APPENDIX A

Microbiological Media

The formulas of the media used in the experiments in this thesis are listed in gram per liter of distilled water unless otherwise specified. Sterilization of the media is accomplished by autoclaving at 15 lb pressure for 15 minutes. Most of media are available commercially in powdered form, with specific instructions for their preparation and sterilization unless otherwise specified.

Brain-heart infusion (pH 7.4)*

Infusion from calf brain	200.0
Infusion from beef heart	250.0
Peptone	10.0
Dextrose	2.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5
Agar	1.0

Supplemented Brain-heart infusion (pH 7.4)

Infusion from calf brain	200.0
Infusion from beef heart	250.0
Peptone	10.0
Dextrose	2.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5
Agar	1.0
Yest extract	5 mg/mL

Note:

Mueller-Hinton agar (pH 7.4)*

Beef, infusion	300.0
Casamino acids	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0

Trypticase soy agar (pH 7.3)*

Trypticase	15.0
Phytane	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	15.0

Supplemented Blood agar (pH 7.3)

Trypticase	15.0
Phytane	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	15.0

Note: Dissolve the above ingredients and autoclave. Cool the sterile trypticase soy agar base to 45 ^{o}C to 50 ^{o}C. Aseptically add 50 ml of sterile human blood and ml of vitK and hemin solution. Mix thoroughly, avoiding accumulation of air bubbles. Dispense into sterile screw-tab tubes or Petri plates while liquid.

***** Commercially available from Difco and BBL.

(Modified from Cappuccino and Sherman, 2002)

APPENDIX B

Experimental microorganisms

To examine the susceptibility of an organism to antibiotics and tested samples, discs impregnated with the agents are place on the surface of an agar plate seeded with organisms being examined. The organism grows during incubation, but zones of no growth develop around the discs containing antibiotics that inhibit growth. The size of the zones of inhibition caused by the diffusion of the agent into the agar is directly related to the degree of susceptibility of the organism.

Inhibition zone size is affected by technical variables, including inoculation size, incubation time and temperature, medium composition, pH gaseous atmosphere and stability of the antibiotic of tested sample. Designated American Type Culture strains must be used routinely in the procedure to assure that all the variables in the procedure are controlled so that results are reproducible.

Procedure

1. Dip the sterile swab into the bacterial broth culture of standard density; then rotate it several times, with firm pressure on the inside wall of the tube above the fluid level, to remove excess inoculum's.
2. Streak the swab over the entire agar plate surface and repeat two more times, rotating the plate about 60 degrees to insure even distribution of inoculums. Replace plate top and allow 3-15 minutes for excess surface moisture to absorb.
3. Apply the tested disc to the surface with sterile forceps. Distribute the discs evenly (Fig.A-1). Gently press down each disc with the forceps t insures complete contact with agar surface.
4. Within 15 minutes after the disc are applied, incubate the plates at 37 ^{o}C.

5. After 18-24 hours of incubation, examine each plate and measure the diameter of the zones of complete inhibition.

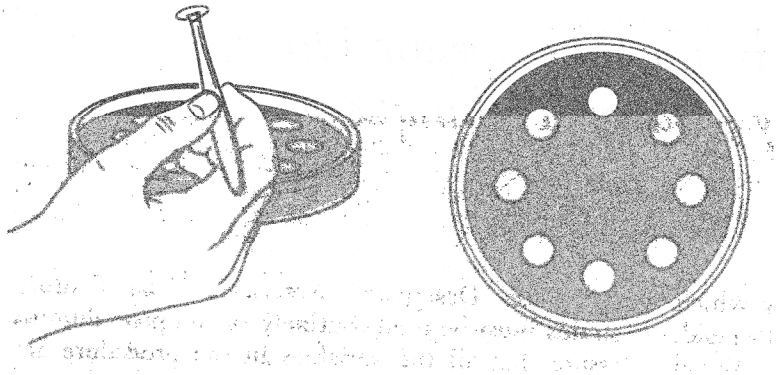


Figure A-1 Application of antibiotic disc or tested sample to test culture individually. (Adapted from Seeley and VanDemark, 1991)

Preparation for agar plates

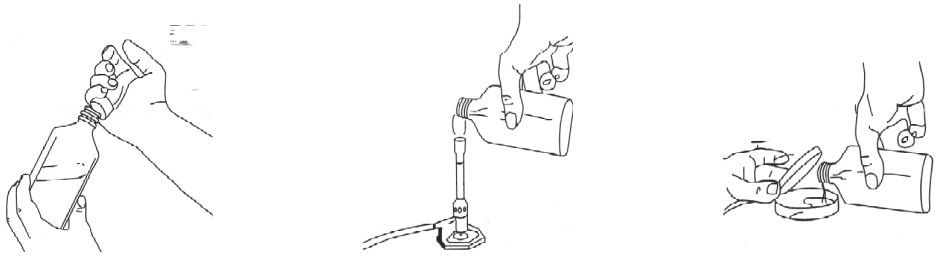
Agar is an excellent gelling agent since it has poor nutritional value and only few specialized marine bacteria digest it. It is usually at a concentration of 1.5% and added to nutrients to let microorganisms grow. A concentration of agar more than 1.8% gives a harder medium but provides less water for the growth, while a concentration of less than 1.0% will not completely solidify a medium.

Procedure

1. Place sterile Petri plates, lid side up, in front of you. Do not open the lids until you will pour a sterile agar.
2. Light a Bunsen burner.
3. Obtain a bottle of sterile agar from the 50oC water bath and gently swirl it several times to insure a homogeneous mixture.
4. Remove the cap of the bottle (Fig.A-2a).
5. Lightly pass the lip of the bottle through the open flame (Fig.A-2b). The lip of the bottle should already be sterile because it was autoclaved, but passing through the flame eiliminares any dust or cantaminants we may have introduced while unscrewing the cap.

6. Pour 18 ml of the agar into a plate (Fig.A-2c). Do not remove the Petri dish lid entirely, but tilt it slightly so that the lid shields the agar from airborne contaminants. Swir the plate gently so the agar covers the entire bottom of the plate.
7. After one plate is poured, reflame the lip as before and pour the second plate using the same procedure.
8. Allow the medium has solidified, invert each plate and label it with a felt-tipped marker or wax pencil. Each plates should have our name, date, and type of medium.

..



(a) (b) (c)

Figure A-2 Pouring a agar plate: (a) removing the bottle cap, (b) flaming the lip, and (c) pouring the agar. (Adapteded from Hudson and Sherwood, 1997)

Detection of bacteriocin

Deferred antagonism or indirect methods include the flip streak and the spot-on-the-lawn assays. In the flip-streak method, the putative sensitive organism is streaked perpendicular to it on the reverse side of the agar (which much be 'flipped'). For the spot-on-the –lawn method, the putative bacteriocin producer is spotted on an agar medium and a lawn of sensitive bacteria seeded over the resultant colony. A more direct assay is the well-diffusion assay. In this method, supernatants from putative bacteriocin-producing cultures are placed in well cut into agar seeded with a sensitive organism.

Lewus, C.B. and Montville, T.J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 13: 145-150.

APPENDIX C

Reagents

: Benedict solution

Dissolve 173 g trisodium citrate (dihydrate) and 100 g anhydrous sodium carbonate in 800 mL of warm distilled water (Solution A) (filtered, if necessary). Dissolve copper sulfate (pentahydrate) (17.3 g) separately in 200 mL of distilled water (Solution B). Then add solution B into solution A.

: Ninhydrin reagent

Formula I - Ninhydrin solution

Dissolve 200 mg of triketohydrindene hydrate in water to make 10 ml. The solution should be freshly prepared (USP, 1995).

Formula II - Ninhydrin spray

Dissolve 2 g of ninhydrin in acetone to make 1 L

Formula III - Ninhydrin spray

Saturate n-butanol with water by shaking 200mL of n-butanol with 200mL of deionized water in a separatory funnel. Discard the water phase (lower phase). Dissolve 200mg of ninhydrin reagent in saturated n-butanol containing 3% glacial acetic acid with stirring. Produces a clear, light yellow solution. Thoroughly mix the solution and pour into a sprayer.

A degree of ninhydrin colour stabilization can be achieved by spraying the visualized chromatogram sheet with the following solution: 1mL saturated aqueous copper nitrate solution dissolved by 0.2mL 10% nitric acid in 100mL ethanol (95%). The sheet is then exposed to ammonia vapours and a red complex is obtained. The colour is stable only in the absence of acid.

: Seliwanoff's reagent

Dissolve 0.5 g of resorcinol in 1L diluted HCl/H_2O (1:2, v/v). Store protected from light.

: Methylene blue indicator

$NaHCO_3$	400 g
Glucose	100 g
Methylene blue chloride	trace

Mix thoroughly immediately buffer. Use mixes about 2 g indicator and about 8 ml tap water in a test tube. The mixture should be light blue when oxidized and colorless when reduced.

: Amyloglucosidase assay (Glucoamylase Assay)

Amyloglucosidase from *Rhizopus* species with an enzymatic activity of 11600 U/g was supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). One unit is defined as the amount of enzyme liberating 1.0 mg glucose from starch in 3 min at pH 4.5 at 55OC or hydrolysis of 1.0 mg starch in 3 min at pH 4.5 at 55OC.

Enzyme preparation

Weight 1 g amyloglucosidase enzyme

Dissolve in 10 ml citrate buffer pH 4.5

Mix with vortex mixer

Put at room temperature for 10 min then centrifuge at 5000 rpm for 10 min

Keep supernatant, discard suspension

APPENDIX D

PROTOCOLS FOR PROTEOMICS

Montage In-Gel Digestion (Modified) for Stained 2-D Gel spots and Mass Spectrometric Analysis by 4700 MALDI Tof-Tof MS

The protocol for in-gel digestion employed is essentially the same, with only minor modifications, as that is supplied with the Montage Zip-plates by Millipore Singapore Pte Ltd., Singapore.
For detailed information and reference please refer to:
http://www.millipore.com/userguides.nsf/dda0cb48c91c0fb6852567430063b5d6/2265a5645f93475785256cbe00558a60/$FILE/P36505D.pdf

Chemicals and reagents:

Acetonitrile (HPLC grade) was from Merck, Darmstadt, Germany. Ethanol (AnalaR grade) was from VWR, Poole, UK. Water used was freshly drawn Milli-Q® water. Ammonium bicarbonate (>99%), and trifluoroacetic acid (TFA) (HPLC grade) were from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA. Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin) was from Promega, Madison, MI, USA. Montage (96-well format) In-gel Digestion Kits were from Millipore Singapore Pte Ltd., Singapore.

Preparation of Solutions:

NOTE: *All solutions, once prepared, can be stored at 2–8 ^{o}C for two months with the exception of the Trypsin Enzyme.*

CAUTION: *TFA is highly corrosive and volatile. Prepare TFA solutions in a fume hood.*

1. Buffer 1 [25mM ammonium bicarbonate (ABC) /5% acetonitrile]
2. Buffer 2 (25mM ABC / 50% acetonitrile)
3. Trypsin Re-suspension Solution (1 mM HCl) is supplied with Trypsin by Promega
4. Trypsin Buffer (25 mM ABC)
5. Trypsin Enzyme (Promega Sequencing Grade Modified Porcine Trypsin) comes in a dry form. *This solution must be kept on ice at all times and should be used as quickly as possible after being reconstituted.*
6. Extraction/Wash Solution (0.2% TFA)

7. Elution Solution (0.1% TFA/ 50% acetonitrile)

IN-GEL DIGESTION AND PEPTIDE EXTRACTION PROTOCOLS:

1. **Cutting 2-D stained gel protein spots:**

   Stained gel spots/bands are sliced in narrow pieces (1–2 mm diameter). Place the gel pieces into the ZipPlate wells.

2. **Washing and Dehydration:**

   1) Add 100 µL Buffer 1 to each well, incubate for 30 minutes.
   2) Remove the plate cover. Apply full vacuum (15–20" Hg). Release the vacuum once all the solution has been emptied from the wells.
   3) Add 100 µL Buffer 2 to each well, replace the plate cover, and incubate for 30 minutes and remove buffer. Repeat once.
   4) Add 200 µL of 100% acetonitrile to each well containing gel pieces, replace the plate cover, and incubate for 10 minutes. Apply full vacuum for 2 minutes to completely remove acetonitrile from the wells.

3. Trypsin digestion:

   5) Add 15 µL of the prepared Trypsin Solution (final concn.:11ng/ul in 25mM ABC buffer, made from the stock solution) to each well.
   6) Replace the plate cover. Incubate using either of the following conditions: a) 3 hours at 37 °C, or, b) overnight at 30 °C.

4. Extraction and Elution:

   7) Pipette 8 µL of 100% acetonitrile directly onto the resin or the bottom of the well. Do not add acetonitrile directly to the gel piece. Incubate for 15 minutes at 37 °C.
   8) Add 130 µL of Extraction/Wash Solution (0.2% TFA) to each well. Replace the plate cover and incubate at RT for 30 minutes. Apply <u>partial</u> vacuum (5-7" Hg). Release the vacuum once all the solution has been emptied from the wells.
   9) Add 100 µL of Extraction/Wash Solution. Apply full vacuum (15–20" Hg). Release the vacuum once all the solution has been emptied from the wells. Repeat once, Maintain vacuum for 5 additional minutes after all the wells are empty.
   10) Dispense 20 µL Elution Solution into the center of the wells containing gel pieces. Apply vacuum to elute peptides into a micro-titer plate.
   11) Peptide extracts are dried on a speed-vac at room temperature.

5. Spot sample on to the MALDI sample target plate:

12) Dried extract is re-dissolved in 1 µL of matrix solution [5 mg ml of a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 0.1% TFA, 50% ACN in MilliQ water].

13) All solution that can be pipetted out from the well is used to spot onto the MALDI target plate, and allowed to dry in air, prior to analysis by Mass Spectrometry

Mass Spectrometric Analysis

1. MS Instrument used: MALDI-Tof-Tof MS: 4700 Proteomics Analyzer, S/N 34700098 (purchased in January 2004) (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)
2. Instrument settings:

   Operation Mode: Reflector

   Delayed Extraction time: 25-1000 ns

   Instrument mode: Positive Ion mode

   Accelerating Voltage: 20000V

   Mass Range: 800 to 3500 M/z

   Laser power: 3400 for MS; 4200 for MS/MS

   Laser shot frequency: 200 Hz

   For MS mode: 1500 laser shots = 1 MS spectrum (50 shots /sub-spectrum)

   For MS/MS mode: 5000 laser shots = 1 MS/MS spectrum (50 shots /sub-spectrum)

   Collision Gas for CID: Nitrogen

   Collision Energy: 1KV

   Resolution for MS mode: approx 12000 – 20000

   Resolution for MS/MS mode: approx 2000 – 5000

3. The instrument was calibrated with the Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer Calibration Mixture

Applied Biosysytems 4700 Proteomics Analyzer Calibration Mixture			
Peptide	Charge state	Average mass	Monoisotopic mass
Des- Arg1-Bradykinin	+1	905.05	904.4681
Angiotensin I	+1	1297.51	1296.6853
Glu1-Fibrinopeptide B	+1	1571.61	1570.6774
ACTH (clip 1-7)	+1	2094.46	2093.0869

ACTH (clip 18-39)	+1	2466.72	2465.1989
ACTH (clip 7-38)	+1	3660.19	3657.9294

Data Processing Parameters:

Combined MS-MS/MS searches were conducted with the selection of following criteria:

a. Data Processing Software used: Data Explorer v 4.6 (Applied Biosystems)
b. S/N Ratio in MS/MS mode for peak identification: > 40
c. Search Engine used: MASCOT v 2.0 (Matrix Science Ltd., London, UK)
d. Mass Error: below 100ppm for MS; below 0.2 Da for MS/MS analysis
e. Using NCBInr Protein Database, selecting all entries, using the parent ion mass with an error tolerance of 100 ppm and MS/MS fragment mass tolerance of 0.2Da
f. With carbamidomethylation of cysteine (fixed modification) & methionine oxidation (variable modification).
g. Database used for searching: NCBInr. (updated every two weeks)

APPENDIX E

PERIODONTITIS CLASSIFICATION

Several distinct frorms of periodontal diseases have been described. For the purposes of simple approach, we followed this classification separated by Wilson et al., 1992 which are based on practical approaches to the treatment of these diseases.

Group I: chronic form of gingivitis and adult periodontitis

- chronic gingivitis
- chronic adult periodontitis (AP)

Mild AP	**Moderate AP**	**Severe AP**
	Clinical Presentation	
4 to 5 mm pocket probing depths (PD) Minimal or no furcation invasion (FI) Bleeding upon probing, supparation, or other signs of active disease present	5 to 6 mm PD early to moderate FI Bleeding, suppuration, or other signs of disease activity Often see fremitus or bidigital tooth mobility	7 mm (PD) vary from early to through-and-through Bleeding, suppuration, or other signs of disease activity Usually see fremitus and bidigital tooth mobility
	Radiographic Presentation	
no bone loss is apparent on the radiograph	A radiograph of the area in the clinical photograph, showing minimal apparent bony destruction	Severe bone loss is seen on the radiograph

Group II: other, less commonly seen forms of gingivitis

- acute necrotizing ulcerative (ANUG)
  - otherwise systemically healthy (Vincent's)
  - AIDS-associated (may progress to periodontitis)
- steroid hormone-influenced
- medication-influenced gingival overgrowth
- desquamative gingivitis
- other causes

Group III: more "aggressive" forms of periodontitis

- prepubertal periodontitis
  - localized
  - generalized
- localized juvenile periodontitis
- generalized juvenile periodontitis
- rapidly progressive periodontitis
- refractory periodontitis

Group IV: periodntitis associated with systemic diseases

- HIV-related
- Diabetes (type 1)
- Nutritional deficiency (scurvy, etc)
- Stress
- Papillon-LeFevre syndrome
- Down's syndrome

Group V: the conditions termed gingival recession

- localized
- generalized

Group VI: inflammation around dental implants, currently termed peri-implantitis

Wilson, T.G., Kornman, K.S., and Newman, M.G. 1992. Chapter five Diagnosis of periodontitis and conditions using a traditional approach, Advance in periodontits, Wilson, T.G., Kornman, K.S., Newman, M.G. (ed) Quintessence Publishing Co, 74-86.

APPENDIX F

ใบเชิญชวน

ขอเชิญเข้าร่วม "สารชีวสังเคราะห์จาก *Lactobacillus paracasei* HL32 เพื่อการควบคุม *Porphyromonas gingivalis* ในการก่อโรคปริทันต์"

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

ข้าพเจ้า ทพญ.กนกพร ปางสมบูรณ์ ใคร่ขอเล่าถึงโครงการวิจัยที่กำลังทำอยู่ และขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมโครงการนี้

ความเป็นมาของการวิจัย *ท่านอาจเป็นหรือมีโอกาสเป็นโรคปริทันต์อักเสบ (โรครำมะนาด) ซึ่งมีลักษณะดังภาพ (โปรดดูภาพประกอบความเข้าใจ) โรคนี้พบได้บ่อยในคนที่มีอายุตั้งแต่ 30 ปีเป็นต้นไป สาเหตุหลักเกิดจาก ติดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ในร่องเหงือก ทำให้เกิดร่องลึกปริทันต์ เมื่อท่านเป็นโรคนี้ คนในครอบครัวของท่านมีโอกาสเป็นโรคปริทันต์อักเสบ หมอฟันจะรักษา โดยการกำจัดเชื้อโรคที่อยู่ในร่องเหงือก อันได้แก่การขูดหินปูน/เกลารากฟัน การใช้ยาฆ่าเชื้อก็เป็นที่นิยม แต่เชื้อตัวนี้กำจัดยาก และปัจจุบันยังพบปัญหาเชื้อดื้อต่อยา จึงมีการพยายามพัฒนายาให้ออกฤทธิ์ดีขึ้น ดิฉัน ทพญ.กนกพร ปางสมบูรณ์ และคณะ ได้ศึกษาโปรตีนที่สามารถฆ่าเชื้อดังกล่าว แต่ยังขาดข้อมูลสำคัญอีก 3 ข้อมูล ข้อมูลแรก คือความคงตัวของโปรตีนเมื่อสัมผัสน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก ข้อมูลที่สอง คือความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยทดสอบกับเซลล์ที่ได้จากฟันและเหงือก โดยนำมาจากเนื้อเยื่อบริเวณฟันและร่องลึกปริทันต์ ข้อมูลที่สาม คือ การยึดติดและการกร่อนของเจลที่มีส่วนผสมของโปรตีน*

ประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย

1. เป็นการค้นพบยาใหม่ เพื่อพัฒนาการรักษาโรคปริทันต์
2. หากพบว่ายามีความคงตัวดี สามารถนำไปทำเป็นยาฆ่าเชื้อ
3. ลดโอกาสการเกิดโรคปริทันต์เรื้อรัง ชนิดรุนแรง

หากท่านเข้าร่วมโครงการท่านจะได้รับการ

1. สัมภาษณ์จำนวน 9 ข้อ เป็นเวลา 3 นาที เพื่อกรอกข้อมูลในแบบสอบถาม

2. ตรวจสุขภาพช่องปากเป็นเวลา 5 นาที

3. เก็บตัวอย่าง น้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก เนื้อเยื่อบริเวณรอบรากฟัน หรือ เนื้อเยื่อบริเวณร่องลึกปริทันต์ อย่างใดอย่างหนึ่ง ขึ้นกับสภาวะช่องปากของแต่ละบุคคล

4. ผู้วิจัยแจ้งผลภายหลังการตรวจสุขภาพช่องปากทันที โดยการมอบใบแจ้งผลการตรวจสุขภาพ

ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น *กรณีเกิดภาวะเลือดหยุดไหลช้าจากการหยั่งร่องลึกปริทันต์ สามารถใช้สารช่วยในการห้ามเลือด ซึ่งจะมีประจำอยู่ที่คลินิกทันตกรรม*

สิทธิประโยชน์ที่ผู้ถูกศึกษาจะได้รับ รับทราบข้อมูลการตรวจสุขภาพช่องปาก

ชื่อที่อยู่ของนักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย ทพญ. กนกพร ปางสมบูรณ์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 เบอร์โทรศัพท์ 01-5431433

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ธีระพล ศรีชนะ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 เบอร์โทรศัพท์ 074-288850

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.เสน่ห์ แก้วนพรัตน์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 เบอร์โทรศัพท์ 074-288840

เวลาที่ต้องเข้าร่วมโครงการ

ในอาสาสมัครปกติ อาสาสมัครที่ฟันถอนและอาสาสมัครที่เข้ารับการทำศัลยปริทันต์ ใช้เวลา 1 ครั้ง

ในอาสาสมัครโรคปริทันต์อักเสบและอาสาสมัครเหงือกปกติ ใช้เวลา 2 ครั้ง

ถ้าท่านตัดสินใจเข้าร่วมในโครงการนี้จะมีขั้นตอนของการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับท่านคือ ข้อที่.....

□ *1. กรณีเก็บน้ำเหลืองเหงือกและน้ำลาย* อาสาสมัครปกติจะได้รับการตรวจสุขภาพช่องปากเป็นเวลา 5 นาที ตอบแบบสอบถามจำนวน 9 ข้อ เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นผู้วิจัยจะเก็บน้ำลายด้วยวิธีบ้วนน้ำลายและเก็บน้ำเหลืองเหงือกด้วยกระดาษซับใช้เวลาประมาณ 15 นาที พร้อมแจ้งการตรวจสุขภาพช่องปากรวมใช้เวลา 25 นาที

□ *2. กรณีเก็บน้ำเหลืองเหงือกและน้ำลาย* อาสาสมัครโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังแบบรุนแรง จะได้รับการตรวจสุข-ภาพช่องปากเป็นเวลา 5 นาที ตอบแบบสอบถามจำนวน 9 ข้อเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นผู้วิจัยจะเก็บน้ำลายใช้เวลาประมาณ 10 นาที พร้อมแจ้งการตรวจสุขภาพช่องปาก หลังจากนั้นนัดหมายครั้งถัดไปอีก 2 อาทิตย์ เพื่อเก็บน้ำเหลืองเหงือกใช้เวลา 5 นาที

□ *3. กรณีเก็บเนื้อเยื่อบริเวณฟัน* อาสาสมัครตอบแบบสอบถามจำนวน 9 ข้อ เป็นเวลา 3 นาที นำฟันถอนมาขูดเนื้อเยื่อบริเวณรอบรากฟัน

□ *4. กรณีเก็บเนื้อเยื่อบริเวณร่องลึกปริทันต์* อาสาสมัครตอบแบบสอบถามจำนวน 9 ข้อ เป็นเวลา 3 นาที นำเนื้อเยื่อบริเวณร่องลึกปริทันต์ขนาดไม่เกิน 0.5x0.7 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น ที่จะต้องถูกตัดออกจากการทำศัลยปริทันต์ไปทำการแยกเซลล์

ไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้หรือไม่ ท่านจะยังคงได้รับการรักษาที่ดีเช่นเดียวกับผู้ป่วยคนอื่น ๆ และถ้าท่านต้องการที่จะถอนตัวออกจากการศึกษานี้เมื่อใด ท่านก็สามารถกระทำได้อย่างอิสระ

หากท่านมีคำถามใด ๆ ก่อนที่จะตัดสินใจเข้าร่วมโครงการนี้ โปรดซักถามคณะผู้วิจัยได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ทพญ.กนกพร ปางสมบูรณ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

หมายเหตุ :- กรุณาอ่านข้อความให้เข้าใจก่อนเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ

แบบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา

โครงการวิจัยเรื่องสารชีวสังเคราะห์จาก *Lactobacillus paracasei* HL32

เพื่อการควบคุม *Porphyromonas gingivalis* ในการก่อโรคปริทันต์

วันที่……..เดือน……พ.ศ…….

ข้าพเจ้า…….……..อายุ……ปี อาศัยอยู่ บ้านเลขที่……

ถนน……ตำบล……อำเภอ……..

จังหวัด……

ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว

หากข้าพเจ้าได้รับผลข้างเคียงจากการวิจัย ข้าพเจ้าจะปฏิบัติ ดังนี้…ติดต่อผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยนี้คือ 1. ทพญ.กนกพร ปางสมบูรณ์ สถานที่ติดต่อ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ เบอร์โทรศัพท์…01-5431433…หรือ...2. รศ.ดร.ธีระพล ศรีชนะ …สถานที่ติดต่อ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ เบอร์โทรศัพท์…074-288840 หรือเมื่อมีปัญหาใด ๆ เกิดขึ้นเนื่องจากการทำวิจัยในเรื่องนี้ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์ 074-28-7510

หากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบอย่างรวดเร็ว โดยไม่ปิดบัง

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะของดการเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยมิต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้าโดยการงดการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการได้รับบริการหรือการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับแต่ประการใด

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะที่เกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ จะไม่เปิดเผยข้อมูลหรือผลการวิจัยของข้าพเจ้าเป็นรายบุคคลต่อสาธารณชน จะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่าน/ได้รับการอธิบายข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ โดยนักวิจัยได้ให้สำเนาแบบยินยอมที่ลงนามแล้วกับข้าพเจ้าเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน จำนวน 1 ชุด

ลงชื่อ……ผู้ยินยอม

ลงชื่อ……หัวหน้าโครงการ

ลงชื่อ……พยาน

ลงชื่อ……พยาน

กลุ่มที่.....วันที่...../...../.....หมายเลข.....

แบบสอบถาม

โครงการวิจัยเรื่องสารชีวสังเคราะห์จาก *L. paracasei* HL32 เพื่อการควบคุม *P. gingivalis* ในการก่อโรคปริทันต์

1. อายุ..... ปี [1]

2. เพศ □$_1$ หญิง □$_2$ชาย [2]

3. อาชีพ □$_1$ รับราชการ □$_2$ค้าขาย □$_3$ รับจ้าง □$_4$ พนักงานบริษัท
□$_5$ พระสงฆ์ □$_6$ ประมง □$_7$ เกษตรกร..... □$_8$ อื่นๆ..... [3]

4. ศาสนา □$_1$ พุทธ □$_2$ คริสต์ □$_3$ อิสลาม □$_4$ พราหมณ์-ฮินดู [4]
□$_5$ ซิกข์ □ $_6$ อื่นๆ.....

5. การรักษาโรคปริทันต์
□$_1$ ไม่มี □$_2$ คำแนะนำการดูแลสุขภาพช่องปาก [5]
□$_3$ ขูดหินปูน/ เกลารากฟัน เมื่อ...../...../.....
□$_4$ ศัลยปริทันต์..... เมื่อ...../...../.....
□$_5$ อื่นๆ.....

6. ประวัติทางการแพทย์
□$_1$ ไม่รู้ □$_3$ โรคหัวใจ □$_4$ ความดันโลหิตสูง □$_5$ โรคเลือด
□$_2$ ไม่มีโรค □$_6$ โรคข้อ □$_7$ โรคไต..... □$_8$ โรคเบาหวาน [6]
□$_9$ โรคภูมิแพ้ □$_{10}$ โรคตับอักเสบ □$_{11}$ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง
□$_{12}$ วัณโรค □$_{13}$ แพ้..... □$_{14}$ ภาวะตั้งครรภ์
□$_{15}$ อื่นๆ.....

7. ประวัติทางทันตกรรมของครอบครัว
□$_1$ ไม่รู้ □$_3$ โรคปริทันต์ □$_4$ โรคฟันผุ [7]
□$_2$ ไม่มีปัญหา □$_5$ อื่นๆ.....

8. การดูแลสุขภาพช่องปาก
□$_1$ ไม่ได้ทำ □$_2$ อื่นๆ..... [8]
□$_3$ น้ำยาบ้วนปากชนิด...เมื่อ..... □$_4$ แปรงฟัน
ความถี่.....ครั้ง/..... ความถี่.....ครั้ง/.....

9. การสูบบุหรี่
□$_1$ ไม่มี □$_2$ มี ความถี่.....มวน/.....วัน/เดือน/ปี [9]
□$_3$ เลิก ระยะเวลาเลิก.....วัน/เดือน/ปี

(กรณีเก็บเนื้อเยื่อบริเวณฟันและร่องลึกปริทันต์ ทำถึงข้อ 9)

กลุ่มที่.....วันที่...../...../.....หมายเลข.....

10. การตรวจสุขภาพช่องปาก (บันทึกเฉพาะกลุ่มที่เก็บตัวอย่างน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก)

10.1 จำนวนฟันที่เหลือ.....ซี่

10.2 ดัชนีเหงือก □ ระดับ 0 □ ระดับ 1 □ ระดับ 2 □ ระดับ 3

10.3 ร่องลึกปริทันต์ และความวิการที่ช่องรากฟัน

ซี่ฟัน	ร่องลึกปริทันต์ (มม)								ความวิการที่ช่องรากฟัน	บริเวณที่เก็บน้ำเหลืองเหงือก ตำแหน่ง ≥ 7 มม/ ≤ 3 มม
	Bucccal			Proximal		Lingual				
	M	C	D	M	D	M	C	D		
16/17									1 2 3	
26/27									1 2 3	
13/23									-	.....MB/ML
36/37									1 2 3	.....MB/ML
46/47									1 2 3	.....MB/ML
11/21									-	
31/41									-	
……..									1 2 3	.....MB/ML

11. การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

ขั้นตอนและวิธีการ	ปริมาตร (มล)	อัตราไหล (มล/นาที)
1. น้ำลายในภาวะไม่มีการกระตุ้น เก็บเป็นเวลา 5 นาที		
2. น้ำลายในภาวะกระตุ้น โดยการเคี้ยวพาราฟินเป็นจังหวะ 1 นาที แล้วเก็บเป็นเวลา 5 นาที		

ลงชื่อ.....

(.....)

ทันตแพทย์ผู้ตรวจ

……

ใบแจ้งผลการตรวจสุขภาพช่องปากของ…….

ท่าน มี/ ไม่มี ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์ดังนี้

□ ประวัติทางการแพทย์……..

□ ประวัติทางทันตกรรม……..

□ การดูแลสุขภาพช่องปาก…….....

□ การสูบบุหรี่…….....

ท่าน มี/ ไม่มี โรคปริทันต์อักเสบ คือ……..

ท่าน มี/ ไม่มี ภาวะน้ำลายแห้ง