KDJ
Khon Kaen University
Dental Journal

ผลทางคลินิกของการใช้โพรไบโอติกแลคโตแบซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 เพื่อการป้องกันฟันผุในเด็กปฐมวัย: การทดลองสุ่มแบบมีกลุ่มควบคุม

ณัฐธิณี จันทร์วงศ์ [1,2] รวี เถียรไพศาล [2,3] สุพัชรินทร์ พิวัฒน์ [1,2,*]

บทความวิจัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การทดลองสุ่มแบบมีกลุ่มควบคุมและมีการปกปิดสองทางนี้ เพื่อศึกษาผลของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ต่อการเปลี่ยนแปลงเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค แลคโตบาซิลไลในน้ำลาย และต่อสภาวะฟันผุในเด็กเล็ก และเพื่อประเมินผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น รวมถึงการคงอยู่ของโพรไบโอติกในช่องปาก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: ทำการศึกษาในเด็กอายุ 2-5 ปี จำนวน 100 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มโพรไบโอติกได้รับนมผงที่มีแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ปริมาณ 10^7 โคโลนีต่อกรัม และกลุ่มควบคุมได้รับนมผงมาตรฐาน โดยให้บริโภควันละ 3 กรัม เป็นเวลา 3 เดือน และมีการจดบันทึกการได้รับนมและผลข้างเคียงทุกวัน ทำการวัดผลโดยการนับจำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค แลคโตบาซิไล ที่เวลาเริ่มต้น 3 เดือน และ 6 เดือน ทำการตรวจหาฟันผุที่เวลาเริ่มต้นและที่ 6 เดือน

ผล: เด็กที่ได้รับโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 มีปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 3 เดือน และ 6 เดือน ($p<0.01$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณเชื้อแลคโตบาซิไลระหว่าง 2 กลุ่ม ที่เวลา 6 เดือนพบว่า กลุ่มโพรไบโอติกมีการลุกลามของรอยโรคฟันผุ (ร้อยละ 3.48) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ร้อยละ 4.55) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.036$) และพบการคงอยู่ของโพรไบโอติกในช่องปากเด็กร้อยละ 11.11 ของจำนวนเด็กที่ได้รับ ตลอดการศึกษาไม่พบว่าเด็กมีอาการข้างเคียงใด ๆ

บทสรุป: การใช้โพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการลุกลามและสามารถป้องกันการเกิดฟันผุใหม่ในเด็กเล็กได้

คำไขรหัส : โพรไบโอติก/ แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11/ ฟันผุ/ ฟันน้ำนม

Received: *May 04, 2024*
Revised: *Oct 01, 2024*
Accepted: *Oct 15, 2024*

บทนำ

โรคฟันผุในเด็กปฐมวัย (Early childhood caries) ถือเป็นปัญหาสำคัญทางทันตสุขภาพที่ส่งผลเสียต่อคุณภาพชีวิตของเด็กและเป็นภาระต่อครอบครัวและสังคม[1] ในประเทศไทยพบว่า เด็กก่อนวัยเรียนอายุ 3 ปี และ 5 ปี มีความชุกในการเกิดโรคฟันผุสูงถึง ร้อยละ 47 และร้อยละ 72.1 ตามลำดับ ซึ่งการจัดการรักษาฟันผุในเด็กวัยนี้มีความยุ่งยาก เด็กเกือบทั้งหมดยังมีฟันผุที่ต้องการรับการรักษา[2] การรักษาในเด็กวัยนี้จำเป็นต้องใช้ทันตบุคคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง แม้ว่าเป็นที่ทราบกันว่าโรคฟันผุเป็นโรคที่ป้องกันได้ แต่จากการทบทวนอย่างเป็นระบบพบว่า มาตรการป้องกันสำหรับโรคฟันผุในเด็กปฐมวัยประสบความสำเร็จเพียงบางส่วนเท่านั้น[3] จึงมีความพยายามศึกษาหาวิธีการช่วยลดการเกิดฟันผุ โดยเน้นการควบคุมและลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรค วิธีการหนึ่งคือ การนำโพรไบโอติกมาใช้

[1] *สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*
[2] *ศูนย์วิจัยโรคที่พบบ่อยในช่องปากและวิทยาการระบาด มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*
[3] *สาขาวิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*
[*] *ผู้ประพันธ์บรรณกิจ*

WHO ได้ให้คำนิยามของคำว่า โพรไบโอติก (Probiotics) ไว้ว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพร่างกายมนุษย์[4] หลักการทำงานของโพรไบโอติกคือ การช่วยทำให้เกิดความสมดุลของเชื้อในร่างกาย ทำให้สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในทางการแพทย์ที่หลากหลาย[5] รวมถึงได้มีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ป้องกันและรักษาโรคในช่องปากได้แก่ โรคปริทันต์ ภาวะกลิ่นปาก และการติดเชื้อราในช่องปาก รวมถึงการนำมาใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคฟันผุ โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติก (Lactic producing bacteria) ได้แก่ แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และไบฟิโดแบคทีเรียม *(Bifidobacterium)* เป็นต้น[6,7]

Teanpaisan และคณะในปี ค.ศ. 2011 [8] ได้ทำการศึกษาเพื่อหาเชื้อโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการลดเชื้อก่อโรคฟันผุ พบว่า เชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอิ เอสดี 1 (*L. paracasei* SD 1) มีคุณสมบัติที่ดี ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาในอาสาสมัครพบว่าสามารถลดเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค (Mutans streptococci) ทั้งในผู้ใหญ่และในเด็กเล็กได้ และไม่พบผลข้างเคียงใดๆ[9-11] นอกจากนี้พบผลการศึกษาทางห้องปฏิบัติการคือแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 (*L. rhamnosus* SD 11) ที่มาจากช่องปากเด็กที่ปราศจากโรคฟันผุ มีศักยภาพการเป็นโพรไบโอติกที่ใช้ในช่องปากได้ โดยสามารถลดจำนวนเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ดี[8] พบความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก[12] พบว่า มีความสามารถในการยึดเกาะ (Adhesion) กับเยื่อบุผิวในช่องปากได้ และสามารถเกาะกลุ่มกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (Autoaggregation) และต่างชนิดกัน (Coaggregation) ได้ดี[13] ด้วยคุณสมบัติที่ดีดังที่กล่าวมาจึงได้มีการนำเชื้อสายพันธุ์นี้มาศึกษาเบื้องต้นในกลุ่มอาสาสมัครอายุ 20-23 ปี โดยให้โยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ให้กลุ่มอาสาสมัครรับประทานเป็นระยะเวลา 1 เดือน ผลการศึกษาพบว่า แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 สามารถลดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบอาการข้างเคียงใดๆ ในกลุ่มอาสาสมัคร[14] อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเพื่อใช้โพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ในการป้องกันฟันผุในกลุ่มเด็กเล็ก

มีการศึกษาการนำแลคโตบาซิลลัสมาใช้ในการเป็นโพรไบโอติกเพื่อป้องกันฟันผุในเด็ก สายพันธุ์ที่ใช้ได้แก่ แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส[15–19] และแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอิ[9,20] เป็นต้น ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบเป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ที่สามารถพบทั่วไปในช่องปาก[21] และจากการทบทวนอย่างเป็นระบบโดย Meng และคณะ[22] ไม่พบผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์เหล่านี้ ซึ่งแสดงถึงความปลอดภัยในการใช้ในเด็ก

จากคุณสมบัติของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ที่เหมาะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในช่องปาก และความปลอดภัยจากการศึกษาก่อนหน้า ประกอบกับยังไม่มีการศึกษาเพื่อใช้ป้องกันฟันผุในกลุ่มเด็กเล็ก ดังนั้นจึงมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อศึกษาผลของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ต่อการป้องกันฟันผุในกลุ่มเด็กเล็ก

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ต่อปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค เชื้อแลคโตบาซิลไล และการเปลี่ยนแปลงสภาวะโรคฟันผุในเด็กเล็ก และเพื่อประเมินผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น รวมถึงการคงอยู่ของเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ในช่องปาก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้ออกแบบการวิจัยเป็นการทดลองแบบสุ่มมีการปกปิดสองทางเทียบกับกลุ่มควบคุม (Double blinded randomized controlled trial study design) โดยกลุ่มศึกษาได้รับนมผงผสมโพรไบโอติก แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 กลุ่มควบคุมได้รับนมผงปกติที่ไม่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมเพื่อการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EC5912-52-L-HR) และได้ลงทะเบียนงานวิจัยแบบทดลองทางคลินิกของประเทศไทย (Thai Clinical Trials Registry, TCTR20170525002)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria) คือ เด็กอายุ 2-5 ปี ที่มีสุขภาพดี ไม่มีโรคประจำตัว หรือมีสุขภาพอ่อนแอเสี่ยงต่อการติดเชื้อ และมีโอกาสต้องได้รับยาปฏิชีวนะเป็นประจำ ได้แก่ เด็กที่มีโรคมะเร็ง เบาหวาน หัวใจและระบบไหลเวียนโลหิต โรคระบบทางเดินอาหาร โรคไต โรคตับ ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง รวมทั้งผู้ที่ได้รับการเปลี่ยนอวัยวะ และผู้ที่เพิ่งได้รับการผ่าตัด สำหรับเกณฑ์คัดออก

(Exclusion criteria) คือ เด็กที่มีประวัติไม่เคยดื่มนมวัวหรือรับประทานผลิตภัณฑ์ที่มีนมวัวเป็นส่วนประกอบ มีประวัติการแพ้นมวัวและ/ หรือน้ำตาลแลคโตส มีฟันผุเป็นรู (Cavitated caries) มากกว่า 5 ซี่ มีประวัติการใช้ยาต้านจุลชีพมาก่อนเข้าร่วมการศึกษาเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ รับประทานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกหรือ ไซลิทอลเป็นประจำ เกณฑ์นำอาสาสมัครออกจากโครงการ (Withdrawal criteria) คือ เด็กที่ไม่สามารถรับการตรวจฟันและเก็บน้ำลายเนื่องจากไม่มารับการตรวจหรือมีพฤติกรรมไม่ร่วมมือ เด็กที่ได้รับนมน้อยกว่าร้อยละ 80 ของระยะเวลา 3 เดือน เด็กและผู้ปกครองได้ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษานี้โดยการชี้แจงและได้รับเอกสารโครงการวิจัยจากผู้วิจัย ซึ่งผู้ปกครองที่สนใจเข้าร่วมการศึกษามีการลงนามในใบยินยอมเพื่อเข้าร่วมการศึกษา

การคำนวณกลุ่มตัวอย่างใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่ม ที่มีอิสระต่อกัน[23]

$$N/group = 2\sigma^2 (Z\alpha+Z\beta)^2) / (\mu_1- \mu_2)^2$$

โดยที่ α เท่ากับ 0.05 และมีค่า power ร้อยละ 80 (β=0.20) คำนวณโดยใช้ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนฟันผุที่มีการลุกลาม (Caries progression) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษา ($\mu_1- \mu_2$) เท่ากับ 1.67 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม (σ) เท่ากับ 2.65 ตามการศึกษาของ Pahumunto N และคณะ[9] จากการแทนสูตรข้างต้น ได้กลุ่มตัวอย่างกลุ่มละ 39 คน และมีการเพิ่มกลุ่มตัวอย่างร้อยละ 30 เพื่อสำรองการถอนตัวหรือออกจากการศึกษาของกลุ่มตัวอย่าง ได้กลุ่มตัวอย่างการศึกษา คือ 50 คน/กลุ่ม

ผู้เข้าร่วมวิจัยถูกคัดเลือกจากศูนย์พัฒนาเด็กเล็กในจังหวัดสงขลาจำนวน 4 ศูนย์ จากแต่ละศูนย์ แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มโพรไบโอติก ซึ่งได้รับนมผงผสมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 และกลุ่มควบคุมได้รับนมผงปกติที่ไม่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกทำการสุ่มแบบบล็อก (Block randomization) โดยใช้ค่ามิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไคที่เวลาเริ่มต้น เป็นตัวกำหนด และกำหนด block size=4 ซึ่งสามารถคำนวณหาวิธีในการสุ่มได้ทั้งหมด 6 วิธี การสุ่มจัดสรรผู้เข้าร่วมวิจัย การบรรจุและการแจกจ่ายนมสำหรับกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุม ดำเนินการโดยผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการตรวจช่องปาก

การเตรียมนมผงผสมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 และการแจกจ่าย การเตรียมนมผง (Powdered milk) ผสมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ทำโดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดำเนินการตามวิธีของ Piwat และคณะ[24] โดยทำการเตรียมเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในนมผงละลาย (ความเข้มข้นร้อยละ 20) นำไปผ่านเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer, model B191 Buchi mini spray dryer; Flawil, Switzerland) โดยใช้อุณหภูมิอากาศเข้าที่ 70 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิอากาศออกที่ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งได้นมผงผสมที่มีความชื้นร้อยละ 3.44±0.85 และมีจุลินทรีย์โพรไบโอติกอยู่ $7.5\pm0.20\times10^7$ โคโลนี (Colony-Forming Units, CFU) ต่อกรัม นมผงผสมโพรไบโอติกและนมผงปกติถูกเก็บไว้ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) ในระหว่างรอการแจกจ่าย การควบคุมคุณภาพทำโดยการตรวจสอบให้นมมีโพรไบโอติกที่มีชีวิตอยู่ในระดับ 10^7 โคโลนีต่อกรัม ตลอดระยะเวลา 6 เดือนของการเก็บรักษา

กลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมได้รับนมผงที่จัดเตรียมไว้ในปริมาณ 3 กรัม/วัน ผสมน้ำ 50 มิลลิลิตร รับประทานทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 เดือน โดยมีผู้ช่วยวิจัยเตรียมบรรจุภัณฑ์และระบุชื่อเด็กติดไว้ที่ซองนมตามกลุ่มที่กำหนด และมีครูพี่เลี้ยงเป็นผู้เตรียมนมให้เด็กในวันจันทร์-วันศุกร์ และผู้ปกครองเป็นผู้เตรียมนมให้ในวันเสาร์-อาทิตย์ และวันหยุด และมีการจดบันทึกการดื่มนมและผลข้างเคียงจากการดื่มนมตลอดการศึกษา ซึ่งหากเด็กมีอาการแพ้หรืออาการข้างเคียงที่สงสัยว่าเกิดจากนมที่ได้รับ ได้แก่ อาการคลื่นไส้อาเจียน มีน้ำลายมาก ปวดท้อง ท้องเสีย เป็นผื่นแพ้ ครูพี่เลี้ยงและผู้ปกครองสามารถให้เด็กหยุดทานนมได้ทันที และลงข้อมูลในแบบบันทึก รวมทั้งแจ้งทีมผู้วิจัยเพื่อตรวจสอบ

การเก็บรวบรวมข้อมูล การเก็บข้อมูลโดยการตรวจฟัน ตรวจจำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และแลคโตบาซิลไลในน้ำลาย และตรวจการคงอยู่ของเชื้อ แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11

การตรวจฟัน ตรวจที่เวลาเริ่มต้น (T0) และเมื่อติดตามหลังหยุดดื่มนม 3 เดือน (T6) โดยใช้เกณฑ์การตรวจดัดแปลงมาจากเกณฑ์ของ ICDAS II (International Caries Detection and Assessment System II) (ตารางที่ 1) ทำการตรวจด้วยกระจกส่องปากและโพรบ (Probe) WHO-621 ภายใต้แสงจากไฟฉาย ซึ่งมีผู้ตรวจ 1 คน โดยได้รับการปรับมาตรฐานการตรวจโดยผู้เชี่ยวชาญ (Inter-examiner reliability) มีค่าแคปปา (Kappa) เท่ากับ 0.67 และทำการปรับมาตรฐานภายในผู้ตรวจเพื่อทดสอบความเที่ยงในการตรวจฟัน (Intra-examiner reliability) มีค่าแคปปาเท่ากับ 0.83

ตารางที่ 1 เกณฑ์การตรวจฟัน (ดัดแปลงมาจากเกณฑ์การตรวจและประเมินโรคฟันผุด้วยระบบ ICDAS II)
Table 1 Criteria for dental examination (Modified ICDAS II)

ICDAS II	ICDAS Activity + (active) / - (inactive)	Modified ICDAS II
0 (Sound) 1 (First visual change in enamel when dry)		0
2 (Distinct visual change in enamel)	-	1
	+	2
3 (Localized enamel breakdown)	-	3
	+	4
4 (Underlying dentine shadow)		5
5, 6 (Distinct cavity with visible dentine)	-	6
	+	7

การตรวจหาจำนวนเชื้อในน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลายด้วยวิธีการบ้วนเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่เวลาเริ่มต้น (T0) จากนั้นเมื่อได้รับนมครบ 3 เดือน (T3) และที่ระยะติดตาม 3 เดือนหลังหยุดได้รับนม (T6) นำน้ำลายมาทำการเจือจาง (Serial dilution) และเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือก (Selective media) เชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค คือ Mitis salivarius bacitracin agar ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 10 และคัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลไล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogosa Sharpe agar (MRS agar)ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic, 80% N_2, 10% CO_2 และ 10% H_2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อต่าง ๆ โดยมีหน่วยเป็นโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)

การคงอยู่ของเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11

ทำการตรวจวัดการคงอยู่ของเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ที่เวลา 6 เดือน โดยมีการจำแนกเชื้อแลคโตบาซิลไลที่มีลักษณะของโคโลนีคล้ายลักษณะของเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 บน MRS agar และนำมาสกัดแยกดีเอ็นเอ (DNA extraction) โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) และนำมาทำการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) ใช้ primers ERIC1R (5'ATGTAAGCTCC-TGGGGATTCAC-3') และ ERIC2R (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') และเทียบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint pattern) ที่ได้กับต้นแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) เพื่อแสดงลักษณะประชากร ปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค เชื้อแลคโตบาซิลไลและจำนวนฟันผุ ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุม ใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางเมื่อมีการวัดซ้ำ (Two-way ANOVA with repeated measures) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และเชื้อแลคโตบาซิลไลที่เปลี่ยนแปลงไประหว่าง 2 กลุ่ม มีการติดตามการเปลี่ยนแปลงสภาวะของรอยโรคฟันผุ (Transition of caries) ที่เวลาเริ่มต้น เทียบกับที่เวลา 6 เดือน แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ มีการลุกลามของรอยโรคฟันผุ (Progression) สภาวะฟันผุคงที่ (Stable) และมีการคืนกลับของรอยโรคฟันผุ (Regression) การหาความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับโพรไบโอติกกับการเปลี่ยนแปลงสภาวะรอยโรคฟันผุ ใช้สถิติการทดสอบไคสแควร์เทสท์ (Chi-square test) กำหนดระดับนัยสำคัญของการทดสอบสมมติฐานที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.05 ($p<0.05$) ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

จากเด็กทั้งหมด 258 คน สามารถเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 100 คน เป็นเพศชาย 50 คน เพศหญิง 50 คน มีอายุเฉลี่ย 40.41±6.67 เดือน และมีฟันผุเป็นรูเฉลี่ย 2.37±2.27 ซี่ โดยแบ่งเป็นกลุ่มโพรไบโอติกจำนวน 51 คน และกลุ่มควบคุมจำนวน 49 คน เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานที่เวลาเริ่มต้น ได้แก่ อายุ เพศ จำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคในน้ำลาย และสภาวะฟันผุ ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุมพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

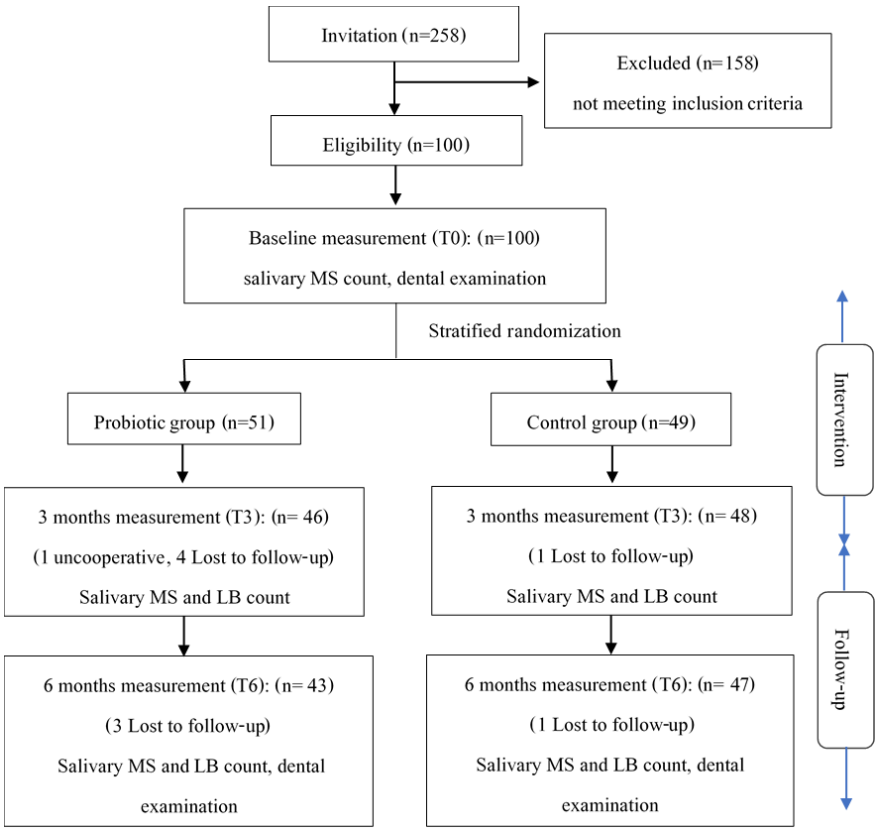
สถิติ ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 2) เมื่อสิ้นสุดการศึกษาพบกลุ่มตัวอย่างออกจากการศึกษา จำนวน 10 คน เนื่องจากลาออกจากศูนย์พัฒนาเด็กเล็ก 9 คน และมีพฤติกรรมไม่ร่วมมือและไม่สามารถเก็บน้ำลายได้ 1 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มโพรไบโอติก 8 คน (ร้อยละ 15) และกลุ่มควบคุม 2 คน (ร้อยละ 4) โดยมีแผนภูมิกระบวนการดำเนินการวิจัย (CONSORT Flow Diagram) (รูปที่ 1) และจากสมุดบันทึกการดื่มนม และผลข้างเคียงจากการดื่มนม พบว่าผู้เข้าร่วมทั้งหมดมีการดื่มนม มากกว่าร้อยละ 80

ตารางที่ 2 ลักษณะประชากรที่เวลาเริ่มต้น (T0)
Table 2 Population characteristics at baseline (T0)

Variables	Total (n = 100)	Probiotic group (n = 51)	Control group (n = 49)	p-value
Gender[a] n (%)				
Male	50 (100)	24 (47.06)	26 (53.06)	0.55
Female	50 (100)	27 (52.94)	23 (46.94)	
Age[b] (months ± SD)	40.41±6.67	40.43±6.83	40.39±6.58	0.97
Mutans streptococci[c] (log_{10}CFU/ml ± SD)	3.53±2.04	3.47±2.11	3.60±1.98	0.78
Dental caries[c] (tooth ± SD)				
Non-cavitated caries	3.68+3.37	3.18±2.89	4.14±3.74	0.31
Cavitated caries	2.37±2.27	2.33±2.08	2.40±2.46	0.90

[a]Chi-square test, [b] Independent t-test และ [c] Mann-Whitney U test
*significant difference ($p<0.05$)

รูปที่ 1 แผนภูมิกระบวนการดำเนินการวิจัย
Figure 1 Consort flow diagram



ผลของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และเชื้อแลคโตบาซิลไล เมื่อใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางเมื่อมีการวัดซ้ำเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ ระหว่างกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 และกลุ่มควบคุม ที่เวลาเริ่มต้น (T0) เวลา 3 เดือน (T3) และ 6 เดือน (T6) (ตารางที่ 3) โดยผลต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค พบว่าอิทธิพลระหว่างตัวแปรเรื่องเวลาและตัวแปรเรื่องกลุ่ม (Time-Group interaction) ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีขนาดอิทธิพล (Effect size) อยู่ในระดับปานกลาง ($p<0.05$, $\eta^2=0.04$) และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้ Post-hoc comparison โดยควบคุมด้วย Bonferroni correction พบว่าที่เวลา 3 เดือน และ 6 เดือน กลุ่มโพรไบโอติกมีปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลไล ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุม

เมื่อศึกษาสภาวะฟันผุที่เกิดขึ้น จำนวนด้านของฟันที่มีสภาวะฟันผุต่างๆ ที่เวลาเริ่มต้น (T0) และที่ 6 เดือน (T6) (ตารางที่ 4) โดยทั้งกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุม พบการผุส่วนใหญ่ (ร้อยละ 3.87-6.50 ของผิวฟันทั้งหมด) เป็นการเริ่มผุยังไม่เป็นรูแต่เห็นผิวเคลือบฟันเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนและเป็นการผุที่กำลังลุกลาม (Active caries) ลักษณะการผุที่พบรองลงมา (ร้อยละ 2.63-2.99 ของผิวฟันทั้งหมด) เป็นรอยผุเป็นโพรงชัดเจนลึกลงไปถึงชั้นเนื้อฟันและเป็นการผุที่กำลังลุกลาม เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะฟันผุจากเวลา T0 ถึงที่เวลา T6 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5) โดยพบว่าด้านฟันส่วนใหญ่มีการคงที่ของสภาวะฟันผุ (Stable) ทั้ง 2 กลุ่ม (ร้อยละ 93.61 ในกลุ่มโพรไบโอติกและร้อยละ 93.08 ในกลุ่มควบคุม) พบการลุกลามของรอยโรคฟันผุในกลุ่มโพรไบโอติก (ร้อยละ 3.48) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ร้อยละ 4.55) โดยรูปแบบการลุกลามส่วนใหญ่ คือ การเปลี่ยนแปลงจากผิวฟันปกติเปลี่ยนไปเป็นฟันผุระยะเริ่มต้น และพบการคืนกลับของรอยโรคฟันผุใกล้เคียงกันระหว่าง 2 กลุ่ม (ร้อยละ 0.7 ในกลุ่มโพรไบโอติกและร้อยละ 0.89 ในกลุ่มควบคุม)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และแลคโตบาซิลไลในน้ำลาย ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุม ที่เวลาเริ่มต้น (T0) 3 เดือน (T3) และ 6 เดือน (T6)

Table 3 The amounts of mutans streptococci and lactobacilli in saliva were compared between the probiotic group and the control group at baseline (T0), 3 months (T3), and 6 months(T6).

		Probiotic (n=43)	Control (n=47)		ANOVA		
		Mean±SD	Mean±SD	*P*		F	*ES*(η^2)
Mutans streptococci (log_{10}CFU/ml)	T0	3.43±2.18	3.53±1.99	0.82	G	4.95*	0.05
	T3	2.33±2.08	3.39±1.81	0.01*	T	3.97*	0.04
	T6	2.54±2.37	3.76±1.98	0.01*	T x G	3.81*	0.04
Lactobacilli (log_{10}CFU/ml)	T0	6.55±0.64	6.49±0.68	NS			
	T3	6.72±0.74	6.44±0.67				
	T6	6.69±0.58	6.48±0.73				

Two-way repeated measures analysis of variance
Main Effects: Time (T): T0, T3, T6 (within-subjects factor), Group (G): Probiotic/Control (between-subjects factor), Interaction: Time x Group (TxG)
ES, Effect size (η^2), interaction of Time x Group; η^2 = 0.01 (small), η^2 = 0.06 (medium), η^2 = 0.14 (large).
Post-hoc comparison (*P*) with Bonferroni correction: Probiotic compared with control within particular time
* significant difference ($p<0.05$), NS: not significant

ตารางที่ 4 จำนวนด้านของฟันที่มีสภาวะฟันผุต่าง ๆ ที่เวลาเริ่มต้น (T0) และที่ 6 เดือน (T6) ของกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุม
Table 4 The number of tooth surface with different caries condition at baseline (T0) and at 6 months (T6) in the probiotic group and control group.

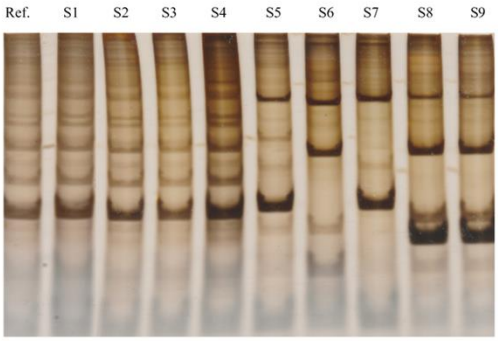
Modified ICDAS II		No. of tooth surface (%) at T0		No. of tooth surface (%) at T6	
		Probiotic	Control	Probiotic	Control
0	Sound	3430 (88.42)	3615 (87.11)	3417 (87.86)	3505 (84.36)
1	Distinct visual change in enamel (Inactive)	72 (1.86)	75 (1.81)	88 (2.26)	81 (1.95)
2	Distinct visual change in enamel (Active)	150 (3.87)	220 (5.30)	156 (4.01)	270 (6.50)
3	Localized enamel breakdown (Inactive)	5 (0.13)	10 (0.24)	12 (0.31)	38 (0.91)
4	Localized enamel breakdown (Active)	61 (1.57)	53 (1.28)	68 (1.75)	67 (1.61)
5	Underlying dentine shadow	0 (0)	1 (0.02)	2 (0.05)	2 (0.05)
6	Distinct cavity with visible dentine (Inactive)	2 (0.05)	28 (0.67)	16 (0.41)	52 (1.25)
7	Distinct cavity with visible dentin (Active)	102 (2.63)	124 (2.99)	116 (2.98)	123 (2.96)

ตารางที่ 5 จำนวนและร้อยละด้านฟันที่มีการเปลี่ยนแปลงด้านฟันผุ ที่เวลา 6 เดือน (T6) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น (T0)
Table 5 The number and percentage of teeth with transition of caries at 6 months (T6) compared to the baseline (T0).

Groups	Transition of caries (number of tooth surfaces, %)						
	surface at risk	progress		stable		regress	
		surfaces	%	surfaces	%	surfaces	%
Probiotic	3879	135	3.48	3631	93.61	27	0.70
Control	4150	189	4.55	3863	93.08	37	0.89
	p-value	0.036*					

Chi-square test, * significant difference ($p<0.05$)
Surface at risk คือ จำนวนด้านของฟันที่ขึ้นในช่องปากที่มีความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ

เมื่อศึกษาผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น และการคงอยู่ของเชื้อหลังจากการได้รับโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ตลอดการศึกษาไม่พบว่ามีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นจากการดื่มนม สำหรับผลการคงอยู่ของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ในช่องปาก โดยการค้นหาลักษณะเฉพาะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของเชื้อที่ได้มาจากตัวอย่างน้ำลายของกลุ่มตัวอย่างทั้งในกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมที่เวลา T6 ตัวอย่าง (รูปที่ 2) พบว่ามีการคงอยู่ของเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 อยู่ในช่องปากเด็กในกลุ่มโพรไบโอติกร้อยละ 11.11 (พบ 5 คน จากทั้งหมด 45 คน) ส่วนกลุ่มควบคุมตรวจไม่พบเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11



รูปที่ 2 รูปแบบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อ *Lactobacillus* จากอาสาสมัครในกลุ่มโพรไบโอติก 9 คน (S1-S9) ที่เวลาสิ้นสุดการศึกษา (T6) โดยอาสาสมัครจำนวน 4 คน (S1 S2 S3 และ S4) มีลักษณะลายพิมพ์ DNA เหมือนลายพิมพ์ DNA ของโพรไบโอติก *L. rhamnosus* SD 11 (Ref.)

Figure 2 DNA fingerprinting pattern of *Lactobacillus* of the 9 subjects in the probiotic group (S1-S9) at 6 months (T6), 4 subjects (S1, S2, S3, and S4) had DNA fingerprints similar to the probiotic DNA fingerprint pattern of *L. rhamnosus* SD 11 (Ref.)

บทวิจารณ์

เป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดฟันผุเป็นผลมาจากการเกิดภาวะความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ (Microbiome dysbiosis) ในช่องปาก และเกิดโรคขึ้นเมื่อเชื้อก่อโรคมีจำนวนมากจนเกินสมดุลที่ทำให้มีสุขภาพในช่องปากที่ดี[1] จึงเป็นที่มาของการมุ่งเป้าไปที่การจัดการหรือปรับสมดุลของจุลินทรีย์เหล่านั้น มีการศึกษาจำนวนมากที่พยายามหาโพรไบโอติกที่มีศักยภาพในการปรับสมดุลในช่องปากที่ส่งผลให้สามารถป้องกันหรือควบคุมการเกิดฟันผุ[7] โดยพบว่าความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ และสายพันธุ์ที่นำมาใช้ [7,22]

การป้องกันโรคฟันผุในเด็กเล็กสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งการใช้โพรไบโอติกเป็นการบำบัดด้วยแบคทีเรีย (Bacteriotherapy) เป็นวิธีหนึ่งที่พบว่ามีผลในการลดเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุ โดยการเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและวิเคราะห์อภิมาน (Systematic review and meta-analysis) พบว่าการได้รับโพรไบโอติกสามารถลดเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ในน้ำลายและในคราบจุลินทรีย์และสามารถลดการเกิดฟันผุได้ในช่วงที่มีการรับประทานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก[7] จากการศึกษาที่ผ่านมามีการนำแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัสมาใช้เพื่อป้องกันฟันผุในเด็กเล็กโดยเฉพาะสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี (*L. rhamnosus* GG หรือ SP1) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้า โดยพบว่าการใช้โพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี ในเด็กเล็กสามารถลดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคในน้ำลาย[19] และพบการลุกลามของโรคฟันผุในกลุ่มโพรไบโอติกน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[18,19] อย่างไรก็ตามบางการศึกษาไม่พบการลดลงของเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค หรือลดอัตราการเกิดฟันผุของกลุ่มโพรไบโอติกเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[16,17] ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากการที่เด็กในการศึกษามีอัตราการเกิดฟันผุต่ำและระยะเวลาที่ใช้ศึกษาไม่นานเพียงพอที่จะสามารถเห็นความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มได้ [17] รวมถึงการใช้โพรไบโอติกร่วมกับนมซึ่งมีแคลเซียมสูงอาจมีอิทธิพลต่อผลการศึกษาในการเพิ่มการคืนกลับแร่ธาตุของผิวฟัน[16]

การศึกษานี้พบว่าเมื่อเด็กเล็กได้รับนมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ทุกวันเป็นเวลา 3 เดือน สามารถลดปริมาณเชื้อ มิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ลงต่ำกว่าที่เวลาเริ่มต้นและต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อหยุดรับประทานไป 3 เดือน ก็ยังพบการลดลงของเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าในเด็กเล็ก เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 สามารถลดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ได้ทั้งในขณะที่ได้รับโพรไบโอติกนี้ และส่งผลต่อเนื่องจนถึงเมื่อหยุดรับประทาน นอกจากนี้พบว่าการใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 สามารถลดการลุกลามของการเกิดฟันผุในเด็กเล็กได้ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Rungsri และคณะ[14] ที่ศึกษาโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ในอาสาสมัครผู้ใหญ่ที่สุขภาพดี พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ได้ทั้งขณะที่ได้รับโพรไบโอติก 4 สัปดาห์ และหลังจากหยุดรับประทานไป 4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามไม่มีการติดตามผลต่อการเกิดฟันผุ เนื่องจากเป็นการศึกษาเบื้องต้นมีระยะการติดตามสั้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rodriguez และคณะในปี 2016[18] ที่ทำการศึกษาในเด็กอายุ 2-3 ปี โดยให้ดื่มนมที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสพี 1 เป็นระยะเวลา 10 เดือน พบว่ากลุ่มที่ได้รับนมโพรไบโอติกมีการลุกลามของโรคฟันผุน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hedayati-Hajikand และคณะในปี 2015[25] ที่ทำการศึกษาในเด็กอายุ 2-3 ปี เป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่า การลุกลามของรอยโรคฟันผุในกลุ่มโพรไบโอติกน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ผลชัดเจนในฟันผุระยะเริ่มต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีการนำโพรไบโอติกหลากหลายสายพันธุ์มาศึกษาผลต่อการลดเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค เพื่อหวังผลในการลดการเกิดโรคฟันผุในเด็กเล็ก ได้แก่แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส แลคโตบาซิลลัส เบรวิส (*L. brevis*) แลคโตบาซิลลัส รียูเทอรี (*L. reuteri*) และแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ (*L. casei*) เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาวิเคราะห์อภิมานของการใช้โพรไบโอติกป้องกันฟันผุในเด็กก่อนวัยเรียนของ Meng et al. 2023[22] วิเคราะห์กลุ่มย่อยตามการใช้โพรไบโอติกสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า กลุ่มของเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัสมีการลุกลามของฟันผุต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ในการป้องกันฟันผุ คาดว่าเกิดจากกลไกการทำงานของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัสที่สามารถยับยั้ง *S. mutans* ATCC 25175 ได้ดี[8] สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียในช่องปากได้[12] และ

สามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อในช่องปากและมีการยึดเกาะกับเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น ๆ (Aggregation) ได้ดี[13] ทำให้สามารถลดเชื้อก่อโรคฟันผุได้ และสามารถป้องกันการเกิดโรคฟันผุในช่องปากได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติก กลุ่มแลคโตบาซิลลัสยังสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่นการเพิ่ม secretory IgA[26] พบการเพิ่ม Anti-Microbial Peptide ชนิด human β-Defensin-3 (HβD-3) ในน้ำลาย ที่อยู่ในกลุ่มภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ (Innate immunity) ทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรค[27] พบการกระตุ้นการทำงานแมคโครฟาจ (Macrophage) และกระตุ้นการทำลายเซลล์โดยการฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis)[28] อย่างไรก็ตามผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้อาจเป็นผลที่เกิดเฉพาะสายพันธุ์ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์โพรไบโอติกที่ถูกคัดเลือก และยังควรมีการศึกษาเพื่อตอบคำถามในเรื่องของการนำไปใช้ เช่น ขนาด (Optimum dose) ความถี่ (Frequency) ที่เหมาะสมในการใช้โพรไบโอติก ผลต่อเนื่องที่เกิดขึ้นจากการใช้ในระยะยาวหรืออื่น ๆ ในอนาคต

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัด การเกิดฟันผุนั้นมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง แนวทางในการป้องกันโรคฟันผุสามารถทำได้ทั้งการลดปัจจัยก่อโรค เช่น การกำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยการแปรงฟันที่มีประสิทธิภาพ การใช้สารต้านแบคทีเรีย เช่น คลอเฮ็กซีดีน และการลดความถี่ในการบริโภคอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น และการเพิ่มปัจจัยป้องกันโรค เช่น การได้รับฟลูออไรด์ รวมถึงการใช้โพรไบโอติก[3] โดยในการศึกษานี้เป็นการศึกษาปัจจัยจากการใช้โพรไบโอติกเพียงปัจจัยเดียว โดยไม่ได้มีการควบคุมปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อโรคฟันผุ การนำผลการศึกษาไปใช้จึงควรคำนึงถึงข้อจำกัดเหล่านี้ด้วย และควรพิจารณาถึงการควบคุมปัจจัยเหล่านี้ หรือศึกษาผลร่วมที่เกิดขึ้นในการศึกษาต่อๆ ไป

การศึกษานี้พบว่ามีการคงอยู่ของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ถึงระยะเวลา 3 เดือนหลังจากหยุดรับประทานโพรไบโอติกไป แต่ก็พบเพียงร้อยละ 11 ของเด็กที่ได้รับเท่านั้น ซึ่งความสามารถในการคงอยู่และสามารถตั้งถิ่นฐาน (Colonization) ในช่องปาก เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการเป็นโพรไบโอติก[22] และเป็นคุณสมบัติที่ช่วยลดความจำเป็นของการรับโพรไบโอติกอย่างต่อเนื่องเพื่อคงประสิทธิภาพที่ต้องการ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่พบว่ามีโพรไบโอติกที่สามารถตั้งถิ่นฐานอย่างถาวรในช่องปากได้ [7]

จากการบันทึกการได้รับโพรไบโอติกในเด็กเล็กและผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นตลอดการศึกษานี้พบว่าได้รับความร่วมมือในระดับที่ดี โดยเด็กส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 80) เข้าร่วมจนสิ้นสุดโครงการ ในกลุ่มเด็กเล็กไม่พบผลข้างเคียงหรือภาวะแทรกซ้อนใด ๆ จากการได้รับโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ตลอดการศึกษา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rungsri และคณะในปี 2017[14] ที่ไม่พบผลข้างเคียงใดๆ กับกลุ่มอาสาสมัคร (20-25 ปี) ที่ได้รับเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 แม้ว่าการศึกษาส่วนใหญ่รายงานถึงความปลอดภัยในการใช้โพรไบโอติกหลากหลายสายพันธุ์[6,7,22] อย่างไรก็ตามพบรายงานผู้ป่วย (Case report) ของการติดเชื้อที่เกิดจากการได้รับโพรไบโอติก เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือด หรือติดเชื้อที่เยื่อบุหัวใจอักเสบ ซึ่งพบเพียง 48 รายจากการติดเชื้อแลคโตบาซิลลัส ที่รายงานในปี ค.ศ. 2019-2021 และมักพบเกี่ยวข้องกับการมีโรคทางระบบ หรือมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง[29,30] จึงจำเป็นที่ต้องมีการประเมินความปลอดภัยและผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นทุกครั้งที่มีการศึกษาการใช้โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเพื่อป้องกันฟันผุ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก สิ่งหนึ่งที่สำคัญคือตัวนำส่ง (Vehicle) ที่ใช้ เพื่อให้สามารถคงความมีชีวิตของโพรไบโอติกและง่ายต่อการนำไปใช้หรือบริโภค โพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้ดีในนม การใช้จึงมักอยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์นม (Dairy products) ได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (Drinking yogurt) ผสมในนม นมผง ไอศครีม เป็นต้น หรืออาจอยู่ในรูปแบบเป็นเม็ด (Tablets) เม็ดอม (Lozenges) จากการศึกษาวิเคราะห์อภิมานโดย Nadelman และคณะในปี 2018[31] พบว่าโพรไบโอติกในรูปแบบของเหลว ได้แก่ นม และโยเกิร์ต สามารถลดจำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ในอาสาสมัครได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับที่อยู่ในรูปแบบอื่น

รูปแบบโพรไบโอติกรูปแบบหนึ่งที่ง่ายต่อการนำไปใช้ คือ การทำให้เป็นผงแห้งโดยการนำโพรไบโอติกรูปแบบผลิตภัณฑ์ของเหลวไปทำให้แห้ง โดยการพ่นสเปรย์ (Spray dry) หรือการแช่แข็ง (Freeze dry) เพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์โพรไบโอติก การพ่นสเปรย์โดยใช้นมพร่องมันเนยเป็นสารตัวนำส่งจะสามารถป้องกันและส่งผลให้เซลล์โพรไบโอติกมีชีวิตรอดสูง ช่วยรักษาความสามารถของการเป็นโพรไบโอติก และทำให้สามารถจัดเก็บและคงคุณภาพได้อย่างน้อย 6 เดือน ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส[24] ในการศึกษานี้เป็นเด็กก่อนวัยเรียน จึงมีการใช้โพรไบโอติกในรูปแบบนมผง ซึ่งพบว่ามีความเหมาะสม ทั้งความสะดวกในการแจกจ่าย การเก็บรักษา และการนำไปใช้โดยผสมกับน้ำ หรือเติมในนมปกติที่เด็กได้รับ

จากประสิทธิภาพในการป้องกันโรคฟันผุและความปลอดภัยของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ในเด็กเล็ก ดังนั้นโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 จึงสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยเสริมการป้องกันฟันผุในเด็กเล็ก อย่างไรก็ตามประสิทธิผลของโพรไบโอติกสามารถเกิดขึ้นได้อย่างเต็มที่เมื่อได้รับผลิตพัณฑ์โพรไบโอติกเป็นประจำและอาจจำเป็นต้องใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน (Long term usage) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาระยะยาว (Long term study) ถึงประสิทธิผลและความปลอดภัยของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาใช้ในเด็ก นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาเพื่อการประเมินผลถึงนัยสำคัญในการนำไปใช้ทั้งในแง่การหาสัดส่วนที่ป้องกันได้ (Preventive fraction) และความคุ้มค่าของการใช้โพรไบโอติกนี้ในกลุ่มต่าง ๆ

บทสรุป

การได้รับผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 เป็นเวลา 3 เดือน สามารถลดเชื้อก่อโรคฟันผุ มิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และลดการลุกลามและสามารถป้องกันการเกิดฟันผุใหม่ในเด็กเล็กได้ ในระยะเวลาการศึกษา 6 เดือน และไม่พบผลข้างเคียงใด ๆ ในกลุ่มเด็กเล็กตลอดการศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนวิจัยเพื่อการศึกษาหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นันทิยา พาหุมันโต อาสาสมัคร ผู้ปกครอง และคุณครูทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Tinanoff N, Baez RJ, Diaz GC, Donly KJ, Feldens CA, McGrath C, et al. Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. Int J Paediatr Dent. 2019;29(3):238–48.
2. Bureau of Dental Health. The 9th National oral health survey report 2023 of Thailand. Bangkok: Aksorn graphic and design publishing;2024.
3. Soares RC, da Rosa SV, Moysés ST, Rocha JS, Bettega PVC, Werneck RI, et al. Methods for prevention of early childhood caries: overview of systematic reviews. Int J Paediatr Dent. 2021;31(3):394–421.
4. FAO/WHO working group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAOWHO Work Group. 2002;1–11.
5. Pramanik S, Venkatraman S, Karthik P, Vaidyanathan VK. A systematic review on selection characterization and implementation of probiotics in human health. Food Sci Biotechnol. 2023;32(4):423–40.
6. Homayouni RA, Pourjafar H, Mirzakhani E. A comprehensive review of the application of probiotics and postbiotics in oral health. Front Cell Infect Microbiol. 2023;(13):1120995.
7. Shi J, Wang Q, Ruan G, Chen Y, Zhao M, Shi D, et al. Efficacy of probiotics against dental caries in children: a systematic review and meta-analysis. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022;(24):1–18.
8. Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. Lett Appl Microbiol 2011;53(4):452–9.
9. Pahumunto N, Piwat S, Chankanka O, Akkarachaneeyakorn N, Rangsitsathian K, Teanpaisan R. Reducing mutans streptococci and caries development by *Lactobacillus paracasei* SD1 in preschool children: a randomized placebo-controlled trial. Acta Odontol Scand. 2018;76(5):331–7.

10. 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. Dent J. 2015;3(2):43–54.
11. Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus paracasei* SD1, a novel probiotic, reduces mutans streptococci in human volunteers: a randomized placebo-controlled trial. Clin Oral Investig. 2014;18(3):857–62.
12. Wannun P, Piwat S, Teanpaisan R. Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. Appl Biochem Biotechnol. 2016;179(4):572–82.
13. Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. Lett Appl Microbiol. 2015;61(1):98–105.
14. Rungsri P, Akkarachaneeyakorn N, Wongsuwanlert M, Piwat S, Nantarakchaikul P, Teanpaisan R. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: a randomized clinical trial. J Dairy Sci. 2017;100(10):7780–7.
15. Sandoval F, Faleiros S, Cabello R, Díaz-Dosque M, Rodríguez G, Escobar A. The consumption of milk supplemented with probiotics decreases the occurrence of caries and the salivary concentration of hβD-3 in children. Clin Oral Investig. 2021;25(6):3823–30.
16. Angarita-Díaz MP, Forero-Escobar D, Cerón-Bastidas XA, Cisneros-Hidalgo CA, Dávila-Narvaez F, Bedoya-Correa CM, et al. Effects of a functional food supplemented with probiotics on biological factors related to dental caries in children: a pilot study. Eur Arch Paediatr Dent. 2020;21(1):161–9.
17. Villavicencio J, Villegas LM, Arango MC, Arias S, Triana F. Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial. J Appl Oral Sci. 2018;26:e20170318.
18. Rodríguez G, Ruiz B, Faleiros S, Vistoso A, Marró ML, Sánchez J, et al. Probiotic compared with standard milk for high-caries children: a cluster randomized trial. J Dent Res. 2016;95(4):402–7.
19. 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 Res. 2001;35(6):412–20.
20. Piwat S, Teanpaisan R, Manmontri C, Wattanarat O, Pahumunto N, Makeudom A, et al. Efficacy of probiotic milk for caries regression in preschool children: a multicenter randomized controlled trial. Caries Res. 2020;54(5–6):491–501.
21. Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmontree A, Dahlén G. *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. Mol Oral Microbiol. 2010;25(2):157–64.
22. Meng N, Liu Q, Dong Q, Gu J, Yang Y. Effects of probiotics on preventing caries in preschool children: a systematic review and meta-analysis. J Clin Pediatr Dent. 2023;47(2):85–100.
23. Kadam P, Bhalerao S. Sample size calculation. Int J Ayurveda Res. 2010;1(1):55–7.
24. Piwat S, Pahumunto N, Srisommai P, Mapaisansin C, Teanpaisan R. Effect of probiotic delivery vehicles for probiotic *Lactobacillus rhamnosus* SD11 in caries prevention: A clinical study. J Food Process Preserv. 2019;43(10):e14147.
25. 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.

26. Pahumunto N, Sophatha B, Piwat S, Teanpaisan R. Increasing salivary IgA and reducing *Streptococcus mutans* by probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1: a double-blind, randomized, controlled study. J Dent Sci. 2019;14(2):178–84.
27. Wattanarat O, Nirunsittirat A, Piwat S, Manmontri C, Teanpaisan R, Pahumunto N, et al. Significant elevation of salivary human neutrophil peptides 1-3 levels by probiotic milk in preschool children with severe early childhood caries: a randomized controlled trial. Clin Oral Investig. 2021;25(5):2891–903.
28. Han SK, Shin YJ, Lee DY, Kim KM, Yang SJ, Kim DS, et al. *Lactobacillus rhamnosus* HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. BMC Microbiol. 2021; 21(1):146.
29. Rossi F, Amadoro C, Gasperi M, Colavita G. Lactobacilli infection case reports in the last three years and safety implications. Nutrients. 2022;14(6):1178.
30. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clin Infect Dis. 2003;36(6):775–80.
31. Nadelman P, Magno MB, Masterson D, da Cruz AG, Maia LC. Are dairy products containing probiotics beneficial for oral health? a systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig. 2018;22(8):2763–85.

ผู้ประพันธ์บรรณกิจ

สุพัชรินทร์ พิวัฒน์
สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110
โทรศัพท์ : 089 737 4488
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์ : supacharin@hotmail.com

KDJ Khon Kaen University Dental Journal

Clinical Outcomes of Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* SD11 Supplementation for Dental Caries Prevention in Young Children: A Randomized Controlled Trial

Natthinee Janwong [1,2] *Rawee Teanpaisan* [2,3] *Supatcharin Piwat* [1,2]

Research Article

Abstract

Objective: The objective of this double-blind randomized controlled trial was to assess the effect of the probiotic *L. rhamnosus* SD11 on salivary mutans streptococci and lactobacilli counts, and on dental caries in young children. The potential side effects and the persistence of this probiotic were also observed.

Materials and Methods: One hundred children aged 2 to 5 years were allocated into two groups: the probiotic group received milk powder containing 10^7 CFU/g of *L. rhamnosus* SD11, while the control group received standard milk powder. Three grams of milk powder were provided daily for 3 months. Compliance and side effects were recorded daily. Salivary mutans streptococci and lactobacilli counts were assessed at baseline, 3 months, and 6 months. Dental caries examination was conducted at baseline and at 6 months.

Results: The findings indicated a statistically significant reduction in salivary mutans streptococci in the probiotic group at both 3 and 6 months ($p<0.01$). However, no significant difference in lactobacilli counts was observed between the two groups. At 6 months, a significantly lower caries progression ($p=0.036$) was found in the probiotic group (3.48%) compared to the control group (4.55%). Additionally, the presence of the probiotic strain was noted in 11.11% of the children. No adverse effects were reported in either group.

Conclusion: The use of probiotic *L. rhamnosus* SD11 could be considered an option for reducing caries progression and preventing the occurrence of new cavities in young children.

Keywords: Probiotics/ *Lactobacillus rhamnosus* SD11/ Dental caries/ Primary teeth

Corresponding Author

Supatcharin Piwat

Department of Preventive Dentistry,

Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University,

Hat yai, Songkhla 90110

Tel. : +66 89 737 4488

E-mail : supacharin@hotmail.com

[1] *Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University.*

[2] *Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center, Prince of Songkla University.*

[3] *Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University.*

[*] *Corresponding Author*