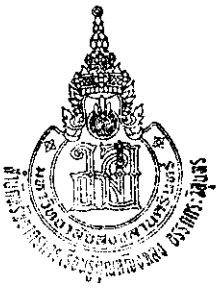


รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ แลคโตบาซิลลัสกับโรคฟันผุในเด็กเล็ก

***Lactobacillus* and Dental Caries in Young Children**

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. รวี เถียรไพศาล

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทรศัพท์ 074-429878 โทรสาร 074-212922 e-mail: rawee.t@psu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงชัย ฐิตโสมกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังคณา เธียรมนตรี

อาจารย์ ทญ. สุพัชรินทร์ พิวัฒน์

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทรศัพท์ 074-287601 โทรสาร 074-212922

ทุนสนับสนุน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2551

ล
WK306.C5
6
551

ตัวอย่าง

หมวดหมู่ WK 306 ร56 2551

Bib Key 321797

20 ก.ค. 2553

บทคัดย่อ

คำนำและวัตถุประสงค์: เชื้อกลุ่ม lactobacilli เป็นเชื้อที่ถูกกล่าวว่าสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุ จาการศึกษาในกลุ่มเด็กไทยที่จังหวัดสงขลา พบว่า lactobacilli มีความสัมพันธ์กับฟันผุ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) หาความสัมพันธ์ของชนิดสายพันธุ์ของกลุ่ม lactobacilli กับระดับความรุนแรงของฟันผุ 2) ศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม (genetic pattern) ของ lactobacilli ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับของโรคฟันผุต่าง ๆ กัน และ 3) ศึกษาความสามารถในการผลิตกรด (acidogenicity) ของเชื้อ lactobacilli สายพันธุ์ต่าง ๆ

วิธีการดำเนินการวิจัย: ประชากรศึกษาประกอบด้วยเด็กจำนวน 165 คน ได้รับการตรวจสภาวะฟันผุ และการตรวจหาเชื้อ lactobacilli โดยใช้อาหารคัดเลือกเชื้อ Rogosa การจำแนกชนิดของเชื้อ *Lactobacillus* ใช้วิธีของชีวโมเลกุลในการเพิ่มยีนของ 16S rRNA การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อใช้วิธี arbitrarily primed PCR ของเชื้อแต่ละชนิด และศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ

ผลการศึกษา: จากการศึกษาพบว่าการพบเชื้อ lactobacilli สัมพันธ์กับสภาวะฟันผุ กลุ่มเด็กที่มีฟันผุสูงมีระดับ lactobacilli มากกว่าเด็กที่มีฟันผุต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการจำแนกชนิดสายพันธุ์ *Lactoabcillus* พบความหลากหลายของชนิดสายพันธุ์ทั้งหมด 10 ชนิด *L. fermentum* เป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากที่สุด 83% ของเด็ก 59 คน ตามด้วย *L. salivarius* 25% เชื้ออื่น ๆ ที่เหลือเป็นเชื้อที่พบได้น้อย และมีเพียง *L. salivarius* เท่านั้น ที่พบสัมพันธ์กับฟันผุสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Lactoabacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบมีความหลากหลาย และมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันในแต่ละคน ในเด็กที่มีฟันผุมากจะพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ ได้มากกว่าเด็กที่มีฟันผุต่ำ ในการศึกษาความสามารถในการสร้างกรดของ *Lactobacillus* จำนวน 10 ชนิดสายพันธุ์ ที่แยกได้จากกลุ่มศึกษา พบว่า *L. salivarius L. rhamnosus L. plantarum* และ *L. casei* มีความสามารถในการสร้างกรดได้มาก

สรุป: ในการศึกษานี้บ่งชี้ความหลากหลายของชนิดและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Lactobacillus L. fermentum* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยและไม่สัมพันธ์กับโรคฟันผุ *L. salivarius* เป็นเชื้อที่พบได้มากในเด็กที่มีฟันผุสูง เด็กที่มีฟันผุมากจะพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Lactobacillus* หลากหลายได้มากกว่าเด็กที่มีฟันผุต่ำ ในการศึกษาความสามารถในการสร้างภรดของ *Lactobacillus* จำนวน 10 ชนิดสายพันธุ์ พบว่า *L. salivarius L. rhamnosus L. plantarum* และ *L. casei* มีความสามารถในการผลิตกรดได้ในเวลาอันสั้น สอดคล้องกับผลที่พบข้างต้นว่า *L. salivarius* เป็นเชื้อที่พบได้มากในเด็กที่มีฟันผุสูง เชื้อดังกล่าวน่าจะมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคฟันผุในเด็กไทย

บทนำ

โรคฟันผุ (dental caries) เป็นโรคที่มีการทำลายเนื้อเยื่อแข็งของฟัน โดยการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ซึ่งเกิดจากปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ตัวฟัน (host) เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ (agent) และ สิ่งแวดล้อม (environment) จากผลการสำรวจสภาวะโรคฟันผุในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2543-2544 พบว่า เด็กอายุ 3 ปี ซึ่งเป็นช่วงที่ฟันน้ำนมขึ้นครบ 20 ซี่ในปาก พบโรคฟันผุร้อยละ 65.7 โดยมีค่าเฉลี่ยฟันผุอุดถอน 3.6 ซี่ต่อคน[1] และจากผลการสำรวจในอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ใน พ.ศ. 2545 พบว่า เด็กอายุ 2 ปี เป็นโรคฟันผุมากถึงร้อยละ 84.5[2] โดยมีค่าเฉลี่ยฟันผุอุดถอน 5.3 ซี่ต่อคน ซึ่งจะเห็นว่าโรคฟันผุเป็นปัญหาที่สำคัญของเด็กไทยในปัจจุบันโดยเฉพาะในภาคใต้

โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญ ในปี 1924 Clark[3] ได้ค้นพบแบคทีเรียจากรอยโรคของฟันที่ผุในมนุษย์ เป็นเชื้อชนิดย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์เรียงเป็นสาย คล้าย streptococci ทั่วไป แต่รูปร่างมีลักษณะเป็นแท่งสั้น ๆ มากกว่าจะเป็นทรงกลมจึงตั้งชื่อว่า *Streptococcus mutans* และต่อมามีหลักฐานที่ยืนยันว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดฟันผุ คือ กลุ่ม mutans streptococci ประกอบด้วยเชื้อหลายสปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคฟันผุในมนุษย์ คือ *S. mutans* อยู่ใน serotype c e และ f และ *Streptococcus sorbinus* อยู่ใน serotype d และ g[4]

กลุ่มเชื้อ lactobacilli เป็นเชื้อจุลชีพอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิดฟันผุเนื่องจากความสามารถในการผลิตกรด (acidogenic) จากอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตและความสามารถในการมีชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (acid tolerant) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่นที่ทนต่อกรดได้น้อยกว่า และนำไปสู่การทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเชื้อจุลชีพในคราบจุลินทรีย์ในเวลาต่อมา[5] รายงานส่วนใหญ่มักแสดงถึงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Streptococcus mutans* ในการเป็นเชื้อชนิดแรกที่เกาะบนผิวฟัน (primary colonizer) และพัฒนาให้เกิดรอยโรคฟันผุเริ่มแรก ในขณะที่กลุ่มเชื้อ lactobacilli จะถูกรายงานว่าสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุชนิดลุกลาม เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตกรดจำนวนมากและสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะ pH ที่เป็นกรดได้ดี รวมถึงความสามารถในการมีชีวิตอยู่ในบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำได้[5] อย่างไรก็ตามการกล่าวถึง lactobacilli กับการเกิดฟันผุนั้นมักจะระบุชนิดของเชื้อเป็นกลุ่มในระดับจีนัสเท่านั้น การศึกษาที่ระบุชนิดของสปีชีส์ของเชื้อ *Lactobacillus* ที่ทำให้เกิดฟันผุยังมีอยู่เป็นจำนวนน้อย สาเหตุจากความจำกัดในการหาวิธีที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษา

มีรายงานแยกเชื้อ lactobacilli ได้จากรอยผุของฟันกรามแท้ โดยพบว่าเนื้อฟันที่ผุซึ่งมีลักษณะนิ่มสีเหลืองและน้ำตาลอ่อนนั้นจะประกอบด้วยเชื้อ gram-positive rods ถึงร้อยละ 70 ซึ่งจะเป็นกลุ่มเชื้อ lactobacilli ในปริมาณร้อยละ 50 ของโคโลนีทั้งหมด[6] และในการศึกษาของ Marchant และคณะซึ่งเปรียบเทียบเชื้อจุลชีพจากเนื้อฟันรอยผุของเด็กเล็กที่มีฟันผุจากนม (nursing caries) กับจุลชีพจากคราบจุลิ

นทรีย์ของเด็กที่ไม่มีฟันผุ พบว่าสัดส่วนของเชื้อ *Lactobacillus* species ในตัวอย่างเนื้อฟันที่ผุจะสูงกว่าในคราบจุลินทรีย์ของเด็กที่ไม่มีฟันผุอย่างมีนัยสำคัญ สปีชีส์เชื้อ *Lactobacillus* ที่ถูกแยกได้บ่อยได้แก่ *L. casei, L. fermentum* และ *L. rhamnosus*[7] ในขณะที่ Martin และคณะได้รายงานว่าเชื้อ *Lactobacillus* species (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. acidophilus*) เป็นเชื้อ gram positive bacteria ที่พบมากที่สุดในรอยผุที่ยังแสดงอาการตอบสนองของประสาทฟัน[8]

นอกจากนี้ Nancy และ Dorignac ได้ระบุว่า เชื้อ lactobacilli ที่พบในเนื้อฟันที่ผุนั้นมีความสัมพันธ์กับเชื้อ lactobacilli ที่อยู่ในน้ำลาย เนื่องจากจะสามารถตรวจพบจำนวนของฟันผุสูงในคนที่มีจำนวนของเชื้อ lactobacilli ที่อยู่ในน้ำลายมากเมื่อเทียบกับคนที่มีเชื้อนี้ในน้ำลายน้อย[9] ซึ่งสอดคล้องกับ Radford และคณะที่รายงานว่าสามารถพบเชื้อ lactobacilli ได้มากในน้ำลายของเด็กทารกที่มีฟันผุมากกว่าในเด็กที่ไม่มีฟันผุอย่างมีนัยสำคัญ[10] เช่นเดียวกับการศึกษาของ Barsamian-Wunsh และคณะ ที่แสดงถึงการที่พบเชื้อ lactobacilli ในเด็กเล็กกลุ่มที่มีฟันผุสูงกว่าเด็กเล็กกลุ่มไม่มีฟันผุได้อย่างมีนัยสำคัญ และการศึกษานี้ได้ระบุว่าระดับของเชื้อ lactobacilli ที่บ่งชี้ถึงการทำนายว่ามีฟันผุในเด็กเล็กคือ 10^3 CFU/มิลลิลิตร แม้ว่ารายงานอื่นได้เสนอว่าจำนวนของเชื้อนี้ในน้ำลายที่แสดงถึงการมีความเสี่ยงในการเกิดฟันผุคือ 10^5 CFU/มิลลิลิตร[11] นอกจากนี้มีรายงานว่าจำนวนของ lactobacilli ในน้ำลายยังเป็นตัวสะท้อนถึงการรับประทานอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างหนึ่งของโรคฟันผุด้วย[12, 13] ดังนั้น Harris และคณะ จึงได้สรุปจากการรวบรวมวรรณกรรมเรื่องปัจจัยเสี่ยงของการเกิดฟันผุในเด็กเล็กว่า การที่มีเชื้อ *Lactobacillus* ตั้งแต่อายุน้อยๆ จะเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีนัยสำคัญต่อการเกิดฟันผุ ร่วมไปกับการที่มีเชื้อ *Streptococcus mutans*[14] มีหลายการศึกษาที่นำเอาปริมาณกลุ่มเชื้อ lactobacilli มาใช้เป็นปัจจัยทำนายการเกิดโรคฟันผุ (caries predictor) ตัวหนึ่ง โดย Powell ได้สรุปว่า ระดับของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ lactobacilli ในน้ำลายจัดเป็นปัจจัยทำนายการเกิดโรคฟันผุที่มีความเหมาะสมในระดับปานกลางเมื่ออยู่ใน caries predictor model[15]

จากการศึกษาโครงการวิจัยระยะยาวในการติดตามสุขภาพในช่องปากที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ทีมวิจัยได้สุ่มเลือกเด็กจำนวน 165 คน มาศึกษาในส่วนของเชื้อแบคทีเรีย lactobacilli ในเด็กตั้งแต่แรกคลอด ทำให้เข้าใจรูปแบบ (pattern) ของการ colonization ของเชื้อแบคทีเรีย lactobacilli ดีขึ้น โดยพบว่ารูปแบบความชุกของเชื้อ lactobacilli มีความน่าสนใจโดยช่วง 3 เดือนแรกของอายุเด็กมีโอกาสตรวจพบเชื้อ lactobacilli สูงถึงร้อยละ 26.7 และในจำนวนนั้นมีถึงร้อยละ 10 ที่มีเชื้อมากกว่า 100 CFU/1.5 cm^2

เมื่อหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างฟันผุและปริมาณเชื้อ lactobacilli ในน้ำลาย ของเด็กที่อายุ 9 เดือน และ 12 เดือน พบว่า Lactobacilli มีความสัมพันธ์กับฟันผุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยฟันผุและจำนวน lactobacilli ระดับต่าง ๆ ของเด็กที่อายุ 9 และ 12 เดือน

ปริมาณเชื้อ Lactobacilli (CFU/1.5 cm)	อายุ 9 เดือน			อายุ12 เดือน		
	จำนวน	ค่าเฉลี่ยฟันผุ	SD	จำนวน	ค่าเฉลี่ยฟันผุ	SD
0	68	.002	.242	80	1.100	2.270
1 - 10	7	.571	1.511	17	1.000	2.549
11 – 99	5	.000	.000	8	2.250	3.284
100+	4	.000	.000	5	7.400	7.733
รวม	84	.007	.485	110	1.454	3.061
ANOVA $p<0.01$				ANOVA $p<0.01$		

ผลจากการศึกษาข้างต้น จะเห็นได้ว่าเด็กไทยมีอุบัติการณ์ของเชื้อ lactobacilli สูงและสัมพันธ์กับโรคฟันผุที่พบสูงตั้งแต่ขวบปีแรก นอกจากนี้ยังพบว่าเด็กที่ถูกตรวจพบเชื้อ lactobacilli ในน้ำลายได้ช้ากว่า (หลังอายุของเด็กเป็น 13 เดือน) จะมีแนวโน้มที่มีฟันผุน้อยกว่า (เด็กที่พบเชื้อก่อน 13 เดือน) และที่สำคัญคือเด็กที่ไม่พบเชื้อ lactobacilli ในน้ำลาย จะมีฟันผุต่ำกว่าเด็กที่พบเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) [16]

อย่างไรก็ตามกลไกการก่อโรคของ lactobacilli ไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน สันนิษฐานว่าเชื้อกลุ่มนี้คงมีความสามารถในการสร้างกรดและมีความสามารถในการทนกรดได้ดีเช่นเดียวกับ *Streptococcus mutans* สาเหตุสำคัญของโรคฟันผุ จึงทำให้พบ lactobacilli สูงสัมพันธ์กับรอยโรคฟันผุ ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งคือ ที่ผ่านมาการระบุชนิดของสายพันธุ์ lactobacilli ไม่สามารถทำได้ง่าย เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มใหญ่ประกอบด้วยชนิดสายพันธุ์ (species) มากกว่า 10 สายพันธุ์ในช่องปาก ข้อจำกัดในการหาวิธีที่เหมาะสมมาใช้ในการจำแนกชนิด ทำให้ที่ผ่านมาการรายงานผลจึงมักรายงานเป็นกลุ่มของ lactobacilli โดยไม่ระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจน ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าสายพันธุ์ใดเป็นสายพันธุ์ก่อโรค ดังนั้นในการศึกษาการกลไกการก่อโรคจึงไม่สามารถทำได้เช่นกัน หากการระบุสายพันธุ์ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์จะนำวิธีทางชีวโมเลกุล ที่พัฒนาขึ้นที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ และได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว[17] มาใช้ในการศึกษาชนิดสายพันธุ์ของ lactobacilli วิธีดังกล่าวมีข้อดีคือสามารถนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อที่ต้องการศึกษาจำนวนมาก

จะมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ทำงานง่ายกว่าวิธี DNA sequencing แม้ว่าจะมีค่า accuracy น้อยกว่าก็ตาม นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกลุ่มเชื้อ lactobacilli เพื่อระบุสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ชัดเจน

.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อ

1. หาความสัมพันธ์ของชนิดสายพันธุ์ของกลุ่ม lactobacilli กับระดับความรุนแรงของฟันผุ
2. ศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม (genetic pattern) ของ lactobacilli ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับของโรคฟันผุต่าง ๆ กัน
3. ศึกษาความสามารถในการผลิตกรด (acidogenicity) ของเชื้อ lactobacilli สายพันธุ์ต่าง ๆ

วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างศึกษา

สถานที่ศึกษาเป็นอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา การศึกษาได้รับการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในคน ของกระทรวงสาธารณสุข เด็กอายุระหว่าง 2-5 ปี จำนวน 165 คน จากการสุ่มได้รับการเชิญชวนให้เข้าร่วมในการศึกษา โดยได้รับความยินยอมจากผู้ปกครอง เด็กที่เข้าร่วมโครงการทุกคนจะได้รับการตรวจและบันทึกค่าจำนวนของซี่ฟันที่ผุ (dt) และ ค่าจำนวนด้านของซี่ฟันที่ผุ (ds) ตามเกณฑ์ของ WHO[18]. และได้รับการตรวจหาเชื้อ lactobacilli

ตัวอย่างเชื้อ lactobacilli

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบคทีเรียที่แยกจากน้ำลาย ซึ่งทำการเก็บเชื้อด้วยวิธี spatula method[19] โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective media) Rogosa SL agar สำหรับเชื้อ lactobacilli อาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกเตรียมในจานเพาะเลี้ยงชนิดพิเศษแบบ contact petri-dish จานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะมีตารางบ่งบอกพื้นที่ที่เชื้อแบคทีเรียขึ้น การตรวจเชื้อในน้ำลายเด็กทำโดยใช้ไม้ไอติมขนาดกว้าง 1.8 นิ้ว แตะน้ำลายในช่องปากเด็กหรือแม่ผู้ดูแลเด็ก และทาบไม้นั้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มเพาะจานเลี้ยงเชื้อนั้นที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในภาชนะเลี้ยงเชื้อที่มีก๊าซผสมคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 10 ไฮโดรเจนร้อยละ 10 และไนโตรเจน ร้อยละ 80 นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในพื้นที่นับ 1.5 ตารางเซนติเมตร

ทำการตรวจสอบเชื้อเบื้องต้นโดยศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงแบบวุ้นชนิด Rogosa SL agar การย้อมสีแกรมเป็นเชื้อแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และผลการทดสอบคะตะเลสเป็นลบ (catalase negative) หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะถูกทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียในแต่ละ plate จำนวน 4-10 สายพันธุ์ จากอาหารเลี้ยงเชื้อของเด็กที่เชื้อมากกว่า 5 โคโลนีขึ้นไป และเก็บเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ในการนำเชื้อแบคทีเรียมาใช้นั้น จะนำแบคทีเรียที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk มาทำการเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Rogosa SL agar ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่บรรยากาศ 10% H_2 , 10% CO_2 และ 80% N_2 เป็นระยะเวลา 2-3 วัน โดยที่ตัวอย่างแบคทีเรียจะถูกยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าเป็นเชื้อ lactobacilli จากการสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rogosa SL agar โดยจะมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น การย้อมสีแกรม เป็นเชื้อแกรมบวก

การสกัดดีเอ็นเอของ lactobacilli

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอดัดแปลงมาจากวิธีของ Gevers และคณะ[20] กล่าวคือ นำเซล์ล์แบคทีเรีย จำนวน 1 plate มาปั่นล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตรและเก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นล้างเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งใน TES buffer pH 8.0 ซึ่งประกอบด้วย 6.7% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติม STET buffer ประกอบด้วย 8% sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA ปริมาตร300 ไมโครลิตรและผสมให้เข้ากัน (vortex) แล้วเติม lysis buffer ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารละลาย TES buffer ที่ผสม mutanolysin ความเข้มข้น 1330 U/มิลลิลิตร และ lysozyme 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน และเติม 20% SDS ใน TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C ปริมาตร 40 ไมโครลิตรและเม็ดแก้ว (glass beads) แล้วผสมให้เข้ากันนาน 60 วินาที หลังจากนั้นจึงนำไปอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 37°C และ 65°C เป็นระยะเวลา 30 นาทีและ 20 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนที่ผ่านการย่อย (lysate) มาแล้วจะถูกทำให้ตกตะกอนออกมาด้วยการเติม phenol/chloroform/isoamylalcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของส่วนผสมเดิม และปั่นแยก (centrifuge) ที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงปั่นแยกส่วนน้ำ (aqueous phase) ออกมาประมาณ 400 ไมโครลิตรเพื่อผสมกับ 5 M โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 70 ไมโครลิตรและ isopropanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นให้ดีเอ็นเอตกตะกอนขณะที่แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที จึงปั่นแยกดีเอ็นเอที่ 12,000xg นาน 10 นาที และล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น 1 ครั้ง

ละลายตะกอน DNA ที่ได้ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 250 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 60°C และเติม 1.4 M โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 250 ไมโครลิตรและ 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรตามลำดับ นำสารละลายที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที จากนั้นสารละลายดังกล่าวจะถูกสกัดอีกครั้งด้วย phenol/chloroform/isoamylalcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (หรือ 1 เท่าของส่วนผสมเดิม) แล้วจึงแยกส่วนเหลวออกมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปริมาตร1 มิลลิลิตร โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แล้วปั่นที่ 12,000xg นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol

นำตะกอน DNA ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNAase A ความเข้มข้น10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อย่อยส่วน RNA ที่อาจปนอยู่ โดยทิ้งให้เอนไซม์ทำงานที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย absolute ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตรหรือ 1 เท่าของปริมาตรรวมจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงหรือครึ่งวัน และปั่นล้างด้วย 70% ethanol อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นทิ้ง

ให้ดีเอ็นเอที่ได้แห้งสนิทก่อนทำละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

การจำแนกชนิดสปีชีส์ของเชื้อ *Lactobacillus* ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene PCR-RFLP

การจำแนกชนิดสปีชีส์ของเชื้อ *Lactobacillus* ด้วยวิธี 16S rRNA gene PCR-RFLP ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นวิธีของ Teanpaisan และ Dahlén[17] โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences) ของยีน 16S rRNA จะถูกขยาย (amplified) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers คือ 8UA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') และ 1492 R (5'-TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T-3') ซึ่งสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ปริมาตร 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย ultrapured de-ionized water ปริมาตร 11.5 ไมโครลิตร สารละลาย 10xbuffer 2.5 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 mM, Taq DNA polymerase 1 unit สารละลาย dNTP 0.2 mM, primer ชนิดละ 1 ไมโครโมล และ DNA template 2 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาการขยายยีนจะใช้เครื่อง thermocycler PCR System 2400 (Applied Biosystem, Foster City, CA) โดยจะใช้สภาวะการขยายยีนดังนี้ initial heat activation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 35 รอบของปฏิกิริยาคือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1.5 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการแล้ว ผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่ได้ จะถูกนำมาย่อย (digest) ด้วยเอนไซม์ *Hpa* II หรือ *Hae* III (New England Biolab, Ipswich, MA) ตามคำแนะนำของบริษัท กล่าวคือ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาผสมกับ 10Xbuffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรและเอนไซม์ 1 unit จากนั้นทิ้งให้เอนไซม์ทำงานที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ปริมาตร 12 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 7.5% TBE-polyacrylamide gel ร่วมกับ DNA ladder EZ load 100 bp แล้วย้อมสี silver nitrate staining เจลที่ได้จะถูกนำมาเก็บภาพด้วยเครื่อง scanner แล้วทำการอ่านผลโดยการเปรียบเทียบรูปแบบของยีนของตัวอย่างกับรูปแบบของยีนของ 13 สายพันธุ์มาตรฐานด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop version 7.0

สายพันธุ์ *Lactobacillus* มาตรฐานที่ใช้อ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 3456), *Lactobacillus casei* (CCUG 31610), *Lactobacillus crispatus* (ATCC 33820), *Lactobacillus curvatus* (ATCC 25601), *Lactobacillus delbrueckii* (ATCC 9649), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 14931), *Lactobacillus gasseri* (ATCC 33323), *Lactobacillus paracasei* (CCUG 32212), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 33624), *Lactobacillus*

rhamnosus (ATCC 7469), *Lactobacillus salivarius* (ATCC 11741) และ *Olsenella uli* (CCUG 31166) (เดิมคือ *Lactobacillus uli*)

(CCUG: Collection of the Department of Oral Microbiology, The Sanhlgrenska Academy at Goteborg University, Goteborg, Sweden; ATCC: American Type Culture Collection)

การจำแนกชนิดของเชื้อ *Lactobacillus* โดยการศึกษารูปแบบของโปรตีนจากเซลล์ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE of whole cell protein)

เนื่องจาก RFLP patterns ระหว่างเชื้อ *L. casei* และ *L. rhamnosus* และระหว่างเชื้อ *L. acidophilus* และ *L. crispatus* นั้นไม่สามารถแยกจากกันได้ ด้วยวิธี 16S rRNA gene PCR-RFLP ดังนั้นจึงต้องใช้เทคนิค SDS-PAGE[17] เพื่อแยกชนิดของเชื้อดังกล่าวออกจากกันดังนี้

นำเชื้อ lactobacilli ที่โตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rogosa SL agar เป็นระยะเวลา 2-3 วัน มาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำตะกอนที่ได้มาเติม 0.1 M PBS pH 7.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยการ sonicate ที่ 30-60 amplitude เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงผสมสารแขวนลอยที่ได้นั้นมากับ SDS sample buffer (0.125 M Tris buffer pH6.8, 4% SDS, 10% ß-mercapto-ethanol, 20% glycerol, 0.002% bromphenol blue) ในปริมาตรที่เท่ากัน (300 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มเป็นระยะเวลา 5 นาที

จากนั้นนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่ได้มาผ่านกระบวนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 12% SDS-polyacrylamide gel ร่วมกับ protein marker ของบริษัท BioRad ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 200 กิโลดาลตัน แล้วทำการย้อมสี coomasie blue และทำการเก็บภาพโดยเจลที่ได้จะถูกนำมาเก็บภาพด้วยเครื่อง scanner แล้วทำการอ่านผลโดยการเปรียบเทียบรูปแบบของตัวอย่างกับรูปแบบของสายพันธุ์มาตรฐานข้างต้นด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop version 7.0 เช่นเดียวกับเทคนิค 16S rRNA gene PCR-RFLP

การศึกษาลักษณะของยีนของเชื้อ *Lactobacillus* จากแม่และลูกคู่เดียวกันด้วยเทคนิค arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)

เทคนิค AP-PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวิธีของ Matsumiya และคณะ[21] โดยลำดับของดีเอ็นเอ (DNA sequences) จะถูกขยายด้วยเทคนิค arbitrarily primed PCR โดยใช้ random primers คือ ERIC1R: 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' และ ERIC2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' สารที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR (reaction mixture) ปริมาตร 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย ultrapure de-

ionized water ปริมาตร 14 ไมโครลิตร สารละลาย 10xbuffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 mM, Taq DNA polymerase 2.5 unit primer ชนิดละ 1 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP 0.2 mM และ DNA template 2 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยา PCR ใช้เครื่อง thermocycler PCR System 2400 (Applied Biosystem, Foster City, CA) โดยจะใช้โปรแกรมการทำ PCR จำนวน 35 รอบซึ่งแต่ละรอบมีขั้นตอนคือ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 74°C เป็นเวลา 2 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 74°C เป็นเวลา 10 นาที

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ของ PCR (PCR product) แล้วจะนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาผ่านกระบวนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 7.5% TBE-polyacrylamide gel ร่วมกับ DNA ladder EZ load 100 bp แล้วย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน TBE buffer) ก่อนนำเจลมาทำการเก็บภาพภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet light) ซึ่งภาพถ่ายของเจลที่ได้จะถูกนำมาทำการอ่านผลโดยการเปรียบเทียบ banding pattern ระหว่างสายพันธุ์จากแม่และลูก (แม่และลูกคู่เดียวกัน) ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop version 7.0

การศึกษาความสามารถในการผลิตกรด (acidogenicity) ของเชื้อ lactobacilli สปีชีส์ต่างๆ

สุ่มตัวอย่างเชื้อ lactobacilli ที่พบในช่องปากของเด็กกลุ่มศึกษา สปีชีส์ละ 2-4 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้อ้างอิงในแต่ละสปีชีส์ รวมทั้งหมด 32 สายพันธุ์ จาก 10 สปีชีส์ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 50 ml ที่มีน้ำตาล dextrose ผสมอยู่ 2% เป็นเวลาข้ามคืน(overnight) เก็บตะกอนเซลล์ โดยการปั่น ละลายตะกอนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 50 ml ให้ได้ความเข้มข้น OD (optical density) เท่ากับ 1 ที่ความยาวคลื่น 650 nm ปรับค่าความเป็นกรด ด่างไปที่ pH 7 เพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่บรรยากาศ 10% H_2 , 10% CO_2 และ 80% N_2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่า pH โดยเครื่อง pH meter (Hanna pH211 Microprocessor pH meter, Hanna Instrument, UK) วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่า OD โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (UV/visible spectrophotometer, Pharmacia Limited, UK) และทำการเก็บเชื้อครั้งละ 2 ml เพื่อหา viable cell count ที่เวลา 0, 1.5, 3, 5, 7, 24 ชั่วโมง และทำซ้ำ 2 ครั้ง

การวิเคราะห์ข้อมูล

กลุ่มเด็กจะถูกจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามจำนวนซี่ฟันที่ผุ (dt) โดยกลุ่มฟันผุต่ำ (low-caries) มีค่า dt ระหว่าง 0-4, กลุ่มฟันผุปานกลาง (low-caries) มีค่า dt ระหว่าง 0-4, กลุ่มฟันผุปานกลาง (moderate-caries)

มีค่า dt ระหว่าง 5-10 และ กลุ่มฟันผุสูง (high-caries) มีค่า dt มากกว่า 10 จำนวน lactobacilli ถูกจัดกลุ่มเป็น 0 CFU/1.5 cm^2, 1-10 CFU/1.5 cm^2 และ >10 CFU/1.5 cm^2 การประเมินความสัมพันธ์ของระดับ lactobacilli ชนิดของสายพันธุ์ lactobacilli และ genotypes กับความรุนแรงของฟันผุโดย Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test การกระจายของชนิดสายพันธุ์และ genotypes ของ lactobacilli และสภาวะฟันผุ ใช้ χ^2-test และ Fisher's exact test นัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

การประเมินความสามารถในการผลิตกรด (acidogenicity)ของเชื้อ lactobacilli สปีชีส์ต่างๆ โดยการเปรียบเทียบ ค่า pH ที่เวลาต่างๆ และเทียบค่าพื้นที่ใต้กราฟ pH ซึ่งคำนวนโดยใช้ โปรแกรม ImageJ การเจริญเติบโตของแต่ละสปีชีส์ประเมินโดย ค่า OD ที่เพิ่มขึ้น และ ร้อยละของอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งคำนวณจาก จำนวนเซลที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา ต่อค่าแฉลี่ยจำนวนเซลx100 ความแตกต่างของความสามารถในการผลิตกรด และ การเจริญเติบโตของแต่ละสปีชีส์ทดสอบโดยสถิติ ANOVA ทดสอบความแตกต่างของความแปรปรวนโดย Levene's test และใช้ Dunnett T3 ในการทดสอบในแต่ละคู่สปีชีส์ โดยมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

ความสัมพันธ์ของ lactobacilli และสภาวะฟันผุ

อายุเฉลี่ยของเด็กในกลุ่มศึกษา 165 คน เป็น 2.2 ± 0.8 ปี มีค่าเฉลี่ยของจำนวนซี่ฟันและด้านที่ผุเป็น 5.7 ± 4.8 และ 12.3 ± 13.3 ตามลำดับ เด็กร้อยละ 55.8 ตรวจพบเชื้อ lactobacilli ในน้ำลาย และพบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ lactobacilli และจำนวนซี่/ด้านฟันที่ผุ ($P < 0.001$) ระดับของ lactobacilli ในกลุ่มเด็กผุปลานกลาง-สูง (dt > 4) มีมากกว่ากลุ่มเด็กผุต่ำ ($P < 0.001$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของซี่ฟัน/ด้านที่ผุ และความชุกของ lactobacilli ในกลุ่มฟันผุต่ำ (dt ≤ 4, n = 84) และกลุ่มปานกลาง-สูง (dt > 4, n = 81)

Lactobacilli	Mean ± SD ของฟันผุ		จำนวนเด็ก (%)	
(CFU/1.5cm^2)	ซี่ฟัน	ด้าน	กลุ่มผุต่ำ	กลุ่มผุปานกลาง-ผุสูง
0	3.9 ± 3.5	7.7 ± 8.7	49 (58.3)	24 (29.6)
1 to 10	6.2 ± 4.9	12.7 ± 13.7	20 (23.8)	25 (30.9)
>10	8.2 ± 5.4	19.0 ± 15.8	15 (17.9)	32 (39.5)
P-values	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001#	

* Kruskal-Wallis Test

Chi-square Test

ชนิดสายพันธุ์ของ lactobacilli และสภาวะฟันผุ

จำนวนสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 357 สายพันธุ์แยกได้จากเด็ก 59 คน การกระจายของชนิดสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* และสภาวะฟันผุ ดังตารางที่ 3 พบ *L. fermentum* เป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากที่สุด 83% ของเด็ก 59 คน ตามด้วย *L. salivarius* 25% เชื้ออื่น ๆ ที่เหลือเป็นเชื้อที่พบได้น้อย เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อและสภาวะฟันผุ พบว่ามีเพียง *L. salivarius* ที่พบสัมพันธ์กับฟันผุสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.01$) กล่าวคือ *L. salivarius* พบได้มากในกลุ่มเด็กที่ฟันผุปานกลางถึงสูง 35.9% ในขณะที่พบได้ 5% ในกลุ่มเด็กฟันผุต่ำ ส่วนเชื้ออื่น ๆ ไม่พบความสัมพันธ์กับสภาวะฟันผุ *L. fermentum* เป็นชนิดสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยมากกว่า 80% ในทั้งสองกลุ่ม *L. plantarum* และ *L. mucosae* พบได้ในกลุ่มฟันผุปานกลางถึงสูง ในขณะที่ *L. gasseri*, *L. vaginalis* และ *L. oris* พบได้ในกลุ่มฟันผุต่ำ อย่างไรก็ตามไม่สามารถหาความสัมพันธ์ทางสถิติได้ เนื่องจากมีจำนวนเด็กที่มีพบเชื้อ

ดังกล่าวอยู่น้อย ชนิดของสายพันธุ์มีความกลากหลาย สามารถพบเชื้อได้ 1-5 สายพันธุ์ หากแต่เด็กส่วนใหญ่ (79.6%) ตรวจพบเชื้อ 1-2 ชนิดสายพันธุ์ ความแตกต่างของจำนวนชนิดสายพันธุ์ระหว่างสภาวะฟันผุไม่มีความสำคัญทางสถิติ ($P = 0.17$)

Table 3 การกระจายของชนิดสายพันธุ์ *Lactobacillus* ระหว่างกลุ่มฟันผุต่ำ (dt ≤ 4) และกลุ่มฟันผุปานกลาง-สูง (dt > 4)

ชนิดสายพันธุ์	ทั้งหมด		กลุ่มผุต่ำ		กลุ่มผุปานกลาง-สูง	
	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)	No. of subjects (%)	No. of isolates (%)
L. fermentum	49 (83.1)	195 (54.6)	17 (85)	74 (59.7)	32 (82.1)	121 (51.9)
L. salivarius	15 (25.4)	53 (14.8)	1* (5)	2 (1.6)	14* (35.9)	51 (21.9)
L. paracasei	7 (11.9)	19 (5.3)	3 (15)	8 (6.5)	4 (10.3)	11 (4.7)
L. casei	6 (10.2)	13 (3.6)	3 (15)	6 (4.8)	3 (7.7)	7 (3)
L. mucosae	6 (10.2)	12 (3.4)	0	0	6 (15.4)	12 (5.2)
L. rhamnosus	5 (8.5)	14 (3.9)	2 (10)	4 (3.2)	3 (7.7)	10 (4.3)
L. oris	5 (8.5)	12 (3.4)	3 (15)	6 (4.8)	2 (5.1)	6 (2.6)
L. gasseri	4 (6.8)	18 (5)	3 (15)	14 (11.3)	1 (2.6)	4 (1.7)
L. plantarum	4 (6.8)	11 (3.1)	0	0	4 (10.3)	11 (4.7)
L. vaginalis	2 (3.4)	10 (2.8)	2 (10)	10 (8.1)	0	0
Total	59 (100)	357 (100)	20 (100)	124 (100)	39 (100)	233 (100)

Fisher's exact test: * $P = 0.01$

ลักษณะพันธุกรรมของ lactobacilli และสภาวะฟันผุ

จำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย *Lactobacillus* 304 สายพันธุ์ จากเด็ก 56 คน รายละเอียดในแต่ละชนิดสายพันธุ์ดังตารางที่ 4 เชื้อที่ใช้ในการศึกษาต้องมีอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์เดียวกันของเด็กแต่ละคน ผลจากการศึกษาโดยทั่วไปพบความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อแม้จะเป็นเชื้อในเป็นสปีชีส์เดียวกัน เชื้อของเด็กแต่ละคนมีลักษณะที่เฉพาะตัว (unique)

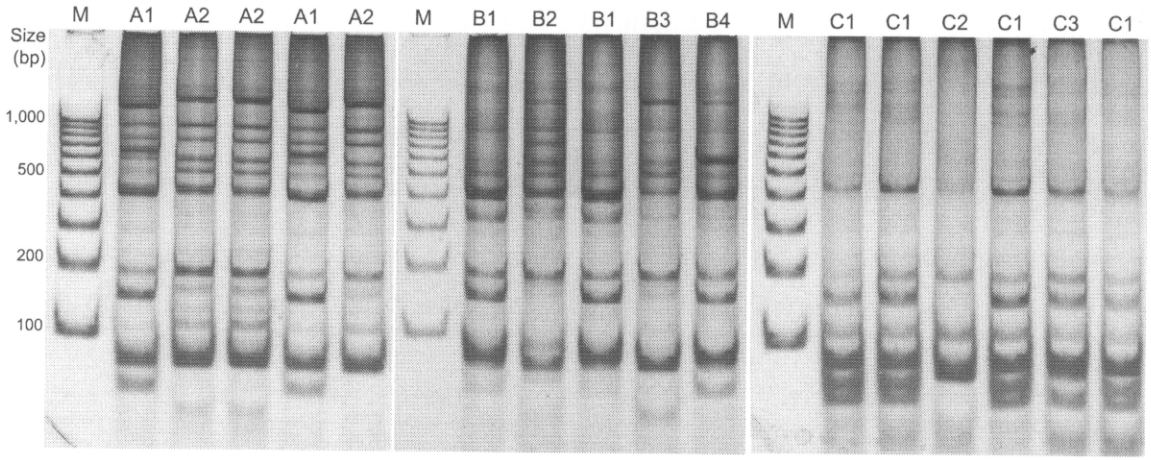
ไม่เหมือนกัน สามารถพบลักษณะพันธุกรรมได้ 1-5 ชนิดสายพันธุ์ในเด็กแต่ละคน (รูปที่ 1) มีข้อสังเกตว่าเชื้อในกลุ่มเด็กที่มีฟันผุสูงมักพบความหลากหลายได้มากกว่า 1 ชนิด genotype สามารถนัยสำคัญทางสถิติได้ในเชื้อ *L. fermentum* ($P < 0.01$) เนื่องจากมีจำนวนของเชื้อมากพอให้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติได้ ส่วนเชื้ออื่น ๆ มีจำนวนน้อยเกินไปที่จะทำการวิเคราะห์ทางสถิติได้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 304 สายพันธุ์ ในเด็ก 56 คน

ชนิดสายพันธุ์ (จำนวนเด็ก/ สายพันธุ์)	จำนวน genotypes	จำนวน (%) เด็ก/ สายพันธุ์ (%)		
		กลุ่มฟันผุต่ำ	กลุ่มฟันผุปานกลาง	กลุ่มฟันผุสูง
L. fermentum (38/ 180)*	1	12 (85.7)/ 60 (88.2)	13 (92.9)/ 52 (92.9)	4 (40)/ 17 (30.4)
	> 1	2 (14.3)/ 8 (11.7)	1 (7.1)/ 4 (7.1)	6 (60)/ 39 (69.6)
L. salivarius (10/ 45)	1	0	5 (100)/ 19 (100)	1 (20)/ 3 (11.5)
	> 1	0	0	4 (80)/ 23 (88.5)
L. casei/L. paracasei/ L. rhamnosus (9/ 34)	1	4 (100)/ 13 (100)	1 (25)/ 4 (22.2)	1 (100)/ 3 (100)
	> 1	0	3 (75)/ 14 (77.8)	0
Others# (10/ 45)	1	2 (75)/ 11 (57.9)	4 (100)/ 15 (100)	3 (100)/ 11 (100)
	> 1	1 (25)/ 8 (42.1)	0	0

Chi-square test: * $P = 0.02$

Others species ประกอบด้วย *L. mucosae* (1/ 5), *L. oris* (3/ 10), *L. gasseri* (2/ 12), *L. plantarum* (3/ 10), *L. vaginalis* (1/ 8)

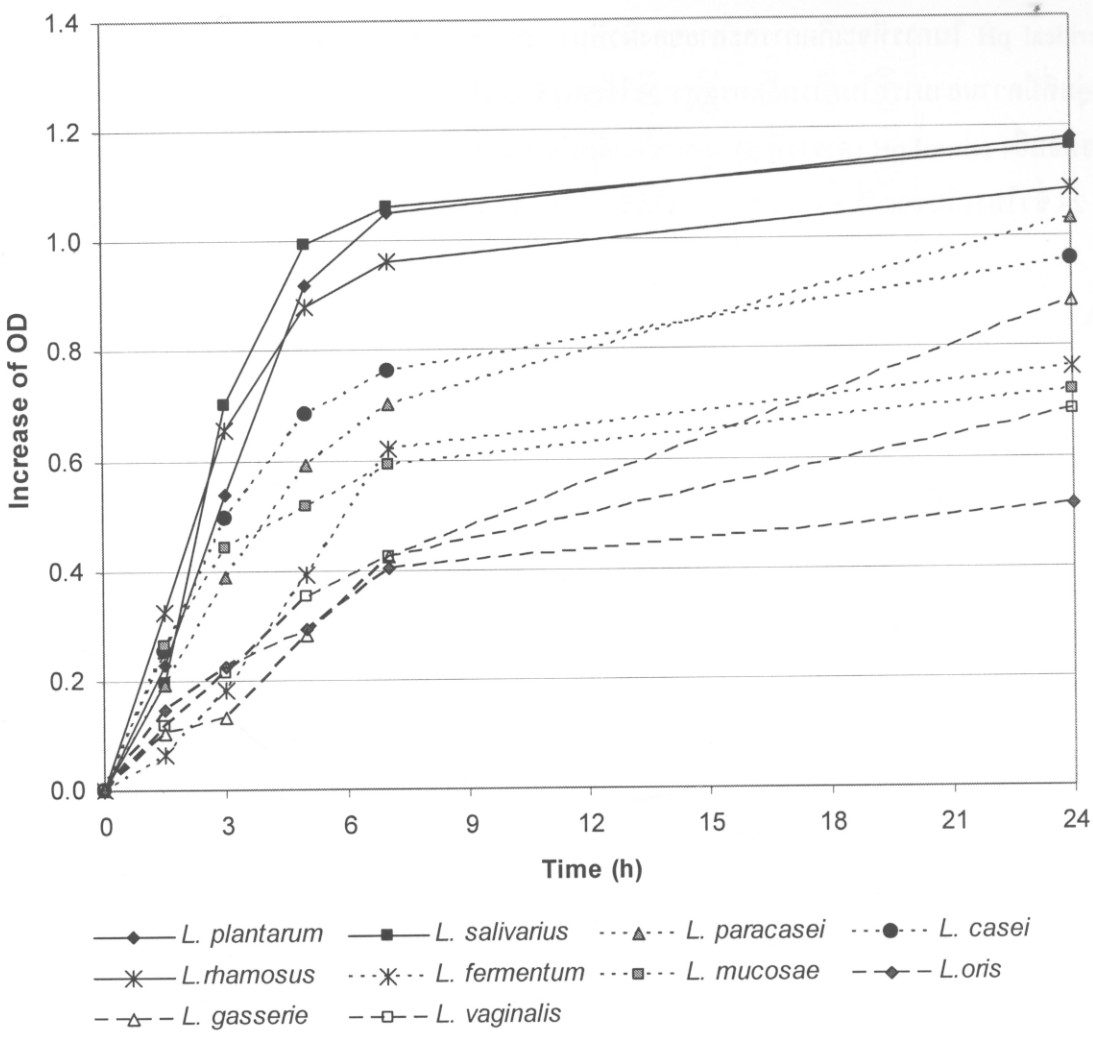


รูปที่ 1 AP-PCR profiles ของ *L. fermentum* 16 สายพันธุ์จากน้ำลายของเด็ก 3 คน (A-C) ที่มีฟันผุสูง ซึ่งแสดงความหลากหลายของจีโนไทปส์ A1-A2, B1-B4 และ C1-C3 ตามลำดับ M, Molecular size markers (100 bp DNA Ladder Bio-Rad)

ความสามารถใน การผลิตกรด (acidogenicity) ของเชื้อ *Lactobacillus* สปีชีส์ต่างๆ

<u>การเจริญเติบโตของเชื้อ lactobacilli สปีชีส์ต่างๆ</u>

Growth curve ของเชื้อ lactobacilli ที่พบในช่องปากเด็กทั้ง 10 สปีชีส์ แสดงดังรูปที่ 2โดยพบว่าเชื้อแต่ละสปีชีส์ มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ($p<0.01$, ANOVA) เมื่อพิจารณาค่า OD ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 7 ชั่วโมงแรก จะสามารถแบ่งเชื้อตามการเจริญเติบโตได้เป็น 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีค่า OD ที่สูงกว่าเชื้อสปีชีส์ อื่นๆ เมื่อถึง plateau phase ได้แก่ *L. salivarius* *L. plantarum* และ *L. rhamnosus* 2) กลุ่มที่เจริญเติบโตได้ปานกลาง ได้แก่ *L. casei* *L. paracasei* *L. mucosae* และ *L. fermentum* และ 3) กลุ่มที่เจริญเติบโตช้า และมีค่า OD ที่ plateau phase ต่ำกว่าเชื้อสปีชีส์ อื่นๆ ได้แก่ *L. oris* *L. gasseri* และ *L. vaginalis* นอกจากนี้พบว่า เชื้อ *L. salivarius* มีอัตราการเพิ่มของจำนวนเซล (maximum growth rate / h) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อสปีชีส์ อื่นๆ โดยสูงถึง 80.34 % ในชั่วโมงที่ 3 (ตารางที่ 5)

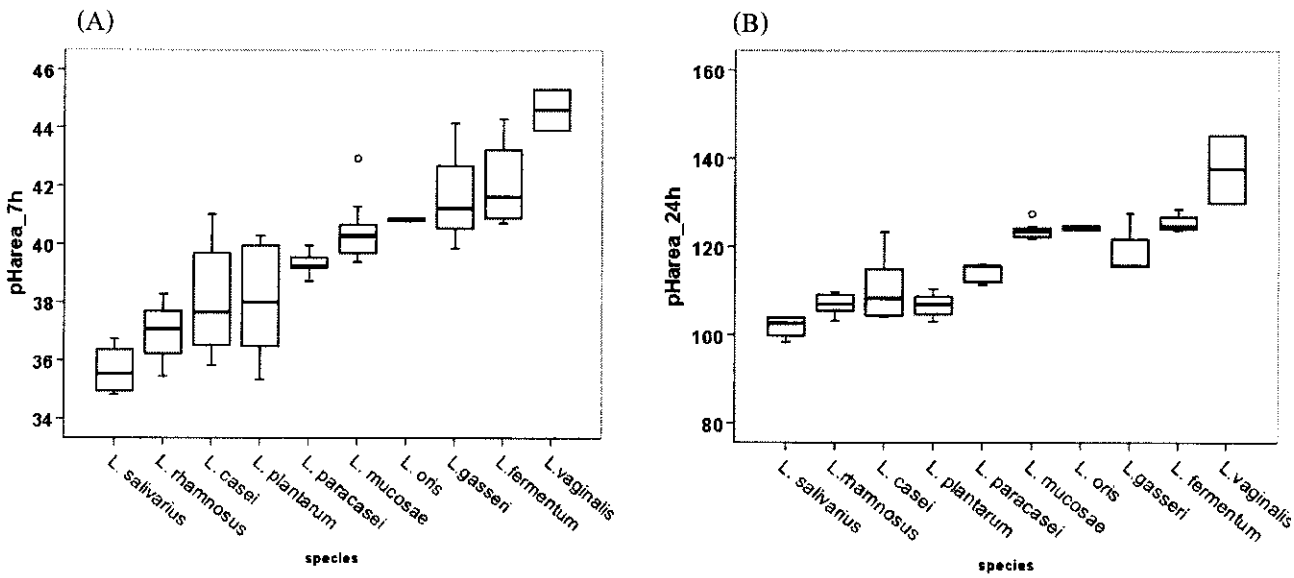


รูปที่ 2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ lactobacilli สปีชีส์ต่างๆ

ความสามารถในการผลิตกรด (acidogenicity)

ความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อแต่ละสปีชีส์ มีความแตกต่างกัน ($p<0.01$, ANOVA) ดังแสดงในรูปที่ 3 พื้นที่ใต้กราฟ pH ที่น้อยกว่าแสดงถึงความสามารถในการผลิตกรดที่สูงกว่า จะเห็นว่า *L. salivarius* มีความสามารถในการผลิตกรดที่มากที่สุด ตามด้วย *L. rhamnosus L. casei L. plantarum* ซึ่งเป็นกลุ่มสปีชีส์ที่สามารถผลิตกรดได้สูงเช่นกัน ในขณะที่ *L. vaginalis* มีความสามารถน้อยที่สุดทั้งเมื่อเปรียบเทียบ ในช่วงเวลา 7 ชั่วโมง (รูปที่ 2 A) และ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 2 B) และเมื่อดูความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละสปีชีส์พบว่า *L. casei L. plantarum L. fermentum* และ *L. gasseri* มีความแตกต่างในสปีชีส์สูงกว่า สปีชีส์อื่นๆ

เชื้อทุกสปีชีส์สามารถผลิตกรดจนค่าความเป็นกรดสุดท้าย (final pH) ที่ 24 ชั่วโมง ต่ำกว่า 5.5 (critical pH ในการที่จะเกิดการละลายของผิวฟัน) และมีชีวิตอยู่ได้ที่ pH นั้น ๆ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตกรดสูง จะใช้เวลาสั้นคือ ประมาณ 2.25 ถึง 3 ชั่วโมงเท่านั้น ในการผลิตกรดจนถึง critical pH (ตารางที่ 5) และเชื้อกลุ่มนี้ยังสามารถมีชีวิตอยู่ที่ความเป็นกรดต่ำถึง 3.9 (final pH ที่ 24 ชั่วโมง) ในขณะที่เชื้อกลุ่มผลิตกรดได้ช้ากว่าจะใช้เวลานานกว่าในการทำให้ถึง critical pH



รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ pH ของเชื้อ *Lactobacillus* สปีชีส์ต่างๆ เปรียบเทียบในช่วงเวลา 7 ชั่วโมง (A) และ 24 ชั่วโมง (B) พื้นที่ใต้กราฟ pH ที่น้อยกว่าแสดงถึงความสามารถในการผลิตกรดที่สูงกว่า

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบ growth characteristics และ acid production characteristics ของเชื้อ lactobacilli สปีชีส์ต่างๆ

LB species	Growth characteristics			Acid production characteristics		
	Growth rate constant * ± SE *	Time at the max. growth (h)	Max. OD increase ± SE	Time to pH 5.5 (h)	Final pH ± SE	
					At 7 h	At 24 h
L. salivarius	0. 32 ± 0.01	3	1.16 ± 0.01	2.25	4.02 ± 0.06	3.89 ± 0.06
L. plantarum	0.18 ± 0.01	5	1.18 ± 0.02	3	4.15 ± 0.04	3.89 ± 0.05
L. rhamnosus	0.18 ± 0.02	3	1.09 ± 0.05	2.25	4.26 ± 0.06	3.90 ± 0.03
L. casei	0.14 ± 0.01	3	0.96 ± 0.06	2.55	4.50 ± 0.18	3.99 ± 0.13
L. paracasei	0.13 ± 0.01	3	1.03 ± 0.05	2.91	4.69 ± 0.07	4.09 ± 0.03
L. mucosae	0.15 ± 0.01	5	0.72 ± 0.04	4.2	5.05 ± 0.04	4.62 ± 0.03
L. fermentum	0.10 ± 0.02	5	0.76 ± 0.02	5.04	5.05 ± 0.05	4.60 ± 0.02
L. oris	0.09 ± 0.05	7	0.51 ± 0.05	4.5	5.20 ± 0.00	4.69 ± 0.03
L. gasseri	0.09 ± 0.01	5	0.88 ± 0.03	5.25	5.10 ± 0.26	4.13 ± 0.08
L. vaginalis	0.08 ± 0.01	3	0.68 ± 0.24	> 7	5.94 ± 0.31	5.01 ± 0.49

* = $\ln OD_t - \ln OD_{t0} / t-t_0$

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

บทวิจารณ์

การศึกษาความสัมพันธ์ถึงชนิดและลักษณะทางพันธุกรรมของ *Lactobacillus* และสภาวะฟันผุ โดยเฉพาะในเด็กมีอยู่น้อย ในการศึกษานี้ได้รวบรวมจำนวนของเด็กและเชื้อได้มากกว่าที่มีรายงานไว้[22,23] ความชุกของ lactobacilli ที่พบในการศึกษานี้เป็น 55.8% ซึ่งใกล้เคียงที่มีรายงานไว้ในการศึกษาอื่นโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน[24] เด็กที่อยู่ในกลุ่มฟันผุปานกลาง-สูงสามารถตรวจพบเชื้อได้บ่อยและจำนวนเชื้อมากกว่ากลุ่มที่มีฟันผุต่ำ สาเหตุอาจเป็นผลจากการบริโภคน้ำตาลที่บ่อย[25]

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกชนิดของ lactobacilli จากช่องปากของเด็กไทย พบชนิดของ lactobacilli มีความหลากหลาย โดยพบ 10 ชนิดสายพันธุ์ *L. fermentum* เป็นชนิดที่ได้มากที่สุด ตามด้วย *L. salivarius* เมื่อพิจารณาการกระจายของชนิดเชื่อกับสภาวะฟันผุ พบว่าเด็กส่วนใหญ่สามารถถูกตรวจพบเชื้อไก้หลายชนิดในคนหนึ่ง ๆ สอดคล้องกับรายงานอื่น ๆ[23, 26] เป็นที่น่าสนใจว่ามีเพียง *L. salivarius* เท่านั้น ที่พบสัมพันธ์กับกลุ่มเด็กที่มีฟันผุสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) Caufield และคณะ[26] ได้รายงานการพบ *L. salivarius* เป็นสายพันธุ์หนึ่งใน 9 กลุ่ม (taxa) ที่พบได้บ่อยในกลุ่มศึกษาที่พบฟันผุในระยะไวงาน (active caries) อย่างไรก็ตามในการศึกษานั้นมีตัวอย่างศึกษาเพียง 6 ราย และไม่มีตัวอย่างศึกษาที่ไม่มีฟันผุเป็นกลุ่มควบคุมในการใช้เปรียบเทียบ

ในการอธิบายบทบาทของ *L. salivarius* ในการที่พบสัมพันธ์กับฟันผุ มีรายงานที่พบว่า *L. salivarius* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลกติก อะซิติก และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้ดี[27] *L. salivarius* สามารถทนกรดได้ดี แม้ที่ pH 2.5 ยังสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง[28] โดยทั่วไป lactobacilli มีความสามารถในการเกาะติดที่ผิวฟันได้น้อย จึงทำให้ตรวจพบเชื้อกลุ่มนี้ที่คราบจุลินทรีย์ได้น้อย จึงมักพบได้ในน้ำลาย[29, 30] หากแต่มีรายงานการพบ *L. salivarius* ได้บนผิว hydroxyapatites ที่เคลือบด้วยน้ำลายในการทดลองในหลอดแก้ว[31] จึงมีความเป็นไปได้ว่า *L. salivarius* มีความสามารถในการเกาะติดในคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่า lactobacilli สายพันธุ์อื่น ๆ มีรายงานสนับสนุนของ Fitzgerald และคณะ[32] พบว่า *L. salivarius* ที่แยกจากคราบจุลินทรีย์ของคนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดฟันผุที่รุนแรงในหนูทดลองเมื่อได้น้ำตาลกลูโคสหรือซูโคสเป็นอาหาร นอกจากนี้มีรายงานสนับสนุนว่า *L. salivarius* มีความสามารถในการก่อให้เกิดฟันผุได้มากกว่า *S. mutans* สายพันธุ์ Ingbritt ในหนูทดลองที่ปราศจากเชื้อ (gnotobiotic rats)[33] และในภาวะที่น้ำตาลและ pH ต่ำ ยิ่งเพิ่มความสามารถของ *L. salivarius* ในการทำให้เกิดภาวะกรดต่ำลงไปได้อีก และเกิดการเปลี่ยนแปลงชุมชนของจุลชีพในภาวะไบโอฟิล์มหรือคราบจุลินทรีย์[34] ด้วยข้อมูลเหล่านี้และความสัมพันธ์ของ *L. salivarius* กับภาวะฟันผุ ที่พบในรายงานนี้บ่งชี้ว่า *L. salivarius* น่าจะเป็นสาเหตุของฟันผุได้ ดังนั้นในการนำมาใช้เพื่อหวังในการเป็น probiotic จึงควรทำด้วยความระมัดระวัง

บทบาทของ *L. fermentum* กับโรคฟันผุไม่ชัดเจน สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั้งในภาวะที่ไม่พบฟันผุ[35, 36] และในภาวะที่มีฟันผุ[22, 23, 26] ผลจากการศึกษานี้พบ *L. fermentum* ได้บ่อยที่สุดและมีโอกาสพบได้ทั้งใน

กลุ่มฟันผุต่ำและกลุ่มฟันผุปานกลาง-สูง ดังนั้นเชื้อนี้อาจเป็นเพียงเชื้อประจำถิ่น และไม่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดฟันผุ

ส่วนเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. plantarum* and *L. vaginalis* เป็นเชื้อที่พบได้ไม่บ่อย และการพบเชื้อเหล่านั้นไม่สัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ การพบความชุกต่ำของเชื้อเหล่านั้น อาจขึ้นกับสภาพภูมิประเทศ ความต่างของกลุ่มประชากร และ พฤติกรรมและวัฒนธรรมการกินอาหาร[26] เนื่องจาก lactobacilli เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปและจากอาหาร ดังนั้นชนิดอาหารของคนไทยซึ่งมีความแตกต่างจากตะวันตกอาจทำให้การพบเชื้อ lactobacilli แตกต่างไป

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *Lactobacillus* สายพันธุ์จากช่องปากมีความจำกัด มีเพียง 2 การศึกษาที่รายงานลักษณะทางพันธุกรรมของ *Lactobacillus* กับโรคฟันผุ[23, 26] Marchant และคณะ[23] ได้ทำการศึกษา 39 สายพันธุ์ แยกจากตัวอย่างตรวจที่เป็นเนื้อฟันที่ผุของเด็ก 3 ราย พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่มาจากฟันต่างซี่กัน แม้จะเป็นเด็กคนเดียวกันก็ตาม อีกการศึกษาหนึ่งเป็นของ Caufield และคณะ[26] ได้ทำการศึกษา 180 สายพันธุ์ แยกจากตัวอย่างตรวจที่เป็นน้ำลายของหญิงที่มีฟันผุรุนแรง 6 ราย พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อเหล่านั้นเช่นกัน ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษา 304 สายพันธุ์ แยกจากตัวอย่างตรวจที่เป็นน้ำลายของเด็ก 56 คน พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อเหล่านั้นเช่นกัน เด็กแต่ละคนมีเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเฉพาะตัว ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละคน สามารถพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อได้จำนวน 1-5 จีโนไทปส์ กลุ่มเด็กฟันผุสูงพบเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมากกว่ากลุ่มเด็กฟันผุต่ำ Caufield และคณะ[26] รายงานอาจพบลักษณะทางพันธุกรรมได้ถึง 11 จีโนไทปส์ ใน 1 คน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเก็บตัวอย่างเชื้อจำนวนมากในแต่ละคน คือเก็บเชื้อ 30 สายพันธุ์ใน 1 คน จึงทำให้โอกาสในการพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมากกว่าในการศึกษานี้ เหตุผลในการพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อกับโรคฟันผุไม่ชัดเจน เชื้อ lactobacilli เป็นเชื้อที่ทนกรดได้มาก จึงเป็นไปได้ว่าในภาวะที่มีความเป็นกรดซึ่งพบในกรณีฟันผุอาจทำให้เหมาะสมในการดำรงอยู่ของเชื้อ จึงเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ

การที่เชื้อชนิดหนึ่งๆจะสามารถดำรงอยู่และเพิ่มจำนวนในช่องปาก จนสามารถเป็นสาเหตุของฟันผุ (cariogenic pathogen) ได้นั้น ขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ ประการ ได้แก่ ความสามารถในการเพิ่มจำนวน ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่น ๆ ความสามารถในการผลิตกรด และความสามารถในการทนต่อกรด ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ที่สำคัญของ cariogenic bacteria[37, 38] การศึกษานี้เป็นการยืนยันว่า เชื้อกลุ่ม lactobacilli มีความสามารถในการผลิตกรดได้มาก จากการศึกษาของ Badet และคณะ พบว่า lactobacilli ในภาพรวมสามารถผลิตกรดจนได้ final pH ตั้งแต่ 3.65 จนถึง 2.2[39]

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาว่า Lactobacillus สายพันธุ์ต่าง ๆ มีความสมารถในการผลิตกรดเป็นอย่างไร ในการศึกษานี้พบว่าในช่องปากของเด็กกลุ่มศึกษามี *Lactobacillus* มากถึง 10 สปีชีส์ จึงเป็นที่สนใจว่าเชื้อเหล่านี้มีบทบาทในการเกิดฟันผุอย่างไร ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อแต่ละสปีชีส์มี

ความสามารถในการเจริญเติบโต และการผลิตกรดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, ANOVA) การที่เชื้อชนิดหนึ่ง ๆ มีอัตราการเติบโตที่สูงกว่า จะเป็นการสร้างโอกาสให้เชื้อนั้น ๆ สามารถเพิ่มจำนวนและมีโอกาสในการแข่งขันที่จะดำรงอยู่ได้มากกว่า นอกจากนั้นยังพบว่าในภาวะที่มีน้ำตาลสูง กลุ่มเชื้อที่มีการเติบโตได้ดีซึ่งได้แก่ *L. salivarius L. rhamnosus L. plantarum* และ *L. casei* มีความสามารถผลิตกรดได้สูง มีชีวิตได้ใน pH ที่ต่ำ จึงทำให้สันนิษฐานว่าสปีชีส์เหล่านี้น่าจะเกี่ยวข้องหรือมีบทบาทในการเกิดฟันผุ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ที่พบว่า *L. salivarius* เป็นเชื้อที่พบได้มากในเด็กกลุ่มที่มีฟันผุปานกลางถึงสูง และอีกหลาย ๆ การศึกษาที่พบ *L. rhamnosus L. plantarum* และ *L. casei* สูง ในเนื้อฟันที่ผุ (carious dentine)[40, 41] อย่างไรก็ตามชนิดของสปีชีส์ *Lactobacillus* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุที่พบในแต่ละกลุ่มประชากร อาจมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้องได้ เช่น อาหาร host-specific และความแตกต่างในแต่ละพื้นที่แต่ละช่วงเวลา

สรุป

ในการศึกษานี้บ่งชี้ความหลากหลายของชนิดและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Lactobacillus L. salivarius* เป็นเชื้อที่พบได้มากในเด็กที่มีฟันผุสูง จึงอาจมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดฟันผุ *L. fermentum* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยและไม่สัมพันธ์กับโรคฟันผุ เด็กที่มีฟันผุมากจะพบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Lactobacillus* ได้มากกว่าเด็กที่มีฟันผุต่ำ

ในการศึกษาความสามารถในการสร้างกรดของ *Lactobacillus* จำนวน 10 ชนิดสายพันธุ์ แยกได้จากกลุ่มศึกษา พบว่า *L. salivarius L. rhamnosus L. plantarum* และ *L. casei* มีความสามารถในการผลิตกรดได้ในเวลาอันสั้น สอดคล้องกับผลที่พบข้างต้นว่า *L. salivarius* เป็นเชื้อที่พบได้มากในเด็กที่มีฟันผุสูง เชื้อดังกล่าวน่าจะมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคฟันผุในเด็กไทย

เอกสารอ้างอิง

1. The 5th national oral health survey in 2000-2001. Bangkok: Ministry of Public Health; 2002.
2. Thitasomakul S, Thearmontree A, Piwat S, *et al.* A longitudinal study of early childhood caries in 9- to 18-month-old Thai infants. Community Dent Oral Epidemiol 2006; 34:429-436.
3. Clark JK. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. In: Taubman S. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. St. Louis, Missouri: Mosby;1992. p. 377-91.
4. Taubman S. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. St. Louis, Missouri: Mosby;1992. p. 377-91.
5. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res. 1994; 73: 672-81.
6. Bjorndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. Caries Res 2000; 34: 502-8.
7. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. Caries Res 2001; 35: 397-406.
8. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. J Clin Microbiol 2002; 40: 1698-704.
9. Nancy J, Dorignac G. Lactobacilli from the dentin and saliva in children. J Clin Pediatr Dent 1992 ; 16: 107-11.
10. Radford J. Caries-associated micro-organisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. J Dent 2000; 28: 307-12.
11. Barsamian-Wunsch P, Park JH, Watson MR, Tinanoff N, Minah GE. Microbiological screening for cariogenic bacteria in children 9 to 36 months of age. Pediatr Dent 2004; 26: 231-9.
12. Soet J, Graaff J. Microbiology of carious lesions. Dent Update 1998; 25: 319-24.
13. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001; 65: 1028-37.
14. Harris R, AD. N, PM. A, CM. P. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. Community Dental Health 2004; 22 (Suppl): 71-85.
15. Powell LV. Caries prediction: a review of the literature. Community Dent Oral Epidemiol 1998; 26: 361-71.

16. Teanpaisan R, Thitasomakul S, Piwat S, Thearmontree A, Pithpornchaiyakul W, Chankanka O. Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in relation to dental caries development in 3-24 month old Thai children. Int Dent J 2007; 57: 445-451.

17. Teanpaisan R, Dahlen G. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. Oral Microbiol Immunol 2006; 21: 79-83.

18. World Health Organization. Oral health surveys - Basic methods, 4th edn. Geneva: World Health Organization, 1997.

19. Kohler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* level in saliva. J Clin Microbiol 1979; 9: 584-8.

20. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiology Letters 2001; 205: 31-6.

21. Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Infect Chemother 2002; 8: 43-9.

22. Milnes AR, Bowden GH. The microflora associated with developing lesions of nursing caries. Caries Res 1985: 19: 289-297.

23. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. Caries Res 2001: **35**: 397-406.

24. Nancy J, Dorignac G. Lactobacilli from the dentin and saliva in children. J Clin Pediatr Dent 1992: 16: 107-111.

25. Beighton D, Adamson A, Rugg-Gunn A. Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old English schoolchildren. Arch Oral Biol 1996: 41: 271-280.

26. Caufield PW, Li Y, Dasanayake A, Saxena D. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. Caries Res 2007: 41: 2-8.

27. Martin R, Jimenez E, Olivares M, Martin ML, Fernandez L, Xaus J, et al. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. Int J Food Microbiol 2006: 112: 35-43.

Central Library
3-0101-20013014-4

ยืม-คืนที่งานบริการห้องสมุด

28. Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. Oral Microbiol Immunol 2007: 22: 111-117.

29. Van Houte J, Gibbons RJ, Pulkkinen AJ. Ecology of human oral lactobacilli. Infect Immun 1972: 6: 723-729.

30. van Houte J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. Int Dent J 1980: 30: 305-326.

31. Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakano K, et al. Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. Caries Res 2005: 39: 479-483.

32. Fitzgerald RJ, Adams BO, Fitzgerald DB, Knox KW. Cariogenicity of human plaque lactobacilli in gnotobiotic rats. J Dent Res 1981: 60: 919-926.

33. Seppa L, Luoma H, Forss H, Spets-Happonen S, Markkanen S, Pelkonen K. Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotic rats. Caries Res 1989: 23: 371-374.

34. Pham LC, van Spanning RJ, Roling WF, Prosperi AC, Terefework Z, ten Cate JM, et al. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. Arch Oral Biol 2009: 54: 132-137.

35. Colloca ME, Ahumada MC, Lopez ME, Nader-Macias ME. Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. Oral Dis 2000: 6: 227-233.

36. Ahumada MC, Bru E, Colloca ME, Lopez ME, Nader-Macias ME. Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouths of patients with or without cavities. J Oral Sci 2003: 45: 1-9.

37. de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. Caries Res 2000; 34: 486-90.

38. Köhler B, Birkhed D, Olsson S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res 1995; 29: 402-6.

39. Badet MC, Richard B, Dorignac G. An in vitro study of the pH-lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. J Appl Microbiol 2001; 90: 1015-8.

40. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol 2004; 42: 3128-3136.

41. Caufield PW, Li Y, Dasanayake A, Saxena D. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. Caries Res 2007; 41: 2-8.