของซูโครส เช่น ไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ (mitis salivarius agar) หรือ ทริปโตเนียส แอกลูซีนซิสตีนอะการ์ (tryptone yeast extract cysteine agar) ซึ่งโคโลนีจะมีรูปร่างขรุขระ กองทับกัน ขนาด 1.0 μm บ่อยครั้งที่พบโคโลนีมีลักษณะคล้ายเม็ดปัดส์ ตรีอปเล็ทส์ (droplets) หรือของเหลว ซึ่งเกิดจากเชื้อสร้างเอ็กตร้าเซลล์ูลาร์ โพลีแซ็กคาไรด์ (extracellular polysaccharide) หรือกลูแคน (glucan) ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้อยู่รอบ ๆ โคโลนี แต่บางครั้งจะพบเป็นแบบเรียบ ๆ หรือเป็นเมือก^[36] สภาวะอากาศที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ มักจะมีไนโตรเจนร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ หรือคาร์บอนไดออกไซด์เป็นหลัก แต่จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีคือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 และต่ำสุด 10 องศาเซลเซียสตามลำดับ^[36]



ภาพประกอบ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทริปโตไนส์แอกเทรียซซีสตินอะการ์ (tryptone yeast extract cysteine agar) (a)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์บนอาหารเลือด (blood agar) (b)

ที่มา <https://www.slideshare.net/DanaSinzianaBreharCi/staphylococcus-streptococcus-bacteriological-diagnosisii-72403917>

จากงานวิจัยจำนวนมากพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์มีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นทำให้เกิดโรคฟันผุ และสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีฟันผุหรือรอยโรคฟันผุ และเมื่อให้สัตว์ทดลองกินน้ำตาลซูโครสเป็นอาหาร พบว่าเชื้อสามารถเหนียวน้ำให้เกิดฟันผุในสัตว์ทดลอง ซึ่งเหตุผลเหล่านี้เป็นสิ่งยืนยันว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคฟันผุที่ผิวฟันและรากฟัน^[37]

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิด ในขณะที่ไวรัสสามารถเจริญเติบโตได้ในสิ่งมีชีวิตอื่นเท่านั้น จึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ขั้นตอนที่สำคัญประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างตรวจ คือ การเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเบื้องต้น (primary isolating media) เพื่อใช้ในการแยกเชื้ออย่างถูกวิธีและเหมาะสม อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีหลากหลายชนิด ต่างมีคุณสมบัติและวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันออกไป^[38] แยกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

1.อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั่วไป (Nutrient agar)

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้บ่อย คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นผสมเลือด (blood agar) ประกอบด้วยนุเทรียนอะการ์เบส (nutrient agar base) เติมเลือดร้อยละ 5-10 เป็นอาหารที่ดีที่ใช้ได้กับเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญทางการแพทย์เกือบทุกชนิด สามารถใช้ดูชนิดของการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ซึ่งใช้เป็นลักษณะในการระบุชนิดของแบคทีเรียขั้นต้นด้วย

2.อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกกลุ่มแบคทีเรีย (Differential media)

อาหารประเภทนี้ใช้ในการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียในขั้นต้น โดยอาศัยส่วนประกอบที่มีในอาหารเช่น ในแมคคองกีอะการ์ (MacConkey agar) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก แต่แบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่งสามารถขึ้นได้ นอกจากนี้อาหารชนิดนี้ยังสามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มที่ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (lactose fermenter) ให้โคโลนีสีชมพู และกลุ่มที่ไม่ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (non-lactose fermenter) ให้โคโลนีใส ไม่มีสี

3.อาหารที่ช่วยเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย (Enriched media)

อาหารประเภทนี้ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนแบคทีเรียบางชนิดที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างตรวจต่าง ๆ ให้มีมากขึ้นจนสามารถตรวจพบได้เช่น เซเลไนท์เอฟบรธ (Selenite F broth) มีเกลือซีลีเนียม (selenium salts) ทำให้เชื้อ *Samonella spp.* มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดี ไธโอไกลคอลลาท (thioglycollate) เป็นอาหารที่มีสารรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น ซิสเทอีน (cysteine) ทำให้เชื้อแอนแอโรบส์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ดี

4.อาหารคัดเลือกแบคทีเรีย (Selective media)

อาหารประเภทนี้ใช้ในการคัดเลือกชนิดแบคทีเรียที่ต้องการโดยการเติมสารเคมีหรือสารต้านจุลชีพบางชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ ตัวอย่างของอาหารคัดเลือกชนิดแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 1

5.อาหารนำส่งเชื้อ (Transport media)

โดยทั่วไปหลังจากการเก็บตัวอย่างตรวจเพื่อการวินิจฉัยแล้ว ควรจะต้องนำส่งต่อห้องปฏิบัติการเพื่อดำเนินการขั้นตอนต่อไปโดยเร็วที่สุด อย่างไรก็ตามตัวอย่างตรวจส่วนใหญ่ มักจะไม่สามารถถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการได้ในทันที เนื่องจากอยู่ไกลจากห้องปฏิบัติการ จึงจำเป็นต้องมีอาหารนำส่งเชื้อ เพื่อช่วยในการเก็บรักษาเชื้อที่ต้องการให้อยู่รอดได้จนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการ อาหารนำส่งเชื้อแบคทีเรียทั่วไป คือ stuart media^[39] สำหรับการเก็บตัวอย่างตรวจในช่องปาก เชื้อส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) จึงควรใช้

thioglycollate หรืออาหารนำส่งเชื้อที่เติมสารรีดิวซ์ เช่น reducing transport fluid หรือ VMGA III ทั้งนี้เพื่อช่วยให้เชื้อชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถอยู่รอดได้

ตาราง 1 ตัวอย่างของอาหารคัดเลือกชนิดแบคทีเรีย

ที่มา แบคทีเรียในช่องปาก (oral bacteriology), ระวี เกียรติไพศาล, 2007



ชนิดอาหาร	สารที่สกัดเลือกจุดสี	สารที่ทำให้เกิดความต่างของจุดสี	รูปร่างได้		จุดสีที่ได้กับยีน
			ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	
MacConkey	Bile salts Crystal violet	น้ำสาแหรก (neutral red)	เชื้อที่ใช้น้ำสาแหรกได้จะมีโคโลนีสีชมพู เช่น <i>Escherichia coli</i>	เชื้อที่ใช้น้ำสาแหรกได้จะมีโคโลนีใส โคโลนีได้ ไม่มีสี เช่น <i>Salmonella</i>	แบคทีเรียชนิดที่แกรมบวก
Miles-Servarius	Tellurite Crystal violet	น้ำสาแหรก (trypan blue)	โคโลนีขนาดใหญ่ 2 มม. เป็น <i>Streptococcus</i>	โคโลนีขนาดเล็กกว่า 1 มม. เป็น <i>Staphylococcus aureus</i>	staphylococci และ enteric bacilli
Miles-Servarius Bacitracin (42)	Bacitracin		<i>Streptococcus</i> มีโคโลนีรูปร่างเป็น	<i>Mutans streptococci</i> ขึ้นๆ มีโคโลนีเรียบ	แบคทีเรียชนิดที่
Mannitol salt	7.5% NaCl	น้ำสาแหรกเป็น (phenol red)	โคโลนีขนาดใหญ่ สีเหลืองเป็น <i>Streptococcus</i>	โคโลนีขนาดเล็ก สีชมพูเป็น <i>Streptococcus</i>	Streptococci และ enteric bacilli
Lowenstein-Jensen	Malachite green		รูปร่างเป็น <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	เรียบ มีสีเป็น atypical mycobacteria	แบคทีเรียชนิดที่
Typtic Soy Serum Bacitracin/Vancomycin	Bacitracin vancomycin		รูปร่างคล้ายดาว (star-shaped) เป็น <i>Streptococcus</i>		แบคทีเรียชนิดที่
Sabouraud	acids		โคโลนีสีชมพูเป็น <i>Candida</i>		แบคทีเรียชนิดที่
Rogosa	acids		lactobacilli		แบคทีเรียชนิดที่

อาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ (mitis salivarius agar หรือ MS agar) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่ใช้แยกเชื้อสเตรปโตคอคคัส สปีชีส์ การเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 และยาปฏิชีวนะแบซิทรากซิน (bacitracin) 0.2 ยูนิตต่อมิลลิเมตรลงในไมติส ซาลิวาเรียสอะการ์ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทรากซิน อะการ์ (mitis salivarius bacitracin agar หรือ MSB agar) การเติมแบซิทรากซินจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของสเตรปโตคอคคัสตัวอื่น ๆ ในช่องปาก ยกเว้นเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส จึงใช้อาหารนี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะในการแยกเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัสบางสายพันธุ์ เช่น สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทรากซิน อะการ์ แต่จะได้โคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน คือ โคโลนีของสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์จะทึบ ขรุขระ ไม่เรียบ ส่วนโคโลนีของสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัสมักมีรูปร่างเป็นแฉก และมีวงขาวขุ่นล้อมรอบแต่เป็นลักษณะที่ไม่แน่นอน^[40] อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการคัดค้านอาหารเลี้ยงเชื้อมาหลายชนิด แต่บางชนิดเตรียมยาก ต้องผสมสารหลายอย่าง บางชนิดมีราคาแพง ทำให้ไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทรากซิน อะการ์ที่ผสมซูโครสยังคงใช้งานกันประจำในชีวิตประจำวัน เพราะยังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะสูงในการแยกเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส โดยเฉพาะสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์จะเจริญได้ดีในอาหารชนิดนี้^[40]

โพรไบโอติกส์

ด้วยเทคโนโลยีที่มีความก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ดีขึ้น ปกติภายในร่างกายของมนุษย์มีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก โดยมีทั้งก่อประโยชน์และก่อโทษต่อร่างกาย มุมมองของมนุษย์ต่อเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นด้านที่ก่อโทษต่อร่างกาย เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่าง ๆ เช่น โรคฉี่หนู, โรคคออักเสบ, โรคท้องเสีย และโรคฟันผุ เป็นต้น แต่ยังมีเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์อีกมากมายที่ยังไม่ถูกค้นพบ ในช่วงศตวรรษที่ 20 เมื่อ DR.Elise Metchnikoff ได้ตั้งข้อสังเกตว่า เชื้อดัดแล็บที่ชาวบัลแกเรียมีอายุยืนยาวน่าจะมาจากการบริโภคโยเกิร์ต (yogurt) ที่มีส่วนประกอบของแบคทีเรียที่มีชื่อว่า แลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส (*Lactobacillus bulgaricus*) เป็นประจำ จึงเกิดแนวคิดว่านอกจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแล้ว ในธรรมชาติยังมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพที่ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคุกรานเข้าสู่ร่างกายอีกด้วย

คำจำกัดความของโพรไบโอติกส์ในระยะแรก หมายถึง สารที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง^[41] ซึ่งลักษณะการทำงานจะ

ตรงข้ามกับยาปฏิชีวนะที่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ต่อมามีความหมายที่เฉพาะเจาะจงมากขึ้น โดยหมายถึงสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้^[42] อาจจะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวหรือส่วนผสมของแบคทีเรียหลายชนิดรวมกัน ทำหน้าที่ปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตเพื่อเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย

ประโยชน์ของโพรไบโอติกส์ต่อร่างกายมีหลายด้านตั้งแต่ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ รักษาความเป็นกรด-ด่างของลำไส้ภายหลังได้รับยาปฏิชีวนะและระบบขับถ่ายดีขึ้น เพราะลดการสะสมของของเสียภายในร่างกาย ดังนั้นจึงลดความเสี่ยงของโรคลำไส้อักเสบและลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมให้กลับสู่ภาวะสมดุล ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด รักษาโรคหอบหืด ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ย่อยน้ำตาลในนมเพื่อป้องกันอาการท้องอืดจากการดื่มนม ดูดซึมแคลเซียมได้เพิ่มขึ้น ลดระดับน้ำตาลและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด^[43]

โพรไบโอติกส์กับการรักษาโรคในช่องปาก

ในวงการแพทย์ มีการนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีประโยชน์ต่อสู้กับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อต่าง ๆ ผลิตเป็นโพรไบโอติกส์ เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และป้องกันการเกิดภาวะการติดเชื้อ โรคฟันผุที่มีสาเหตุหนึ่งมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ทางด้านทันตกรรมจึงสนใจนำเชื้อโพรไบโอติกส์มาใช้ประโยชน์ต่อโรคฟันผุ แบ่งเป็น 2 ทาง ทางแรก คือการศึกษาผลของโพรไบโอติกส์ต่อเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปฏิบัติการ ทางที่สอง คือ การหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในร่างกาย เพื่อศึกษาคุณสมบัติการป้องกันฟันผุ

การศึกษาผลของโพรไบโอติกส์ต่อเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปฏิบัติการ โดยนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ทดสอบกับเชื้อสเตรปโตคอคไค เช่น การศึกษาของ Comelli และคณะ ที่นำเชื้อแบคทีเรียซึ่งใส่ในนม มาวิเคราะห์หาเชื้อที่สามารถเป็นโพรไบโอติกส์สำหรับช่องปาก พบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอโมฟิลัส NCC1561 (*Streptococcus thermophiles* NCC1561) และเชื้อแลคโตคอคคัส แลคทิส NC2211 (*Lactococcus lactis* NC2211) สามารถลดการยึดติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส OMZ176 บนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย และเชื้อแลคโตคอคคัส แลคทิส NC2211 สามารถลดปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัสและเชื้อสเตรปโตคอคคัส ออราลิส อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)^[44] นอกจากนี้ใน

การศึกษาของ Nikawa และคณะ ยังพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส รูทีไร SD2112 ในโยเกิร์ตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ได้^[15]

การค้นหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น อุจจาระ ลำไส้ เยื่อเมือกในช่องปาก และน้ำลายในช่องปากของผู้มีสุขภาพดี เพื่อนำเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษาคุณสมบัติการป้องกันโรคฟันผุ เช่น ในปี ค.ศ.1987 Silva และคณะ คัดแยกเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี (*Lactobacillus rhamnosus* GG) จากอุจจาระมนุษย์พบคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้หลายสปีชีส์ ได้แก่ เชื้อสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*), เชื้อสแตฟิโลคอคคัส (*Staphylococcus*), เชื้อซูโดโมแนส (*Pseudomonas*), เชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium*), เชื้อแบคทีเรียดีส (*Bacteroides*) และเชื้อคลอสตริเดียม (*Clostridium*)^[45] ในปีค.ศ.1998 Ahrne และคณะ พบเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เชื้อแลคโตบาซิลลัส แพลนทารัม (*Lactobacillus plantarum*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอ ซับสปีชีส์พาราคาเซอ (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) ในลำไส้ใหญ่และเยื่อเมือกช่องปากของผู้มีสุขภาพดี ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการนำเชื้อเหล่านี้เป็นโพรไบโอติกส์^[46] สำหรับประเทศไทย ในปี ค.ศ.2001 Sookkhee และคณะ คัดแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากน้ำลายอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดี ได้เชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอ ซับสปีชีส์พาราคาเซอ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส ที่มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์, เชื้อสเตรปโตคอคคัส ซาลิวาเรียส, เชื้อสเตรปโตคอคคัส, แชนควินิส และเชื้อรา^[47] ต่อมาในปีค.ศ.2006 Haukioja และคณะ นำเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอ ชิโรต้า (*Lactobacillus casei* Shirota strain) เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัสจากอุจจาระ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถลดการลดการยึดติดของเชื้อฟิวโซแบคทีเรีย นิวคลีเอทัม (*Fusobacterium nucleatum*) บนเมดไฮดรอกซีอะพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย^[48]

เมื่อผลการศึกษาของโพรไบโอติกส์ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสในช่องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าสามารถนำโพรไบโอติกส์มาใช้ประโยชน์ในช่องปากได้ จึงนำมาสู่ผลการศึกษาของโพรไบโอติกส์ต่อเชื้อในช่องปากโดยตรง เช่น การศึกษาของ Nase และคณะ พบว่ากลุ่มเด็กอายุ 1-6 ปี ที่ดื่มนมที่มีเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี 5 วันต่อสัปดาห์นาน 7 สัปดาห์ พบปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายลดลง และฟันผุดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ดื่มนมธรรมดา^[13] การศึกษาของ Wei และคณะ พบว่า กลุ่มที่รับประทานนมเปรี้ยวจากการหมักด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี และกลุ่มที่ได้รับนมวัวซึ่งแม่วัวถูกกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส สามารถลดการยึด

ติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาดังกล่าว นำมาเป็นข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี ต่อการเกิดโรคฟันผุเป็นสองประเด็น ประเด็นแรก คือ เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี แย่งพื้นที่ยึดติดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในช่องปาก ประเด็นสอง คือ เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี ผลิตสารบางชนิดยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ และเข้าไปแทนที่เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์^[49] จากข้อมูลการศึกษาเบื้องต้น จึงสามารถตั้งสมมติฐานกลไกการทำงานของโพรไบโอติกส์ในช่องปาก ดังนี้ โพรไบโอติกส์มีผลโดยตรงต่อความจุลินทรีย์ โดยแย่งที่ยึดติดเพื่อสร้างความจุลินทรีย์ การแย่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ และการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค นอกจากนี้โพรไบโอติกส์มีผลโดยอ้อมต่อความจุลินทรีย์ โดยมีผลต่อกลไกการป้องกันของร่างกาย ทั้งระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ (local immunity) และระบบป้องกันแบบอื่น เช่น การควบคุมการผ่านเข้าออกของเยื่อเมือก (regulation of mucosal permeability)^[10]

การศึกษามูลของการรับประทานโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อในช่องปากที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง ยังมีบางการศึกษาที่ขัดแย้งกัน กล่าวคือ การรับประทานโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี เป็นประจำทุกวัน ภายหลังหยุดรับประทานโยเกิร์ต สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในน้ำลายอีก 2 สัปดาห์^[10] แต่บางการศึกษาพบว่า การรับประทานโยเกิร์ตไม่มีผลต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำลายอย่างต่อเนื่อง คือ การรับประทานโพรไบโอติกส์เป็นประจำจะสามารถลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และเชื้อแลคโตบาซิลลัสในน้ำลายได้ แต่เมื่อหยุดบริโภคประสิทธิภาพของการต้านเชื้อจะหมดไปด้วย^[50] และในบางการศึกษา ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการให้โพรไบโอติกส์กับจำนวนเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุในระหว่างที่รับประทาน เช่น การรับประทานชีสที่มีส่วนประกอบของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส LC705 ในกลุ่มอายุ 18-35 ปี ปริมาณ 15 กรัมต่อวันนาน 3 สัปดาห์ ช่วงที่รับประทานชีสไม่พบการลดลงของปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และยีสต์ในน้ำลาย แต่หลังรับประทานชีส พบว่า กลุ่มที่รับประทานโพรไบโอติกส์ชีสมีปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และยีสต์ในน้ำลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่รับประทานชีสธรรมดา^[14]

ในอดีตถึงปัจจุบัน มีการศึกษามากมายถึงผลของโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อก่อโรคฟันผุในช่องปาก โดยแตกต่างกันไปทั้งชนิดของเชื้อโพรไบโอติกส์ จำนวนของกลุ่มตัวอย่าง อายุ, ระยะเวลา, การวัดผล และรูปแบบของการออกแบบการทดลอง แต่ส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 90 การให้โพรไบโอติกส์มีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อก่อโรคฟันผุในช่องปาก ดังแสดงตามตารางที่ 2^[51]

ตาราง 2 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของโพรไบโอติกส์ต่อโรคฟันผุในช่องปากมนุษย์
ที่มา Coqueiro, 2018

จำนวน กลุ่ม ตัวอย่าง	อายุ	ชนิดและจำนวนโพรไบโอติกส์	ระยะเวลา	ผลการทดลอง
74	18-35 ปี	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 1.9×10^7 CFU/g <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LC 705 1.21×10^7 CFU/g	3 สัปดาห์	มีแนวโน้มในการ ลด <i>S. mutans</i> อย่างไม่มี นัยสำคัญทางสถิติ
261	2-3 ปี	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP1 10^7 CFU/mL	10 เดือน	ลดความชุกของ ฟันผุ (54.4% ใน กลุ่มโพรไบโอติกส์, 65.8% ในกลุ่ม หลอก) อุบัติการณ์การเกิด ฟันผุใหม่ (9.7% ใน กลุ่มโพรไบโอติกส์, 24.3% ในกลุ่ม หลอก)

ตาราง 2 (ต่อ)

จำนวน กลุ่ม ตัวอย่าง	อายุ	ชนิดและจำนวนโพรไบโอติกส์	ระยะเวลา	ผลการทดลอง
21	21-24 ปี	<i>Bifidobacterium DN-173 010</i> 7×10^7 CFU/g	2 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
120	21-24 ปี	<i>Lactobacillus reuteri ATCC</i> 55730×10^8 CFU	3 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
80	21-24 ปี	<i>Lactobacillus reuteri DSM 17938</i> and <i>ATCC PTA 5289</i> 1.1×10^8 CFU of each strain	3 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
20	อายุ เฉลี่ย 20 ปี	<i>Lactobacillus reuteri DSM 17938</i> and <i>ATCC PTA 5289</i> 1.1×10^8 CFU of each strain	10 วัน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
24	อายุ เฉลี่ย 20 ปี	<i>Bifidobacterium lactis Bb-12</i> 1×10^7 CFU/g-53 g/day	10 วัน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
248	1-5 ปี	<i>Lactobacillus rhamnosus LB21</i> 10^7 CFU/mL 150 ml. per day	21 เดือน	ลดอุบัติการณ์การ เกิดฟันผุ
20	21-35 ปี	<i>Streptococcus oralis</i> strain <i>KJ3sm</i> , <i>Streptococcus uberis</i> strain <i>KJ2sm</i> and <i>Streptococcus</i> <i>rattus</i> strain <i>JH145</i> , in two dose, 10^6 or 10^8 CFU of each probiotic per day	4 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง

ตาราง 2 (ต่อ)

จำนวน กลุ่ม ตัวอย่าง	อายุ	ชนิดและจำนวนโพรไบโอติกส์	ระยะเวลา	ผลการทดลอง
78	20-26 ปี	<i>Lactobacillus paracasei</i> GMNL-33	2 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
100	58-84 ปี	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21 10^7 CFU/mL	15 เดือน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
40	12-14 ปี	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 ATCC27536 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 1×10^6 CFU/g of each strain	10 วัน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลงแต่จำนวนแลคโตบาซิลลัสไม่เพิ่ม
13	อายุเฉลี่ย 25.3ปี	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG and <i>Lactobacillus reutei</i>	2 สัปดาห์	ไม่มีผล
30	อายุเฉลี่ย 26ปี	<i>Lactobacillus reutei</i> DSM 17938 and ATCC PTA 5289 1×10^8 CFU of each strain	2 สัปดาห์	ไม่มีผล
62	อายุเฉลี่ย 23ปี	<i>Lactobacillus reutei</i> DSM 17938 and ATCC PTA 5289 1×10^8 CFU of each strain	6 สัปดาห์	ไม่มีผล
106	1-2 เดือน	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 (BB-12) 10^{10} CFU/day	14.9+-6.7 เดือน	ไม่มีผล
40	4-6ปี	<i>Streptococcus uberis</i> KJ2, <i>S.oralis</i> KJ3, and <i>S.rattis</i> JH145	2 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง

ตาราง 2 (ต่อ)

จำนวน กลุ่ม ตัวอย่าง	อายุ	ชนิดและจำนวนโพรไบโอติกส์	ระยะเวลา	ผลการทดลอง
64	อายุ เฉลี่ย 24.8+- 2.3ปี	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain WB21 (6.7×10^8 CFU/day) and TI 2711 (2.8×10^8 CFU/day)	2 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลงจำนวน <i>Lactobacillus</i> เพิ่มขึ้น
113	เดือน สุดท้าย ของการ ตั้งครรภ์ และปี แรกหลัง คลอด	<i>Lactobacillus reutei</i> 10^8 CFU/day (mother and children)	13 เดือน	ลดอุบัติการณ์การ เกิดฟันผุ
31	6-8ปี	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	10 วัน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
36	12-17 ปี	<i>Lactobacillus reutei</i> (DSM 17938 and ATCC PTA 5289) 1×10^8 CFU of each strain/day	3 เดือน	มีแนวโน้มในการ เกิด demineralization ของเคลือบฟันน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญ ทางสถิติ
60	-	<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1 $7.5 \pm 0.20 \times 10^8$ CFU/g	6 เดือน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง จำนวน neutrophil peptide 1-3 เพิ่มขึ้น

ตาราง 2 (ต่อ)

จำนวน กลุ่ม ตัวอย่าง	อายุ	ชนิดและจำนวนโพรไบโอติกส์	ระยะเวลา	ผลการทดลอง
50	6-12ปี	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 1×10^6 CFU of each or <i>Lactobacillus casei</i> Shirota 6.5×10^9	7 วัน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
60	6-12ปี	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 1×10^6 CFU of each probiotic	7 วัน	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
49	6-12ปี	<i>Lactobacterium lactis</i> 1×10^6 CFU/mL	2 สัปดาห์	ไม่มีผล
33	12-15 ปี	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , and <i>Bifidobacterium lactis</i>	3 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
138	2-3ปี	<i>Streptococcus uberis</i> KJ2, <i>S. oralis</i> KJ3, and <i>S. rattis</i> JH145 1×10^8	1 ปี	ความเสี่ยงในการ เกิดฟันผุลดลง
11	23-44 ปี	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713 10^9 inactivated cells per day	1 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง
50	19-27 ปี	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 and <i>Bifidobacterium</i> <i>bifidum</i> ATCC 29521 1.5×10^8 CFU/g	3 สัปดาห์	จำนวน <i>S. mutans</i> ลดลง

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มีโครงสร้างส่วนประกอบของผนังเซลล์ รูปแบบ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสต่างกัน สามารถจำแนกกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลเป็น 2 กลุ่ม^[52] กลุ่มที่หนึ่ง คือ homofermentative lactic acid bacteria เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มี 6 คาร์บอน ให้กรดแลคติกทั้งหมด โดยผ่านกระบวนการ homofermentative lactic acid fermentation ตัวอย่างของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ คือ เชื้อสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*), เชื้อพีดิคอคคัส (*Pedococcus*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์เช่น เชื้อแลคโตบาซิลลัส ซาลิวาเรียส (*Lactobacillus salivarius*), เชื้อแลคโตบาซิลลัส จอห์นสันนิอี (*Lactobacillus johnsonii*), เชื้อแลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลัส (*Lactobacillus acidophilus*), เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริกัส (*Lactobacillus bulgaricus*), เชื้อแลคโตบาซิลลัส คริสพาตัส (*Lactobacillus crispatus*), เชื้อแลคโตบาซิลลัส แกซเซอร์ (*Lactobacillus gasseri*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอี (*Lactobacillus casei*) เป็นต้น กลุ่มที่สอง คือ heterofermentation lactic acid bacteria เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มี 6 คาร์บอน ให้กรดแลคติกและผลิตภัณฑ์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ โดยผ่านกระบวนการ heterofermentative lactic acid fermentation ตัวอย่างของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ เชื้อลิวโคโนสตอค มีเซนเทอรอยเดส (*Leuconostoc mesenteroides*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์ เช่น เชื้อแลคโตบาซิลลัส รูทีไร (*Lactobacillus reuteri*), เชื้อแลคโตบาซิลลัส วาจิnalis (*Lactobacillus vaginalis*) และเชื้อแลคโตบาซิลลัส ออริส (*Lactobacillus oris*) เป็นต้น

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จำแนกผลิตภัณฑ์ที่สร้างจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็น 2 ชนิด คือ non peptide inhibitor ได้แก่ กรดอินทรีย์, ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล ส่วน peptide inhibitor ได้แก่ แบคทีริโอซิน

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับเป็นโพรไบโอติกส์ให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบริคคิโอ ซับสปีชีส์บัลแกริกัส, เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส, เชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอี, เชื้อสเตรปโตคอคคัส เทอโมฟิลัส รวมทั้งเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นต้น ดังตารางที่ 3^[53]

ตาราง 3 ตัวอย่างเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาเป็นโพรไบโอติกส์
ที่มาจากแบคทีเรียในช่องปาก (oral bacteriology), ระเบียบวิธีวิจัย, 2007

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Other
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sterptococcus thermophiles</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

ผลข้างเคียงจากโพรไบโอติกส์

มีรายงานน้อยมากถึงผลข้างเคียงในระดับที่รุนแรง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีในร่างกายมนุษย์อยู่แล้ว อย่างไรก็ตามมีรายงานการติดเชื้อในกระแสเลือดจากการใช้โพรไบโอติกส์ในกลุ่มผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะอ่อนแอติดเชื้อได้ง่าย เช่น มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง อยู่ในภาวะหลังการผ่าตัด, ผู้ป่วยลำไส้อักเสบ, ผู้ป่วยมะเร็ง และผู้ป่วยเบาหวาน^[54] ดังนั้นจึงมีข้อแนะนำให้ดื่มน้ำในกรณีดังกล่าว เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงที่รุนแรง นอกจากนี้ก่อนนำเชื้อชนิดใหม่มาใช้เป็นโพรไบโอติกส์เพื่อประโยชน์อันใดก็ตาม ต้องได้รับการทดสอบว่ามีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพเป็นอย่างดีตามลำดับขั้นตอนการวิจัย จึงจะสามารถนำมาใช้ในทางคลินิกได้^[55] นอกจากนี้ข้อพึงระวังต่อร่างกายทางระบบแล้ว ในส่วนของผลภายในช่องปาก ก็ยังมีประเด็นที่กล่าวถึงความเป็นไปได้ที่แลคโตบาซิลโลอาจทำให้ฟันที่ผุอยู่แล้วลุกลามมากขึ้นเนื่องจากแลคโตบาซิลโลมีความสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุในระดับชั้นเนื้อฟัน อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่ได้พิสูจน์แล้วว่า แลคโตบาซิลโลไม่ได้มีบทบาทเป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำให้เกิดฟันผุ แต่มักสัมพันธ์กับฟันผุในระยะลุกลาม^[6] และพบในรอยผุที่ลึกและมีขนาดใหญ่^[25] โดยในรอย

ผู้ระยะเริ่มแรก จะพบเชื้อนี้ได้น้อยมาก ถึงอย่างไรก็ยังมีข้อเสนอแนะให้หลีกเลี่ยงการใช้ในผู้ที่มีฟันผุ
ลึกหรือมีฟันผุในระยะลุกลาม



บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

กำหนดขนาดตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ G Power ได้ 34 คน โดยกำหนด Input parameters ดังนี้

Effect size f : 0.4

α error probability : 0.05

Power : 0.8

ผู้เข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้เป็นบุคลากร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ช่วงอายุ 20-50 ปี จำนวน 34 คนซึ่งได้รับการชี้แจงถึงวิธีการวิจัยและได้ลงลายมือชื่อในหนังสือรับทราบและยินยอมทำการวิจัย งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบแล้วจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ SWUEC-G-069/2562G

เกณฑ์ในการคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. อายุ 20-50 ปี และเป็นบุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2. สุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวหรือรับประทานยาที่ส่งผลกระทบต่อภาวะในช่องปาก เช่น ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น
3. ปฏิเสธการแปรงม้วน
4. ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ
5. มีความสมัครใจ ยินยอมเข้าร่วมโครงการและเซ็นยินยอมใน informed consent form
6. มีจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งแต่ 10^3 - 10^4 CFU/mL

เกณฑ์ในการคัดออก (Exclusion criteria)

1. มีเครื่องมือจัดฟัน (orthodontic appliance) หรือฟันปลอมถอดได้ (removable appliance) ในช่องปาก
2. หยุดรับประทานยาฆ่าเชื้อมานานน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
3. หยุดใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อมานานน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย

เกณฑ์การถอนผู้เข้าร่วมการวิจัยหรือยุติการเข้าร่วมวิจัย (Withdrawal or termination criteria)

1. ผู้เข้าร่วมวิจัยไม่ประสงค์เข้าร่วมการวิจัยต่อ
2. ผู้เข้าร่วมวิจัยมีปัญหาสุขภาพ ไม่สามารถเข้าร่วมการวิจัยต่อได้
3. ผู้เข้าร่วมการวิจัยรับประทานอาหารหรือใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของโพธิ์ไบโอติกส์นอกเหนือจากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่ใช้ในการวิจัยในช่วงระยะเวลาที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1. นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพธิ์ไบโอติกส์แลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมัลชัน® สูตรน้ำตาลร้อยละ 0.1
2. น้ำเปล่า
3. อาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ (Mitis salivarius agar)
4. ซูโครส (Sucrose)
5. น้ำกลั่น
6. ยาปฏิชีวนะแบซิทรานิน (Bacitracin)
7. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 (phosphate buffer saline pH7.4)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องเขย่าสาร (Vertex mixer)
2. หลอดทดลอง
3. เม็ดปิดแก้ว ขนาด 0.3x0.3x0.3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
5. ปิเปต
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. ตู้อย่างเชื้อ
8. ขวดสเตอไรล์
9. กระดาษวัดค่าพีเอช (Litmus)
10. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีวิจัย

การเตรียมนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมมูลัส®

นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมมูลัส® ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมี 4 สูตร ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยสูตรที่ใช้ในการทดลอง คือ นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมมูลัส® สูตรผสมน้ำตาลร้อยละ 0.1 ดังแสดงในภาพที่ 5 และตัวควบคุม คือ น้ำเปล่า ใส่ซองซีล โดยแต่ละซองใส่ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ติดป้ายกำกับหน้าซองเป็น A หรือ B กลุ่มตัวอย่างจะไม่ทราบว่าในซองเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใดจนกว่าจะสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพประกอบ 4 นมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สูตรที่วางจำหน่ายในประเทศไทย
ที่มา <http://www.delightimulus.com>

ตาราง 4 รายละเอียดของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโปรไบโอติกส์ที่ใช้ในการวิจัย

ผลิตภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต	ส่วนประกอบ
นมเปรี้ยวพร้อมดื่มดัชมิลล์ ดีไลท์ อีมูลส์® สูตรน้ำตาลร้อยละ 0.1	Dutch Mill Company Limited	- นมโคขาดมันเนย 51.6% - น้ำตาล 0.1% - กลิ่นโยเกิร์ต 0.001% - สารทำให้คงตัว (INS440) - สารควบคุมความเป็นกรด (INS260, INS330) - วัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล (สตีวียอลไกลโคไซด์, ชูคราโลส) - จุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี



ภาพประกอบ 5 นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมูลส์® สูตรน้ำตาลร้อยละ 0.1

การเตรียมผู้เข้าร่วมวิจัย

ตรวจสอบสภาพช่องปากของผู้เข้าร่วมวิจัยและบันทึกผลในแบบฟอร์มการตรวจช่องปาก โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้ตรวจช่องปากของผู้เข้าร่วมวิจัยเพียงคนเดียว บันทึกข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมวิจัย ได้แก่ อายุ, เพศ, น้ำหนัก, ส่วนสูง, โรคประจำตัว, ยาที่รับประทานในปัจจุบัน, ความถี่ในการแปรงฟัน/วัน, ดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย, อัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก และสภาวะปริทันต์ บันทึกผลในตารางบันทึกเพื่อนำข้อมูลใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

การประเมินภาวะปริทันต์ของผู้เข้าร่วมวิจัย โดยใช้ดัชนี community periodontal index of treatment needs (CPITN) ตาม WHO 1997 แบ่งช่องปากเป็น 6 ส่วน (sextant) วัดร่องลึกปริทันต์ของฟันที่เป็นตัวแทนในแต่ละ sextant บันทึกค่าสูงสุดที่วัดได้เป็นตัวแทนของผู้เข้าร่วมวิจัยแต่ละคน เพื่อนำมาแปลงเป็นค่า CPITN โดยมีเกณฑ์ในการประเมิน ดังแสดงในตารางที่ 5

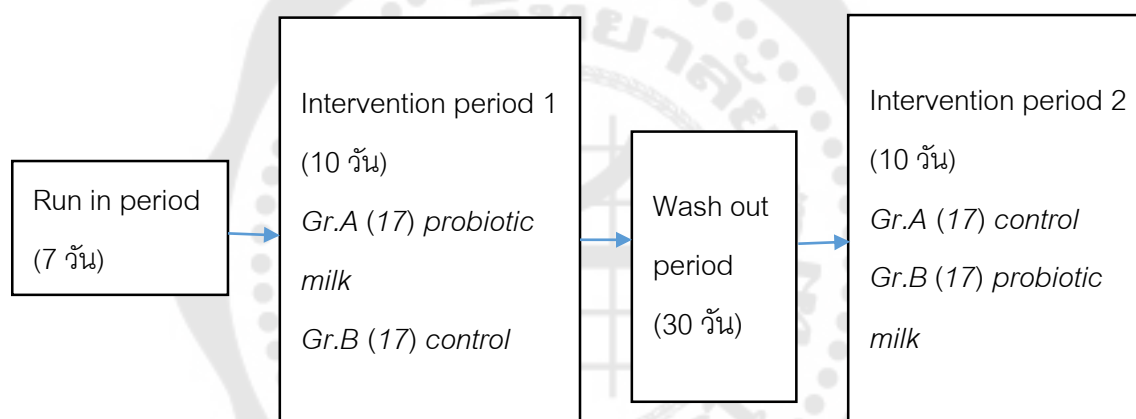
ตาราง 5 เกณฑ์ในการประเมินสภาวะปริทันต์

รหัส	เกณฑ์	การรักษา
0	เหงือกปกติ, แข็งแรง	ไม่ต้องการการรักษาใดๆ
1	เหงือกมีเลือดออกเอง หรือ ภายหลังการตรวจด้วย เครื่องมือตรวจปริทันต์	ต้องการการสอนสุขศึกษา รายบุคคลเพื่อปรับปรุง พฤติกรรมทำความสะอาด
2	มีหินน้ำลาย แต่ยังเห็นแถบดำ บนเครื่องมือ, ไม่มีร่องลึกปริ ทันต์	ต้องการการขูดหินน้ำลายและ สอนสุขศึกษารายบุคคล
3	มีร่องลึกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตร (ขอบเหงือกอยู่ภายในแถบดำ)	ต้องการการรักษาทางปริทันต์ (ขูดหินน้ำลายและเกลาราก ฟัน) และ สอน สุข ศึกษ า รายบุคคล
4	มีร่องลึกปริทันต์ 6 มิลลิเมตร หรือมากกว่า (มองไม่เห็นแถบ ดำบนเครื่องมือ)	
X	ตรวจไม่ได้ (มีฟันน้อยกว่า 2 ซี่)	

จากการศึกษานำร่องเพื่อคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัย ทดลองนำตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัคร มาเจือจางและเพาะเชื้อเพื่อดูปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น ว่าเพียงพอที่จะใช้ในการดำเนินการทดลองหรือไม่ เป็นเกณฑ์หนึ่งในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัย โดยผู้เข้าร่วมวิจัย ต้องมีจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ระหว่าง 10^3 - 10^4 CFU/mL ผลจากการศึกษานำร่อง ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นที่มีจำนวนเชื้อ 10^3 - 10^4 CFU/mL ของผู้เข้าร่วมวิจัยแต่ละราย เข้าสู่ช่วงดำเนินการทดลองต่อไป

ระยะในการดำเนินการทดลอง 57 วัน ประกอบด้วย 4 ช่วงเวลา คือ ช่วงเตรียมสภาพก่อนการทดลอง (run-in period) 7 วัน, ช่วงดำเนินการทดลอง (intervention period) 2 ช่วง ๆ ละ 10 วันและช่วงล้าง (wash out period) 30 วัน ในช่วงดำเนินการทดลอง ผู้เข้าร่วมวิจัยต้องงดการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกส์อื่น ๆ, ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไซลิทอล, ยาฆ่าเชื้อและน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อทุกชนิด โดยช่วงที่ 1 และ 3 คือ ช่วงเตรียมสภาพก่อนการทดลองและช่วงล้างตามลำดับ ช่วงที่ 2 และ 4 คือ ช่วงดำเนินการทดลอง ในช่วงนี้

จะได้รับนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์หรือน้ำเปล่าบรรจุของซีลปริมาตร 15 มิลลิลิตร (A หรือ B) ผู้เข้าร่วมวิจัยจะถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละเท่ากัน คือ กลุ่ม 1 และ 2 โดยแต่ละกลุ่มมีโอกาสที่จะเลือกดื่ม A หรือ B ก่อนได้ โดยผู้เข้าร่วมวิจัยจะไม่ทราบว่า A และ B คืออะไร ผู้วิจัยจะเป็นผู้เดียวที่ทราบ โดยหากเลือกดื่ม A ก่อนจะต้องดื่ม A ต่อเนื่องไปเป็นเวลา 10 วันในช่วงดำเนินการทดลองที่ 1 และในช่วงการทดลองที่ 2 นี้ ผู้เข้าร่วมวิจัยต้องเปลี่ยนไปดื่ม B ทำเช่นเดียวกันในกลุ่มผู้เข้าร่วมวิจัยที่เลือกดื่ม B ในช่วงการทดลองที่ 1 มีคำชี้แจงในการดื่ม คือ ต้องดื่มหลังอาหารเช้า เป็นเวลา 10 วัน ขณะดื่มต้องกลั้วนมในช่องปากเป็นเวลา 2 นาทีแล้วค่อยกลืน และห้ามแปรงฟันอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหลังการดื่ม ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพประกอบ 6 ระยะเวลาตลอดการดำเนินการทดลอง

การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลายในทันทีก่อนและหลังการทดลองในช่วงการทดลองที่ 2 และ 4 โดยเป็นการเก็บน้ำลายในขณะพัก (unstimulated saliva) ให้ผู้เข้าร่วมวิจัยบ้วนน้ำลายลงในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บน้ำลายครั้งละ 4 มิลลิลิตรโดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) กล่าวคือ เก็บน้ำลาย 4 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 คือ ก่อนช่วงการทดลองที่ 2, ครั้งที่ 2 คือ หลังช่วงการทดลองที่ 2, ครั้งที่ 3 คือ ก่อนช่วงการทดลองที่ 4 และครั้งที่ 4 คือ หลังช่วงการทดลองที่ 4

ตัวอย่างน้ำลายที่เก็บในครั้งที่ 1 วัดอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย บันทึกผลในตารางบันทึกเพื่อนำข้อมูลใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

การวัดอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก (unstimulated saliva) ให้ผู้เข้าร่วมวิจัยนั่งทำตรงในท่าที่ผ่อนคลายโดยให้ศีรษะก้มมาข้างหน้า ให้น้ำลายหยดออกมาเองลงในหลอด ให้ได้

ปริมาตร 4 มิลลิลิตรโดยจับเวลาตั้งแต่เริ่มบ้วน จนกระทั่งได้ปริมาณน้ำลายครบ 4 มิลลิลิตร การหลั่งน้ำลายขณะพักที่น้อยกว่า 0.1 มิลลิลิตร/นาที จะความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุสูง ในกรณีน้ำลายไหลน้อย น้ำลายมักจะขึ้นและเป็นฟอง วัดปริมาตรยาก จะใช้วิธีชั่งหลอดก่อนและหลังบ้วนน้ำลาย โดยน้ำลาย 1 กรัมเท่ากับ 1 มิลลิลิตรโดยประมาณ^[56]

การวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย ใช้กระดาษวัดค่าพีเอช หรือกระดาษลิตมัส (Litmus) ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างปกติของน้ำลายมนุษย์จะอยู่ในช่วง 6.2-7.4 โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายด้วยกระดาษลิตมัสที่สามารถอ่านค่าในช่วงพีเอชนี้ได้ หยดน้ำลาย 1 หยดลงบนกระดาษ ทิ้งไว้ 15 วินาทีแล้วอ่านผลโดยการเทียบสีที่ปรากฏกับแถบสีตามที่บริษัทกำหนดมา

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไมดิส ซาลิวาเรียส แบคทีราซิน อะการ์

ผสมไมดิส ซาลิวาเรียส อะการ์ 90 กรัม, ซูโครส 150 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตรเข้าด้วยกัน ทำการปราศจากเชื้อด้วยการอบไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีหลังจากนั้นรอให้อาหารเย็นตัวลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมน้ำละลายแบคทีราซิน 3.3 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันดี เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมน้ำละลายแบคทีราซิน โดยชั่ง แบคทีราซิน 0.033 กรัมละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะปราศจากเชื้อหลอดละ 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม 1 ลิตร

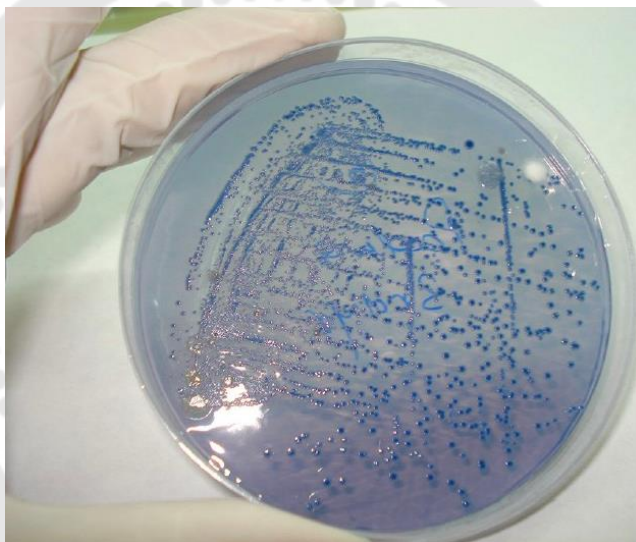
การหาปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

จากการศึกษานำร่อง ระดับการเจือจางที่มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสม (10^3 - 10^4 CFU/mL) คือระดับการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10

เจือจางน้ำลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์พีเอช 7.4 โดยวิธีซีเรียล ไดลูชัน (Serial dilution) ดังแสดงในภาพที่ 9 ที่ความเข้มข้น 1:10 ในหลอดทดลอง โดยใช้ตัวอย่างน้ำลาย 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองแรกที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร ตามหลักการของซีเรียล ไดลูชัน จากนั้นทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และทำให้เชื้อกระจายเพื่อให้่ายต่อการนับจำนวนโดยใช้เม็ดปิดแก้ว ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยนำตัวอย่างน้ำลายที่เจือจางแล้วที่ความเข้มข้น 1:10 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรมาทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธีดังนี้

1. ปิเปิดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงที่ตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ
2. ตักเม็ดปิดแก้ว 8-10 เม็ดใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3. เขย่าเม็ดปัด โดยให้เม็ดปัดกลิ้งให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง
4. กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปอบในตู้อบล้างเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลเป็นโคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไมดิส ซาลิวาเรียส แบชิตราซิน จะมีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8



ภาพประกอบ 7 เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ไมดิสซาลิวาเรียสแบชิตราซิน อะการ์
ที่มา

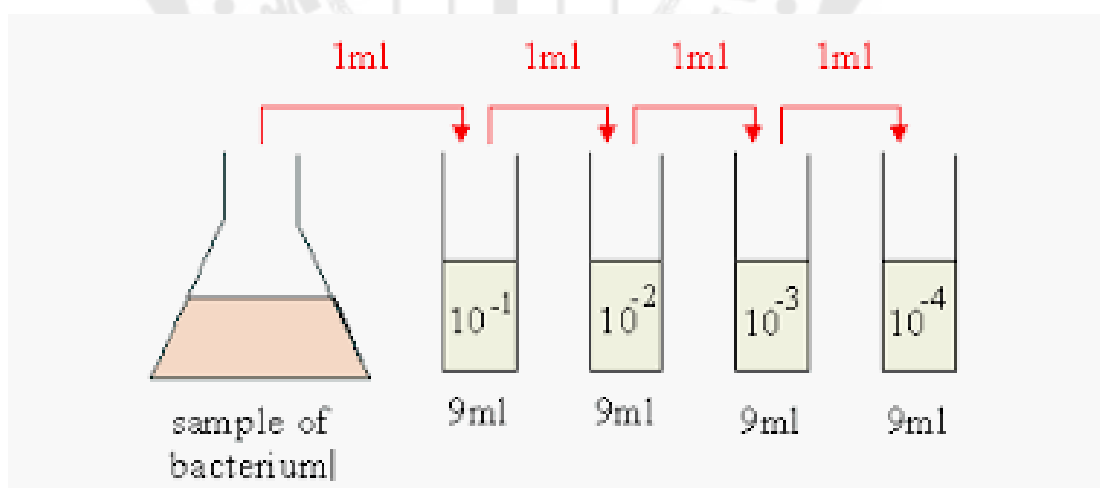
http://www.jidonline.com/viewimage.asp?img=JInterdiscipDentistry_2013_3_2_71_1268

[62_u3.jpg](#)



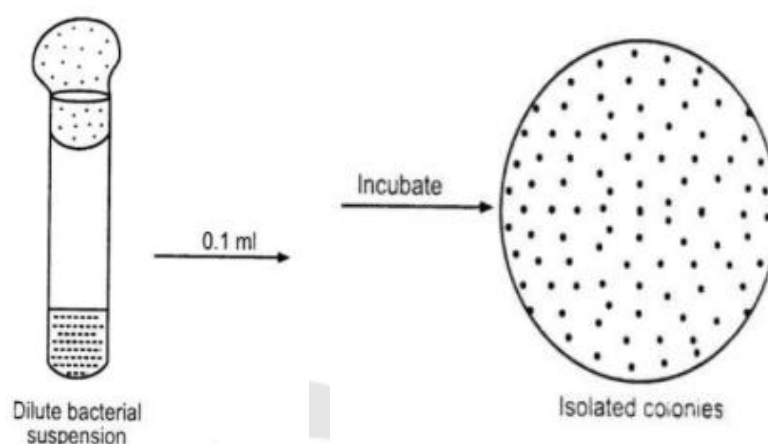
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ไมติสซาลิวาเรียส แบคทีราซิน อะการ์มีลักษณะ ทึบ ขรุขระ ผิวหนูนุ่มไม่เรียบ
ที่มา

http://www.jidonline.com/viewimage.asp?img=JInterdiscipDentistry_2013_3_2_71_1268_62_u3.jpg



ภาพประกอบ 9 การเจือจางสารละลายด้วยวิธีซีเรียล ไดลูชั่น (Serial dilution)

ที่มา <http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/07/>



ภาพประกอบ 10 การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มา <http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/07/>

การเก็บรวบรวมข้อมูล

บันทึกข้อมูลที่ได้จากการทดสอบทั้งหมดโดยการนับจำนวนโคโลนี (เพื่อนำมาคำนวณเป็นโคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) ของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์) ลงในตารางและนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทั้งหมดจะกระทำด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส และวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p=0.05$)

วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัย ได้แก่ อายุ, เพศ, ดัชนีมวลกาย/อุณ, สถานะปริพันธ์, อัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก และความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายเพื่อเก็บข้อมูลก่อนเริ่มต้นการทดลองด้วยสถิติบรรยาย (Descriptive statistic)

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างจำนวนโคโลนีฟอร์มมิงต่อยูนิตของเชื้อก่อนและหลังในกลุ่มเดียวกันและระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติรีพีทเต็ด อะโนวา (Repeated ANOVA)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

อาสาสมัครทั้งหมด 34 คน (N=34) เก็บข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร ได้แก่ อายุ, เพศ, ดัชนีมวลกาย/อุต/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์ (CPITN), ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย (pH) และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) หรือจำนวน (ร้อยละ) แสดงในตารางที่ 6

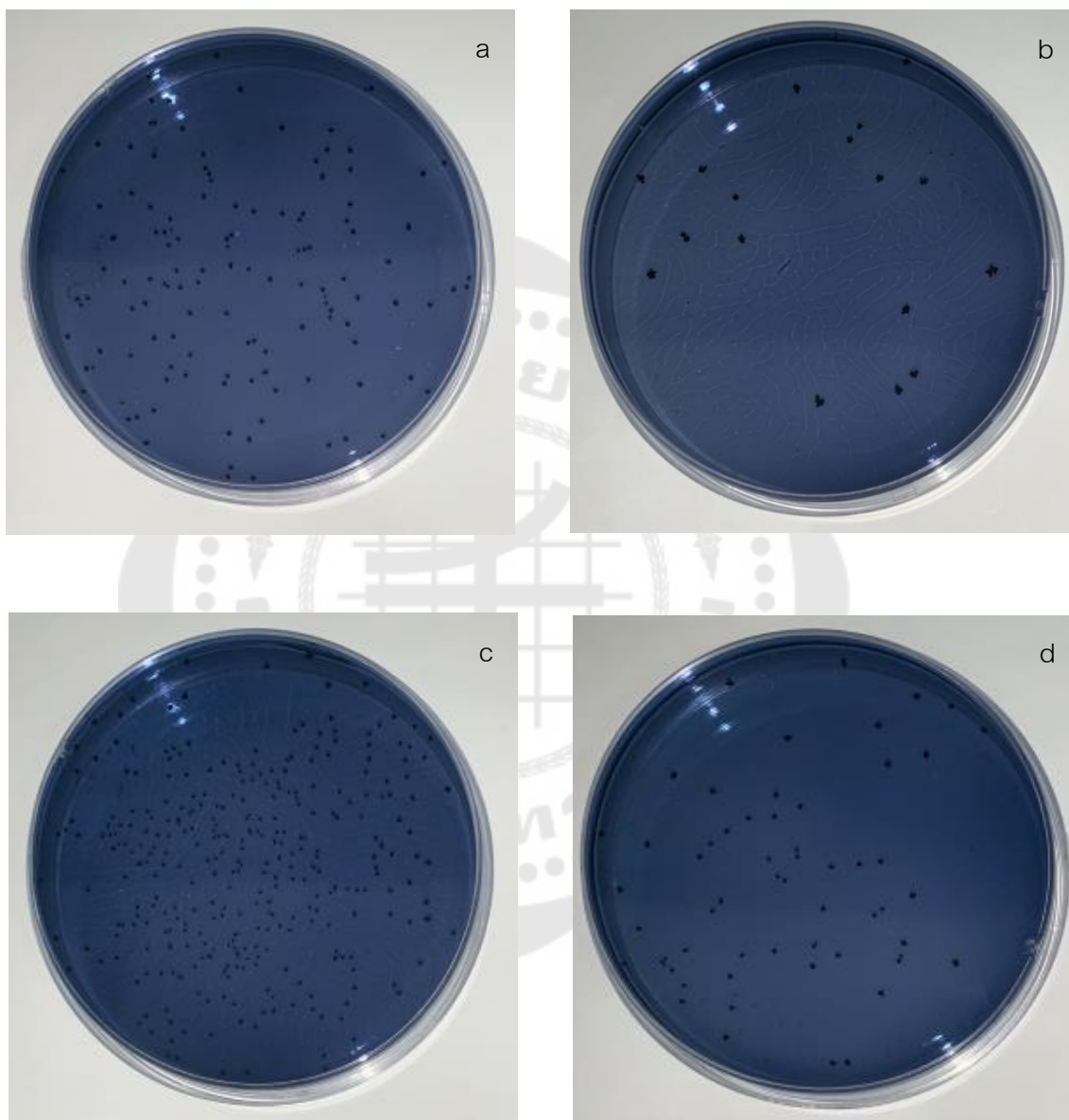
ตาราง 6 ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยเมื่อเริ่มต้นโครงการ

ตัวแปร	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือจำนวน (ร้อยละ)
อายุ (ปี)	33.68 $\pm$ 0.33
เพศ	
ชาย (%)	4 (11.8)
หญิง (%)	30 (88.2)
ดัชนีมวลกาย/อุต/ถอน (ซี)	10.32 $\pm$ 3.43
สภาวะปริทันต์ (CPITN)	
1 (%)	3 (8.82)
2 (%)	31 (91.18)
ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย (pH)	7.01 $\pm$ 0.18
อัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก (mL/min)	0.33 $\pm$ 0.16

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์

ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์ จากการนับจำนวนเชื้อที่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละครั้ง (ก่อนดื่มนม, หลังดื่มนม, ก่อนดื่มน้ำและหลังดื่มน้ำ) แสดงในภาพประกอบที่ 11 คำนวณเป็นปริมาณเชื้อหน่วยโคโลนีฟอร์ม

มิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) แสดงเป็นค่ามัธยฐาน (ควอไทล์ที่ 1 และควอไทล์ที่ 3) (median (1st quartile, 3rd quartile)) แสดงในตารางที่ 7



ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างลักษณะและปริมาณโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวเทนส์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไมติส ซาลิวเรียส แบคทีร่าซินก่อนต้มนม (a), หลังต้มนม (b), ก่อนต้มน้ำ (c) และหลังต้มน้ำ (d) จากการมองด้วยตาเปล่า



ภาพประกอบ 12 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่ปรากฏบนอาหาร
เลี้ยงเชื้อ ไมตีส ซาลิวาเรียส แบชทราซินจากการมองผ่านกล้องไมโครสโคป (microscope)



ตาราง 7 จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในหน่วยโคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) ใน 4 ช่วงเวลา คือ ก่อนดื่มนม, หลังดื่มนม, ก่อนดื่มน้ำและหลังดื่มน้ำ จำแนกตามกลุ่มการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเชื้อมิวแทนส์ ($\times 10^4$ CFU/mL)			
	ก่อนดื่มนม	หลังดื่มนม	ก่อนดื่มน้ำ	หลังดื่มน้ำ
A (n=17)	2.00 (1.77, 2.90)	0.16 (0.11, 0.21)	2.08 (0.18, 2.35)	2.43 (1.99, 2.76)
B (n=17)	1.94 (1.66, 2.60)	0.23 (0.18, 0.35)	2.39 (2.03, 3.14)	2.20 (1.75, 2.54)
Total (n=34)	1.97 (1.75, 2.61)	0.20 (0.15, 0.26)	2.25 (1.88, 2.92)	2.30 (1.90, 2.67)

จำนวนเชื้อแสดงเป็น ค่ามัธยฐาน (ควอไทล์ที่ 1 และควอไทล์ที่ 3) (median (1st quartile, 3rd quartile))

A : กลุ่มการทดลองที่ดื่มนมในช่วงการทดลองที่ 1 และดื่มน้ำเปล่าในช่วงการทดลองที่ 2

B : กลุ่มการทดลองที่ดื่มน้ำเปล่าในช่วงการทดลองที่ 1 และดื่มนมในช่วงการทดลองที่ 2

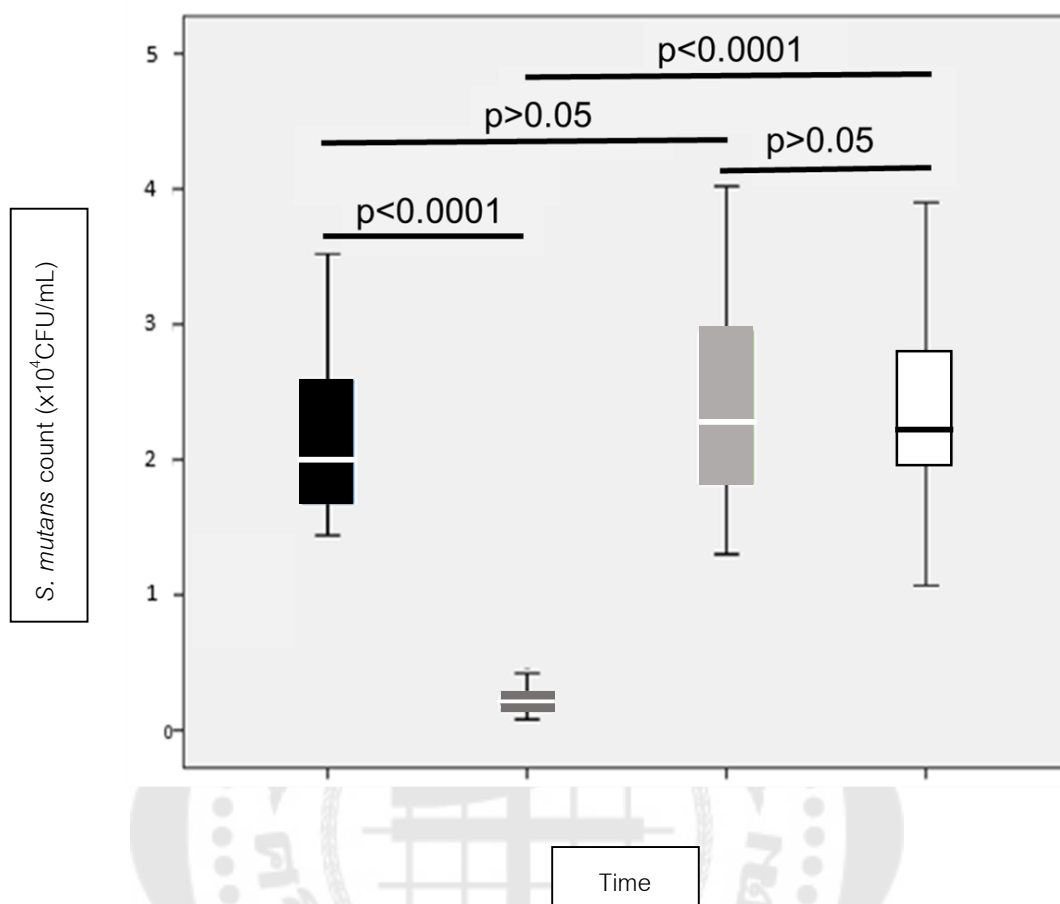
การดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ มีผลลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์ เมื่อนำข้อมูลมาทดสอบการกระจายของข้อมูล พบว่า ข้อมูลมีการกระจายแบบไม่ปกติ (non normally distributed) จึงเลือกใช้สถิติพารามेटริกซ์ รีพีทเต็ด อะโนว่า (repeated ANOVA) มาทดสอบสมมติฐาน “การดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์มีผลลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์” เนื่องจากมีสถิติปรับแก้ กรณิฝ่าฝืนข้อตกลงเบื้องต้น ได้ผลดังนี้

การเปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ภายในกลุ่มเดียวกัน (intragroup comparison) พบว่า จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนและหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) กล่าวคือ จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายหลังดื่มนมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบ

เทียบกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนดื่มนม ในทางตรงข้าม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนและหลังดื่มน้ำ

การเปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ระหว่างกลุ่ม (intergroup comparison) พบว่า จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนดื่มนมเปรียบพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์และก่อนดื่มน้ำ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กล่าวคือ จำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนดื่มน้ำไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนดื่มนม ในทางตรงข้าม พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0001$) ของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายหลังดื่มนมเปรียบพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์และหลังดื่มน้ำ^๖ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 13





- แสดงจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์
- แสดงจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์
- แสดงจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายก่อนดื่มน้ำ
- แสดงจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายหลังดื่มน้ำ

ภาพประกอบ 13 แผนภาพกล่องแสดงจำนวนเชื้อที่นับได้ในแต่ละครั้ง

ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพักกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์
ตั้งต้น

ตาราง 8 ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก กับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น

ตัวแปร	r	p-value
ดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน(ซี)	0.308	0.076
สภาวะปริทันต์ (CPITN)	0.046	0.797
ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย (pH)	0.408	0.017*
อัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก (mL/min)	0.261	0.137

* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

จากตารางที่ 8 พบว่า ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย มีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้นในน้ำลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson correlation) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.3-0.5 แสดงว่า มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันปานกลาง (moderate degree) กล่าวคือ เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น จำนวนเชื้อในช่องปากจะเพิ่มขึ้นตามด้วย จนถึงแค่ระดับหนึ่ง เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจะไม่มีผลต่อเชื้อที่เพิ่มขึ้นอีก ในขณะที่ดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน(ซี), สภาวะปริทันต์ และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพักไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายตั้งต้น ($p > 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

การดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ มีผลลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหลักของการเริ่มก่อโรคฟันผุในช่องปากมนุษย์ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนและหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ (intragroup comparison) พบว่า ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนและหลังดื่มน้ำ (intragroup comparison) พบว่า ไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนดื่มน้ำและก่อนดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ (intergroup comparison) พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และเปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หลังดื่มน้ำและหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ (intergroup comparison) พบว่า ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อภิปรายผล

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดัดแปลงดีไลท์ อิมูลัส® ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายของมนุษย์ โดยชนิดของโพรไบโอติกส์ในนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ดัดแปลงดีไลท์ อิมูลัส® คือ เชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี (*Lactobacillus paracasei*) ซึ่งเป็นแลคติกแอซิกแบคทีเรีย ที่พบทั่วไปในร่างกาย เช่น อุจจาระ, ลำไส้, เยื่อเมือกในช่องปาก และน้ำลายในช่องปากของผู้มีสุขภาพดี มีงานวิจัยที่คัดแยกเชื้อโพรไบโอติกส์ชนิดนี้จากน้ำลายอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดี พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์, เชื้อสเตรปโตคอคคัส ซาลิวาเรียส, เชื้อสเตรปโตคอคคัสแซนควินิส และเชื้อรา^[47]

เนื่องจากไม่ทราบสายพันธุ์ของเชื้อ *L. paracasei* ที่ใช้ในงานวิจัย เพราะเป็นข้อมูลทางการค้า แต่มีงานวิจัยที่ทำงานทดลองโดยใช้เชื้อ *L. paracasei* ที่ทราบสายพันธุ์ และผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ได้แก่

งานวิจัยของ Holz และคณะ ปี 2013 เป็นการศึกษาระยะสั้นเพียง 2 วัน โดยให้ผู้เข้าร่วมวิจัย อมลูกอมปราศจากน้ำตาลที่มีเชื้อ *L. paracasei* DSMZ 16671 ผลการวิจัย พบว่าเชื้อ

L. paracasei DSMZ 16671 มีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. mutans* ในน้ำลายของผู้เข้าร่วมวิจัย^[57]

งานวิจัยของ Li Chuan Chuang และคณะ ปี 2010 ระยะเวลาการศึกษา 8 สัปดาห์ โดยให้ผู้ร่วมวิจัยบริโภค oral tablet ที่มีเชื้อ *L. paracasei* GMNL 33 ทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นับจำนวน *S. mutans* ก่อนกิน หลังหยุดกินทันที และหลังหยุดกินไปแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่า หลังหยุดกินไปแล้ว 4 สัปดาห์ จำนวนเชื้อ *S. mutans* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ^[58]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า แม้จะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน แต่สายพันธุ์ของเชื้อที่ต่างกัน ระยะเวลาในการทานที่ต่างกัน ล้วนมีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. mutans* ทั้งสิ้น

ต่อมาเป็นการศึกษาที่ทำในกลุ่มตัวอย่างคนไทย คือการศึกษาของ Teanpaisan และคณะ เริ่มตั้งแต่ใน ปี 2011 มีการคัดแยกเชื้อ *L. paracasei* SD1 จากช่องปากเด็กปราศจากฟันผุ พบว่ามีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. mutans*^[59] และทำการศึกษาต่อในปี 2014 เป็นการศึกษาระยะสั้น 4 สัปดาห์ โดยการดื่มนมที่ผสมเชื้อ *L. paracasei* SD1 พบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของเชื้อ MS และดูการคงอยู่ของเชื้อ *L. paracasei* SD1 หลังหยุดดื่มนมไปแล้ว 4 สัปดาห์ สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกลุ่มตัวอย่าง 15 คน จาก 20 คน^[60] Teanpaisan และคณะ ทำการศึกษาต่อในปี 2015 เป็นการศึกษาระยะยาว 6 เดือน และวัดผลหลังสิ้นสุดการทดลองไปอีก 6 เดือน พบการลดลงอย่างพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของเชื้อ MS และดูการคงอยู่ของเชื้อ *L. paracasei* SD1 เริ่มตรวจพบเชื้อ *L. paracasei* SD1 ในเดือนที่ 3 โดยพบร้อยละ 85 ของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งหมด, เดือนที่ 6 พบร้อยละ 80 ,เดือนที่ 9 พบร้อยละ 60 และตรวจไม่พบเชื้อ *L. paracasei* SD1 ในเดือนที่ 12^[61] จากการศึกษาของ Teanpaisan และคณะ ในปี 2014 และ 2015 แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *L. paracasei* SD1 มีผลต่อการลดจำนวนเชื้อ *S. mutans* ได้หลังจากกิน 4 สัปดาห์ และตรวจพบว่าเชื้อ *L. paracasei* SD1 สามารถตั้งถิ่นฐานในช่องปากได้ หลังจากหยุดกินอย่างต่ำ 4 สัปดาห์ แต่ไม่เกิน 6 เดือน เพราะจากการตรวจในเดือนที่ 12 ไม่พบเชื้อ *L. paracasei* SD1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* จึงหมดไปด้วย^[60, 61] บ่งชี้ว่าเชื้อ *L. paracasei* SD1 ไม่สามารถตั้งถิ่นฐานในช่องปากได้ตลอดไป เนื่องจากสภาวะของช่องปากที่ไม่เหมาะสมต่อการตั้งถิ่นฐานของเชื้อชนิดนี้ จึงจำเป็นต้องบริโภคนมที่มีเชื้อโพรไบโอติกส์อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ผลในการลดลงของเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไคยังคงอยู่ แต่ในงานวิจัยของเรา พบว่าเชื้อ *L. paracasei* สายพันธุ์ที่มีโนนมเปรี้ยวเข้มข้น ดีไลท์ อิมมัลท์ โดยระยะเวลาในการกิน 10 วัน สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. mutans* ในน้ำลายได้ และหลังจากหยุดกิน 1 เดือน พบว่า ผลในการลดจำนวนเชื้อ *S. mutans* หมดไปแล้ว เห็นได้ว่า ระยะเวลาสั้น 1 เดือน เพียงพอต่อการปรับค่าตั้งต้นของ

เชื้อสายพันธุ์นี้ได้ใหม่ สามารถลดผลสืบเนื่องจากเชื้อ *L. paracasei* สายพันธุ์ในนมเปรี้ยวชนิดนี้ได้ และบ่งชี้อีกอย่างว่า เพื่อผลในการลดลงของ *S. mutans* ที่มีประสิทธิภาพ ต้องบริโภคโพรไบโอติกส์ชนิดนี้อย่างต่อเนื่อง

การลดลงของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ อาจเป็นผลมาจากทั้งเชื้อ *L. paracasei* ซึ่งเป็นโพรไบโอติกส์ที่มีอยู่ในนม และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของนมเปรี้ยวที่มีค่าเท่ากับ 4 ซึ่งมีความเป็นกรดค่อนข้างสูงจึงอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพิ่มเติมโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติก ซอย บรธ (tryptic soy broth) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกัน 2 ค่า คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ปรับให้เท่ากับค่าความเป็นกรด-ด่างของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ดัชมิลล์ ดีไลท์ อิมัลชัน® เลี้ยงเชื้อข้ามคืน (overnight) แล้วปรับให้ได้ความขุ่น (OD) 0.1 เท่ากันทั้ง 2 หลอด ที่ ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อไมดิส ซาลิวาเรียส แบชิตราซิน อะการ์ โดยแต่ละหลอดทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง อบในตู้อบเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล เพื่อดูว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ มีผลต่อการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หรือไม่ พบว่า ปริมาณเชื้อที่อ่านได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.2 และ 4 ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ในภาวะความเป็นกรด-ด่าง 4 เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์สามารถเจริญได้ดี เช่นเดียวกับภาวะความเป็นกรด-ด่าง 7.2 จึงสรุปได้ว่า ผลของการลดลงของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์หลังการดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ ไม่ได้มาจากค่าความเป็นกรดของนมเปรี้ยว

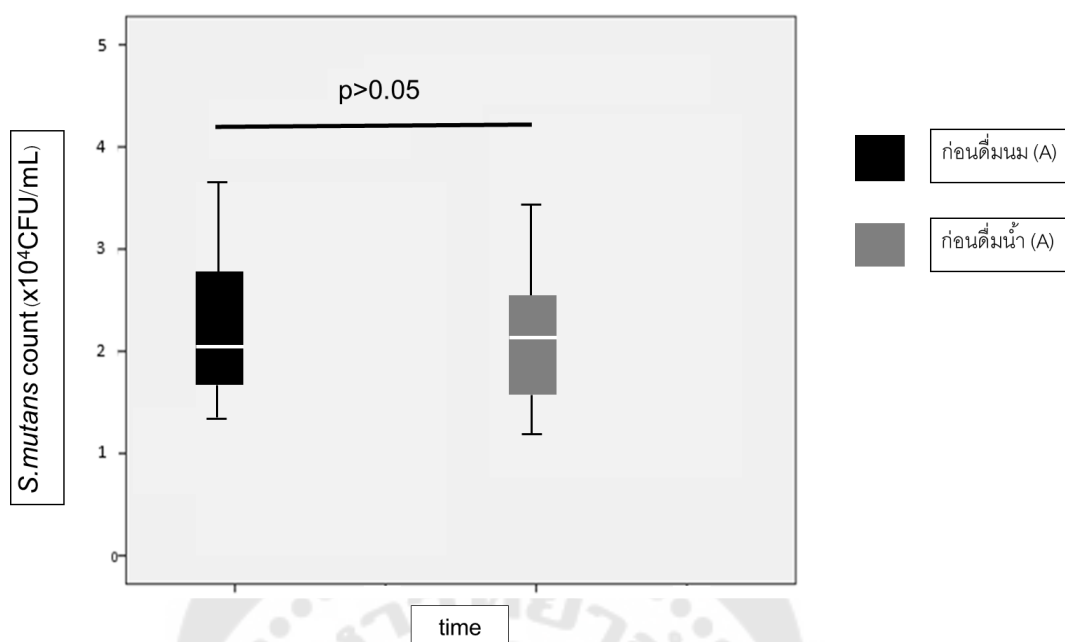
สำหรับผลของแคลเซียมในนมต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย ยังไม่มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างแคลเซียมกับจำนวนเชื้อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย แต่สารต่าง ๆ ในนมที่มีผลช่วยส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ให้แก่ฟัน เช่น สารเคซีน (casein), แคลเซียม (calcium) และฟอสฟอรัส (phosphorus)^[25] มีผลทำให้ฟันมีความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดฟันผุได้สูงขึ้น ส่วนการลดลงของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายภายหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ อาจเป็นผลมาจากส่วนประกอบอื่น ๆ ในนมได้ จำเป็นต้องการศึกษาอย่างละเอียดเพิ่มเติมต่อไป การเลือกใช้ตัวควบคุมเป็นน้ำเปล่า เนื่องจากยากที่จะหานมเปรี้ยวที่ไม่มีเชื้อโพรไบโอติกส์มาเป็นตัวควบคุม การ

ใช้น้ำเปล่าจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดี เพราะไม่มีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดฟันผุเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้นมโคแท้ 100%

ปริมาณเชื้อ *L. paracasei* ที่อยู่ในนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม มีจำนวนไม่ต่ำกว่า 10^9 โคโลนีฟอर्मมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตามระบุในฉลาก) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ระบุปริมาณหรือความเข้มข้นของโพรไบโอติกส์ที่แนะนำให้เติมลงในผลิตภัณฑ์ เพื่อให้การป้องกันหรือรักษาโรคเกิดประสิทธิภาพสูงสุด อาจมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับโรคที่รักษาและสายพันธุ์ที่นำมาใช้ โดยทั่วไปแนะนำให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^7 - 10^8 โคโลนีฟอर्मมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร^[27-29] นอกจากนี้ หากต้องนำมาใช้เพื่อลดการเกิดฟันผุ ผลิตภัณฑ์นั้นไม่ควรมีส่วนผสมของน้ำตาล โดยผลิตภัณฑ์ที่เลือกใช้ในการวิจัยนี้ผสมน้ำตาลร้อยละ 0.1 เทียบเท่าปริมาณน้ำตาล 0.001 กรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสูตรที่ผสมน้ำตาลน้อยที่สุดที่จำหน่ายในท้องตลาด โดยใช้หญ้าหวานแทนน้ำตาล ทำให้มีแคลอรีต่ำ และไขมันร้อยละ 0 สอดคล้องกับการศึกษาของ Teanpaisan และคณะ ปี 2014 และ 2015 ผสมเชื้อ *L. paracasei* SD1 ปริมาณ 10^7 โคโลนีฟอर्मมิงยูนิตต่อมิลลิลิตรในรูปแบบนมผงผสมน้ำ มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดเชื้อจำนวนมิลลิเมตร สเตร็ปโตคอคคัส

การออกแบบการทดลองของการศึกษาเป็นแบบ ปกปิดทางเดียว สุ่มทดลองแบบไขว้ (single blind-randomized cross-over trial) ในการศึกษาทดลองทางคลินิกส่วนใหญ่เป็นการศึกษาทดลองแบบเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยผู้ป่วยแต่ละรายได้รับการศึกษาเพียงวิธีเดียว แต่ในบางสถานการณ์อาจสามารถทำการศึกษาที่ให้การเปรียบเทียบผลการรักษาที่แม่นยำกว่า โดยการเปรียบเทียบผู้ป่วยในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งผู้ป่วยแต่ละรายจะได้รับการรักษามากกว่า 1 วิธีการศึกษาดังกล่าวเรียกว่า การทดลองแบบไขว้กัน (cross-over designs)^[62] รูปแบบการศึกษแบบนี้พบมากคือ การศึกษาที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาสองวิธีในเวลาที่แตกต่างกันสองระยะเวลา (two periods cross-over trial) โดยสุ่มลำดับของวิธีการรักษา ในบางกรณีอาจสามารถทำการรักษาโดยการให้การรักษาามากกว่าสองวิธี (multi-period cross-over designs)^[62] แต่การศึกษาดทดลองแบบไขว้มีข้อเสียคือ ปัญหาของการหยุดการศึกษา (drop outs) ของกลุ่มตัวอย่างก่อนที่การศึกษาจะสิ้นสุด หากเกิดการ drop outs ของกลุ่มตัวอย่าง จะทำให้การวิเคราะห์ผลและแปลผลทำได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วย drop out ในระยะที่ 1^[63] แต่ในการทดลองนี้ไม่พบการ drop outs ของกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่คัดเลือกเป็นบุคคลากรภายในคณะ และกลุ่มตัวอย่างรับทราบระยะเวลาในการทดลองที่แน่นอน จึงทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องเวลาในขณะดำเนินการวิจัย การศึกษาบางการศึกษา ต้องคำนึงถึงปัญหาทางจริยธรรม เช่น การศึกษาที่ต้องการแก้ไขปัญหของผลสืบเนื่องของยาเดิม (carry over effect) ด้วยการกำหนดให้มีระยะพัก

(wash out period) ซึ่งในโรคบางอย่าง การไม่ให้การรักษาใด ๆ เลยในระหว่างระยะพัก จะเป็นผลเสียกับผู้ป่วย การกำหนดให้มีระยะพักจึงไม่สามารถทำได้ แต่ในการทดลองนี้ ไม่ได้ให้ยาเพื่อการรักษาผู้ป่วย แต่เป็นการให้อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี และปฏิเสธโรคประจำตัวที่มีผลกับการทดลองดื่มนมและน้ำ หากมีอาสาสมัครที่แพ้นมวัว จะไม่ได้รับคัดเลือกให้เข้าร่วมการทดลอง จึงตัดปัญหาการไม่ให้การรักษาใด ๆ ในระยะพักออกได้ และปัญหาการเกิดผลจากลำดับของการได้รับยา (sequence effect) ผลจากช่วงเวลา (period effect) ผลสืบเนื่องจากยาเดิม (carry over effect) ดังนั้นควรมีการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง เพื่อเข้าลำดับของการได้รับวิธีการรักษา เพื่อลดปัญหาจากผลจากลำดับของการได้รับยา และควรมีช่วงเวลาล้าง (wash out period) ที่เพียงพอ เพื่อลดผลสืบเนื่องจากยาเดิม ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า ระยะเวลาล้าง 30 วัน เพียงพอต่อการลดผลสืบเนื่องของวิธีการทดลองแรก เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ก่อนดื่มนมและก่อนดื่มน้ำของกลุ่มทดลอง A (ดื่มนมในช่วงการทดลองที่ 1 และดื่มน้ำในช่วงการทดลองที่ 2) พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 14 ส่วนการคงอยู่ของเชื้อ *L. paracasei* หลังดื่มนมเป็นเวลานานเท่าไร จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป



ภาพประกอบ 14 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนดื่มนมและก่อนดื่มน้ำของกลุ่มทดลอง A

จากการศึกษานำร่อง (pilot study) โดยหาเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในช่องปากของ นิสิตระดับปริญญาตรี คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ปลอดฟันผุ ไม่พบเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้นภายในช่องปากของผู้เข้าร่วมวิจัย ทางผู้วิจัยจึงเปลี่ยนแปลงเกณฑ์การคัดเลือก (inclusion criteria) และเกณฑ์คัดออก (exclusion criteria) เพื่อให้ได้กลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้นเพียงพอต่อการดำเนินการวิจัย และหาค่าการเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสมคือ 10^3 - 10^4 CFU/mL โดยมีเกณฑ์คัดเลือกและคัดออกใหม่ ดังนี้

เกณฑ์ในการคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. อายุ 20-50 ปี และเป็นบุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2. สุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวหรือรับประทานยาที่ส่งผลต่อภาวะในช่องปาก
3. ปฏิเสธการแปรงม้วน
4. ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ
5. มีความสมัครใจ ยินยอมเข้าร่วมโครงการและเซ็นยินยอมใน informed consent form

6. มีจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้นเพียงพอต่อการดำเนินการวิจัย (10^3 - 10^4

CFU/mL

เกณฑ์ในการคัดออก (Exclusion criteria)

1. มี orthodontic appliance หรือ removable appliance ในช่องปาก
2. หยุดรับประทานยาฆ่าเชื้อมาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
3. หยุดใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อมาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 สัปดาห์ก่อน

เข้าร่วมการวิจัย

โดยเกณฑ์ในการคัดเข้าและคัดออกเดิม ดังนี้

เกณฑ์ในการคัดเข้า (Inclusion criteria)

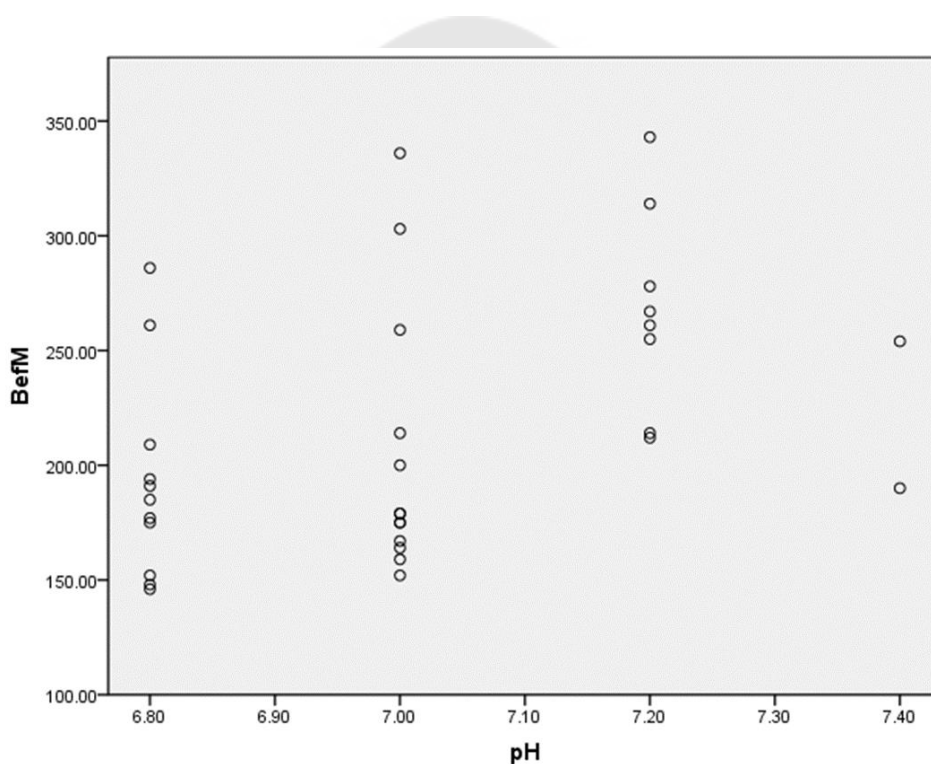
1. อายุ 19-24 ปี
2. สุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวหรือรับประทานยาที่ส่งผลต่อภาวะในช่องปาก
3. ปฏิเสธการแพ้นมวัว
4. ไม่มีฟันผุ หรือหากมีฟันผุต้องได้รับการบูรณะและอยู่ในสภาพดี
5. ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ
6. มีฟันในช่องปากอย่างน้อย 24 ซี่
7. มีความสมัครใจ ยินยอมเข้าร่วมโครงการและเซ็นยินยอมใน informed consent form

เกณฑ์ในการคัดออก (Exclusion criteria)

1. มีฟันกรามซี่ที่ 3 ที่ขึ้นในตำแหน่งผิดปกติ
2. มี fix หรือ removable appliance ในช่องปาก

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายในขณะพักก่อนเริ่มการทดลอง กับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น พบว่า มีเพียงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายที่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น โดยความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันปานกลาง กล่าวคือ เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น จำนวนเชื้อ *S. mutans* ในช่องปากจะเพิ่มขึ้นตามด้วย จนถึงระดับหนึ่ง เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *S. mutans* อีก จากการทดลอง พบว่า ปริมาณเชื้อจำนวนมาก กระจายอยู่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 6.8-7.2 โดยเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น จำนวนเชื้อที่พบจะ

น้อยลง ดังแสดงในภาพประกอบที่ 15 สอดคล้องกับการศึกษาของ Hicks J และคณะ ปี 2004 กล่าวว่า น้ำลายระยะพัก มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงแคบ ๆ คือระหว่าง 6.7-7.4 ระบบสำคัญในการบัฟเฟอร์ของน้ำลายในช่องปาก คือ สารไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) เมื่อระดับของสารไบคาร์บอเนตในน้ำลายเพิ่มขึ้น ไม่เพียงแต่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น ยังมีผลต่อระบบนิเวศในช่องปาก คือจะไปกีดการเจริญของเชื้อที่มีความสามารถทนกรดได้สูง เช่น เชื้อก่อโรคฟันผุกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และแคนดิดา อัลบิแคน (*Candida albican*) เป็นต้น^[64] จึงพบเชื้อชนิดนี้ได้บ่อย เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น



ภาพประกอบ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายกับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ตั้งต้น

ข้อจำกัดของงานวิจัย และแนวทางการวิจัยในอนาคต

ไม่ทราบสายพันธุ์ของเชื้อในนมเปรี้ยว โดยหากทราบสายพันธุ์ จะสามารถการติดตามการคงอยู่ของเชื้อชนิดนี้ในน้ำลายภายหลังหยุดกินได้ ซึ่งอาจต้องเป็นการศึกษาต่อในอนาคต

ความเป็นกรดของนมเปรี้ยวที่สูง ดังที่กล่าวมาแล้วว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. mutans* แต่เนื่องจากเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่าค่าวิกฤต (critical pH) ส่งเสริมให้เกิดการสูญเสียของแร่ธาตุ (demineralization) จากตัวฟันได้ หากมีการศึกษาต่อ ไม่ควรปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของนมให้ต่ำกว่าค่าวิกฤต แต่ข้อดีของการใช้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบนม คือ แคลเซียมในนมก็ส่งเสริมการเกิดการคืนกลับของแร่ธาตุ (remineralization) ของตัวฟันได้

จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มถึงกลไกของเชื้อ *L. paracasei* ต่อเชื้อ *S. mutans*

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ช่วยลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์ได้ ซึ่งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์เป็นสาเหตุหลักในการเริ่มต้นการก่อโรคฟันผุ หากสามารถลดจำนวนเชื้อตัวนี้ได้ ก็สามารถลดความเสี่ยงในการเกิดฟันผุได้ และเพื่อผลในการลดจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องบริโภคโพรไบโอติกส์อย่างต่อเนื่อง เพราะเชื้อโพรไบโอติกส์ไม่สามารถสร้างถิ่นฐานในช่องปากมนุษย์ได้อย่างถาวร เนื่องจากสภาวะในช่องปากที่ไม่เอื้อต่อการตั้งถิ่นฐาน ต้องมีการศึกษาต่อไปถึงสายพันธุ์ของเชื้อโพรไบโอติกส์ที่สามารถตั้งถิ่นฐานอย่างถาวรในช่องปากมนุษย์ได้ อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกส์เป็นเพียงวิธีการเสริม เนื่องจากฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกัน (multifactorial disease) การใช้โพรไบโอติกส์ เป็นเพียงการกำจัดปัจจัยด้านเชื้อเพียงอย่างเดียว วิธีการหลักเช่นการแปรงฟันยังต้องทำต่อไปควบคู่กันต่อไป เพื่อผลในการลดฟันผุอย่างมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

1. Featherstone J, Duncan J, Cutress T. A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during in-vitro caries simulation on human tooth enamel. Archives of oral biology. 1979;24(2):101-12.
2. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries research. 2004;38(3):182-91.
3. Sansone C, Van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis H. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. Journal of dental research. 1993;72(2):508-16.
4. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. Journal of dental research. 1994;73(3):672-81.
5. Caufield PW, Griffen AL. Dental caries: an infectious and transmissible disease. Pediatric Clinics of North America. 2000;47(5):1001-19.
6. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. Journal of dental education. 2001;65(10):1028-37.
7. Kuramitsu HK. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. Current issues in molecular biology. 2001;3(2):35-6.
8. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas C. Current understanding of the epidemiology, mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. Pediatric dentistry. 2002;24(6):543-51.
9. Ganguly N, Bhattacharya S, Sesikeran B, Nair G, Ramakrishna B, Sachdev H, et al. ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. The Indian journal of medical research. 2011;134(1):22.
10. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? European journal of oral sciences. 2005;113(3):188-96.
11. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics.

2006;118(2):511-21.

12. Könönen E, Kanervo A, Takala A, Asikainen S, Jousimies-Somer H. Establishment of oral anaerobes during the first year of life. *Journal of dental research*. 1999;78(10):1634-9.
13. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries research*. 2001;35(6):412-20.
14. Ahola A, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of oral biology*. 2002;47(11):799-804.
15. Nikawa H, Makihiro S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International journal of food microbiology*. 2004;95(2):219-23.
16. Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, et al. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. *Digestion*. 2004;69(1):53-6.
17. Caglar E, Kavaloglu Cildir S, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2006;64(5):314-8.
18. Caglar E, Kavaloglu S, Kuscu O, Sandalli N, Holgersson P, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clinical oral investigations*. 2007;11(4):425-9.
19. Singh R, Damle SG, Chawla A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2011;69(6):389-94.
20. Çaglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young

adults. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2005;63(6):317-20.

21. Çaglar E, Onder Kuscu O, Selvi Kuvvetli S, Kavaloglu Cildir S, Sandalli N, Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2008;66(3):154-8.
22. Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, et al. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *The European Journal of Orthodontics*. 2009;31(4):407-11.
23. Taipale T, Pienihäkkinen K, Alanen P, Jokela J, Söderling E. Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries research*. 2013;47(5):364-72.
24. Hedayati-Hajikand T, Lundberg U, Eldh C, Twetman S. Effect of probiotic chewing tablets on early childhood caries—a randomized controlled trial. *BMC oral health*. 2015;15(1):112.
25. Levine R. Briefing paper: Milk, flavoured milk products and caries. *British dental journal*. 2001;191(1):20.
26. Teanpaisan R, Chooruk A, Wannun A, Wichienchot S, Piwat S. Survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1 in milk powder using spray drying. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*. 2012;34(3):247.
27. ISHIBASHI N, SHIMAMURA S. *Bifidobacteria*: research and development in Japan. *Food technology*. 1993;47(6):126-36.
28. Cabana MD, Shane AL, Chao C, Oliva-Hemker M. Probiotics in primary care pediatrics. *Clinical pediatrics*. 2006;45(5):405-10.
29. Ouwehand A. A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Beneficial microbes*. 2017;8(2):143-51.
30. Keys P. Factors influencing the initiation, transmission, and inhibition of dental caries. *Publ Amer Assoc Advan Sci*. 1963;75:261-83.
31. LeGeros RZ, Tung MS. Chemical stability of carbonate-and fluoride-containing apatites. *Caries Research*. 1983;17(5):419-29.

32. Brown LR, Dreizen S, Handler S, Johnston DA. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. *Journal of Dental Research*. 1975;54(4):740-50.
33. Zahradnik R, Moreno E, Burke E. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *Journal of dental research*. 1976;55(4):664-70.
34. Mörmann JE, Mühlemann H. Oral starch degradation and its influence on acid production in human dental plaque. *Caries research*. 1981;15(2):166-75.
35. Gibbons R. Microbial ecology adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dental Research*. 1984;63(3):378-85.
36. Holt JG, Williams ST, Holt. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 4: Lippincott Williams & Wilkins; 1989.
37. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of dental research*. 2011;90(3):294-303.
38. Chapin K. Principles of stains and media, p 182–191. *Manual of clinical microbiology*, 9th ed ASM Press, Washington, DC. 2007.
39. Miller JM. General principles of specimen collection and handling. *Manual of clinical microbiology*. 2002.
40. Gold OG, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*. 1973;18(11):1357-64.
41. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965;147(3659):747-8.
42. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991;32(4):439.
43. group FWw. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina (October 1–4, 2001). 2001.
44. Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F, Neeser JR. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *European journal of oral sciences*. 2002;110(3):218-24.
45. Silva M, Jacobus N, Deneke C, Gorbach S. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987;31(8):1231-3.
46. Ahrne S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold A, Molin G. The normal

Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of applied microbiology*. 1998;85(1):88-94.

47. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *Journal of applied microbiology*. 2001;90(2):172-9.

48. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand A, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral microbiology and immunology*. 2006;21(5):326-32.

49. Wei H, Loimaranta V, Tenovuo J, Rokka S, Syväoja EL, Korhonen H, et al. Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* strain GG or treated at ultra-high temperature. *Oral microbiology and immunology*. 2002;17(1):9-15.

50. Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Archives of oral biology*. 2001;46(8):705-12.

51. Coqueiro AY, Bonvini A, Raizel R, Tirapegui J, Rogero MM. Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nutrire*. 2018;43(1):6.

52. Lawrence RC, Thomas TD. The fermentation of milk by lactic acid bacteria: Cambridge University Press; 1979.

53. Senok A, Ismaeel A, Botta G. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(12):958-66.

54. Antony S, Dummer S, Stratton C. *Lactobacillus Bacteremia and Endocarditis* 1998. 1483-4 p.

55. Hempel S, Newberry S, Ruelaz A, Wang Z, Miles J, Suttorp M, et al. Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease. Evidence report/technology assessment. 2011(200):1.

56. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;694(1):72-7.

57. Holz C, Alexander C, Balcke C, Moré M, Auinger A, Bauer M, et al. *Lactobacillus*

paracasei DSMZ16671 reduces mutans streptococci: a short-term pilot study. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2013;5(4):259-63.

58. Chuang L-C, Huang C-S, Ou-Yang L-W, Lin S-Y. Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clinical oral investigations*. 2011;15(4):471-6.

59. Teanpaisan R, Piwat S, Dahlen G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Letters in applied microbiology*. 2011;53(4):452-9.

60. Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus paracasei* SD1, a novel probiotic, reduces mutans streptococci in human volunteers: a randomized placebo-controlled trial. *Clinical oral investigations*. 2014;18(3):857-62.

61. Teanpaisan R, Piwat S, Tianviwat S, Sophatha B, Kampoo T. Effect of long-term consumption of *Lactobacillus paracasei* SD1 on reducing mutans streptococci and caries risk: a randomized placebo-controlled trial. *Dentistry journal*. 2015;3(2):43-54.

62. Putt ME, Chinchilli VM. Nonparametric approaches to the analysis of crossover studies. *Statistical Science*. 2004;712-9.

63. Senn SS. *Cross-over trials in clinical research*: John Wiley & Sons; 2002.

64. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2004;28(1):47-52.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารแสดงการผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมสำหรับ
โครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์MF-04-version-2.0
วันที่ 18 ต.ค. 61หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัยของข้อเสนอการวิจัย
เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมการวิจัยและยินยอม

หมายเลขข้อเสนอการวิจัย SWUEC-G- 069/2562E

ข้อเสนอการวิจัยนี้และเอกสารประกอบของข้อเสนอการวิจัยตามรายการแสดงด้านล่าง ได้รับการพิจารณาจาก
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒแล้ว คณะกรรมการฯ
มีความเห็นว่าข้อเสนอการวิจัยที่จะดำเนินการมีความสอดคล้องกับหลักจริยธรรมสากล ตลอดจนกฎหมาย ข้อบังคับและ
ข้อกำหนดภายในประเทศ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้

ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง: ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโปรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีเทนส์ใน
น้ำลายมนุษย์

ชื่อผู้วิจัยหลัก: นางสาวศรณี ชุมโรย

สังกัด: คณะทันตแพทยศาสตร์

เอกสารที่รับรอง: 1. แบบเสนอโครงการวิจัย
2. โครงการวิจัย
3. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย
4. หนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

เอกสารที่พิจารณาทบทวน

1. แบบเสนอโครงการวิจัย	ฉบับที่ 3 วัน/เดือน/ปี 30 ต.ค. 2562
2. โครงร่างการวิจัย	ฉบับที่ 3 วัน/เดือน/ปี 30 ต.ค. 2562
3. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย	ฉบับที่ 3 วัน/เดือน/ปี 30 ต.ค. 2562
4. หนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ 3 วัน/เดือน/ปี 30 ต.ค. 2562

(ลงชื่อ).....

(นายปิยชาติ บุญเพ็ญ)

กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

(ลงชื่อ).....

(แพทย์หญิงสุรพร ภัทรสุวรรณ)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/E/G-069/2562

วันที่ให้การรับรอง : 30/10/2562

วันหมดอายุใบรับรอง : 30/10/2563

ภาคผนวก ข

แบบบันทึกข้อมูลผู้ร่วมวิจัย“ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อ
สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์”

เลขที่.....

วันที่บันทึกข้อมูล

แบบบันทึกข้อมูลผู้ร่วมวิจัย“ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรป
โตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายมนุษย์”

ข้อมูลทั่วไป

1. เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง
2. อายุ.....ปี
3. น้ำหนัก.....กิโลกรัม
4. ส่วนสูง.....เซนติเมตร

ข้อมูลเกี่ยวกับโรคประจำตัว

1. โรคประจำตัว ☐ มี
ระบุ.....
☐ ไม่มี
2. ยาที่รับประทานในปัจจุบัน ☐ มี
ระบุ.....
☐ ไม่มี

ข้อมูลการดูแลสุขภาพช่องปาก

1. แปรงฟันวันละ.....ครั้ง
2. ยาสีฟันที่ใช้.....
3. การได้รับฟลูออไรด์อื่นๆ

วันที่บันทึกข้อมูล

การตรวจในช่องปาก

1. ดัชนีผุ่ อุด ถอน (DMFT)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

2. ร่องลึกปริทันต์

วันที่บันทึกข้อมูล

การตรวจน้ำลาย

1. อัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก.....มิลลิลิตร/นาที
2. ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำลาย.....

ตารางบันทึกผลการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์

ครั้งที่ (วันที่)	1		2		3		4	
	(.....)		(.....)		(.....)		(.....)	
จำนวนเชื้อ	1/1	1/2	2/1	2/2	3/1	3/2	4/1	4/2

ผู้บันทึกข้อมูล.....

ภาคผนวก ค

เอกสารเชิญชวนผู้เข้าร่วมวิจัย

หัวข้อวิจัย ผลของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ ในน้ำลายมนุษย์

หัวหน้าโครงการ นางสาวดุรณี ชุมโรย 0902260055

คุณสมบัติของผู้เข้าร่วมโครงการ

1. อายุ 20-50 ปี และเป็นบุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2. สุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวหรือรับประทานยาที่ส่งผลต่อภาวะในช่องปาก
3. ปฏิเสธการแพ้นมวัว
4. ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ
5. มีความสมัครใจ ยินยอมเข้าร่วมโครงการและเซ็นยินยอมใน informed consent form
6. ไม่มี orthodontic appliance หรือ removable appliance ในช่องปาก
7. หยุดรับประทานยาฆ่าเชื้อมาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
8. หยุดใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อมาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย

สามารถเข้าร่วมโครงการ โดยยินยอมให้เก็บน้ำลายก่อนและหลังการดื่มผลิตภัณฑ์ที่ผู้วิจัยใช้ในการดำเนินการวิจัย ซึ่งการดำเนินการทดลองมี 2 ช่วงๆ ละ 10 วัน ผู้เข้าร่วมโครงการต้องดื่มผลิตภัณฑ์ดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน

ท่านที่มีคุณสมบัติดังกล่าว และมีความสนใจเข้าร่วมโครงการวิจัย โปรดติดต่อหัวหน้าโครงการ นางสาวดุรณี ชุมโรย ภาควิชาทันตกรรมทั่วไป คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โทร 0902260055 line id: darudent

หากท่านตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัยแล้ว จะมีขั้นตอนการวิจัยดังต่อไปนี้คือ

ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง 57 วัน ประกอบด้วย 4 ช่วงเวลา

-ช่วงเตรียมสภาพก่อนการทดลอง (run-in period) 7 วัน,

-ช่วงดำเนินการทดลอง (intervention period) 2 ช่วง ๆ ละ 10 วัน

-ช่วงล้าง (wash out period) 30 วัน

➤ ช่วงเตรียมสภาพก่อนการทดลอง ตรวจสอบสภาพช่องปากของผู้เข้าร่วมวิจัยและบันทึกผลใน

แบบฟอร์มการตรวจช่องปาก โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้ตรวจช่องปากของผู้เข้าร่วมวิจัย
เพียงคนเดียว และในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยจะทำการขูดคราบหินน้ำลายเหนือเหงือกให้แก่
ผู้เข้าร่วมการวิจัยทุกคน โดยทำการขูดหินน้ำลาย (scaling) ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค

➤ ช่วงดำเนินการทดลอง (2 ช่วง) ในช่วงนี้ผู้เข้าร่วมวิจัยจะต้องปฏิบัติตัวดังนี้

-ดื่มผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลองหลังอาหารเช้า ทุกเช้าเป็นเวลา 10 วันติดต่อกัน
โดยขณะดื่มต้องกลืนในปากเป็นเวลา 2 นาทีแล้วกลืน

-ห้ามแปรงฟันหลังดื่มอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

-งดการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกส์อื่น ๆ ที่นอกเหนือจาก
ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

-งดผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไซลิทอล

-งดการใช้อยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อทุกชนิด

➤ ช่วงเตรียมสภาพก่อนการทดลอง และช่วงล้าง ในช่วงนี้ผู้เข้าร่วมวิจัยจะต้องปฏิบัติตัวดังนี้

-งดการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกส์ทุกชนิด

-งดผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไซลิทอล

-งดการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อและน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อทุกชนิด

-ดูแลสุขอนามัยในช่องปากด้วยการแปรงฟันอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง

การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลาย 4 ครั้ง คือ ก่อนและหลังการทดลองในช่วงการทดลอง โดยเป็นการเก็บน้ำลายในขณะพัก (unstimulated saliva) ให้ผู้เข้าร่วมวิจัยบ้วนน้ำลายลงในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บน้ำลายครั้งละ 4 มิลลิลิตรโดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique)



ภาคผนวก ง

ตารางบันทึกข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย

ตาราง 9 บันทึกข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมวิจัย

ลำดับ	เพศ	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (kg.)	ส่วนสูง (cm.)	โรค ประจำตัว	ยา	ความ ถี่ใน การ แปรง	DM FT	PD (CPI)	pH	Flow Rate (mL/ min)
1.	F	46	63	151	-	-	2	15	3(2)	6.8	0.27
2.	F	30	63	155	-	-	2	3	3(2)	7.0	0.33
3.	F	39	48	156	-	-	2	11	3(2)	6.8	0.18
4.	F	43	41	147	Gastritis	Miracid®	2	7	3(2)	7.0	0.27
5.	F	35	79	165	-	-	2	11	2(1)+	7.4	0.33
6.	F	42	86	163	-	-	2	10	3(2)	6.8	0.4
7.	M	27	84	181	-	-	2	11	3(2)	7.0	0.25
8.	F	29	80	165	-	-	2	9	3(2)	6.8	0.2
9.	M	28	67	170	-	-	2	8	2(1)+	7.0	0.36
10.	F	44	56	158	-	-	3	9	3(2)	7.2	0.8
11.	M	25	65	171	-	-	2	5	3(2)	7.2	0.21
12.	F	24	49	155	-	-	2	11	3(2)	7.4	0.25
13.	F	31	87	167	-	-	2	4	3(2)	6.8	0.2
14.	F	41	53	162	-	-	2	14	3(2)	7.2	0.5
15.	F	33	56	157	-	-	2	12	3(2)	6.8	0.4
16.	F	22	64	165	-	-	2	9	3(2)	7.2	0.2
17.	F	29	55	173	-	-	2	19	3(2)	7.0	0.19
18.	F	36	55	150	Allergic rhinitis	-	3	8	3(2)	6.8	0.33
19.	F	38	49	159	-	-	2	7	3(2)	7.2	0.8

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับ	เพศ	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (kg.)	ส่วนสูง (cm.)	โรค ประจำตัว	ยา	ความถี่ ในการ แปรง	DM FT	PD (CPI)	pH	Flow Rate (mL/ min)
20.	F	40	48	155	-	-	3	8	3(2)	6.8	0.4
21.	F	21	53	155	-	-	3	13	3(2)	7.0	0.2
22.	F	39	52	147	-	-	2	12	3(2)	7.2	0.2
23.	F	40	58	160	-	-	2	14	3(2)	7.0	0.27
24.	F	33	53	165	-	-	3	14	3(2)	7.0	0.33
25.	F	21	40	156	-	-	2	11	3(2)	6.8	0.5
26.	F	40	60	160	-	-	2	8	3(2)	6.8	0.27
27.	F	30	60	160	-	-	3	11	3(2)	6.8	0.2
28.	M	29	55	166	-	-	2	9	3(2)	7.0	0.27
29.	F	28	55	157	-	-	2	13	3(2)	7.0	0.2
30.	F	39	63	160	-	-	2	7	3(2)	7.0	0.27
31.	F	46	57	155	-	-	4	8	3(2)	7.0	0.67
32.	F	36	62	163	-	-	2	12	3(2)	7.0	0.25
33.	F	40	49	162	-	-	2	16	3(2)	7.2	0.3
34.	F	21	45	160	-	-	2	12	2(1)+	7.2	0.25

ตาราง 10 บันทึกจำนวนเชื้อที่นับได้ในแต่ละครั้ง

ลำดับ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
1	185	26	210	155
2	152	24	208	242
3	148	11	202	163
4	214	19	240	347
5	190	13	222	245
6	209	11	233	271
7	164	226	175	30
8	175	21	236	198
9	175	14	189	311
10	228	182	255	24
11	239	201	212	11
12	231	184	254	19
13	177	17	289	220
14	278	16	221	243
15	354	379	152	41
16	330	125	267	42
17	303	20	145	222
18	301	374	146	23
19	214	26	270	311
20	228	259	286	23
21	161	201	159	15
22	314	15	178	269
23	304	249	167	50
24	179	17	158	255
25	171	167	261	21

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
26	186	153	194	16
27	191	16	188	203
28	396	233	179	26
29	200	11	173	281
30	220	266	164	23
31	336	8	192	199
32	311	167	259	40
33	343	11	325	192
34	317	244	261	28

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 19.0

ตาราง 11 เปรียบเทียบผลของการลดลงของจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์มีวแทนส์ ก่อนและหลังดื่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมโพรไบโอติกส์และน้ำ ภายในกลุ่มเดียวกันและระหว่างกลุ่ม

Multivariate Tests

Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
time Pilai's Trace	0.978	449.859	3.000	31.000	0.000
Wilks' Lambda	0.022	449.859	3.000	31.000	0.000
Hotelling's Trace	43.535	449.859	3.000	31.000	0.000
Roy's Largest Root	43.535	449.859	3.000	31.000	0.000

Mauchly's Test of Sphericity

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
time	0.484	23.041	5	0.000	0.762	0.821	0.333

Frequencies

		BefMilk	AftMilk	BefWater	AftWater
N		34	34	34	34
Mean		216.884	21.4118	235.8824	233.4412
Median		197.0000	19.5000	225.0000	229.5000
Std. Deviation		56.7641	9.9121	62.8711	61.4128
Percentiles	25	175.0000	14.7500	187.5000	190.0000
	75	261.0000	26.0000	292.0000	266.7500

Pairwise Comparisons

time(I)	time(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
1	2	195.471	10.147	0.000
	3	-19.000	14.701	1.000
	4	-16.559	16.271	1.000
2	1	-195.471	10.147	0.000
	3	-214.471	9.967	0.000
	4	-212.029	10.599	0.000
3	1	19.000	14.701	1.000
	2	214.471	9.967	0.000
	4	2.444	13.825	1.000
4	1	16.559	16.271	1.000
	2	212.029	10.599	0.000
	3	-2.441	13.825	1.000

ตาราง 12 ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีฟันผุ/อุด/ถอน (ซี), สภาวะปริทันต์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย และอัตราการไหลของน้ำลายขณะพัก กับจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ดั้งเดิม

Correlations

		DMFT	CPI	pH	Flowrate
BefMilk	Pearson Correlation	0.308	0.046	0.408	0.261
	Sig.(2-tailed)	0.076	0.797	0.017	0.137
	N	34	34	34	34



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ดรุณี ชุมโรย
วัน เดือน ปี เกิด	18 กันยายน 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดสุราษฎร์ธานี
วุฒิการศึกษา	ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนสุราษฎร์ธานี ระดับปริญญาตรี คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	229/6 หมู่ 1 ตำบลสีชล อำเภอสีชล จังหวัดนครศรีธรรมราช

