เอกสารอ้างอิง

1. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. **Aust Dent J** 2008 Sep; 53(3): 286-91.
2. Mandel ID. Nature vs. nurture in dental caries. **J Am Dent Assoc** 1994 Oct; 125(10): 1345-51.
3. Stoodley P, Wefel J, Gieseke A, Debeer D, von Ohle C. Biofilm plaque and hydrodynamic effects on mass transfer, fluoride delivery and caries. **J Am Dent Assoc** 2008 Sep; 139(9): 1182-90.
4. Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review. **Br Dent J.** 1999 Mar 27; 186(6): 286-96.
5. Hong CH, daFonseca M. Considerations in the pediatric population with cancer. **Dent Clin North Am** 2008 Jan; 52(1): 155-81, ix.
6. McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. **J Am Dent Assoc** 2008 Feb; 139(2): 178-83.
7. Franco Neto CA, Parolo CC, Rosing CK, Maltz M. Comparative analysis of the effect of two chlorhexidine mouthrinses on plaque accumulation and gingival bleeding. **Braz Oral Res** 2008 Apr-Jun; 22(2): 139-44.
8. Keijser JA, Verkade H, Timmerman MF, Van der Weijden FA. Comparison of **2** commercially available chlorhexidine mouthrinses. **J Periodontol** 2003 Feb; 74(2): 214-8.
9. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Res** 2008; 42(6):409-18.
10. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol** 2005 Nov; 43(11): 5721-32.
11. Kerr WJ, Kelly J, Geddes DA. The areas of various surfaces in the human mouth from nine years to adulthood. **J Dent Res** 1991 Dec; 70(12): 1528-30.
12. สิทธิชัย ขุนทองแก้ว. **วิทยาการโรคฟันผุ.** 2nd ed. กรุงเทพฯ: ไอกรุ๊ป เพรส; 2552.
13. Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. **Clin Oral Investig.** 1999 Jun; 3(2): 88-95.
14. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. **Endod Topics** 2004; 9: 27-36.
15. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. **J Am Dent Assoc** 2006 Nov;137 Suppl:10S-5S.
16. Takeuchi H, Yamamoto K. Ultrastructural analysis of structural framework in dental plaque developing on synthetic carbonate apatite applied to human tooth surfaces. **Eur J Oral Sci** 2001; 109: 249-59.
17. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol** 1993 Jun; 175(11): 3247-52.

18. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2002 Sep; 66(3): 486-505, table of contents.

19. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol** 2003 Feb; 11(2): 94-100.

20. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev.** 1986 Dec; 50(4): 353-80.

21. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res.** 1994 Jul; 8(2): 263-71.

22. Dawes C, Dibdin GH. A theoretical analysis of the effects of plaque thickness and initial salivary sucrose concentration on diffusion of sucrose into dental plaque and its conversion to acid during salivary clearance. **J Dent Res** 1986 Feb; 65(2): 89-94.

23. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. **J Dent Educ** 2001 Oct; 65(10): 1028-37.

24. Thorild I, Lindau B, Twetman S. Salivary mutans streptococci and dental caries in three-year-old children after maternal exposure to chewing gums containing combinations of xylitol, sorbitol, chlorhexidine, and fluoride. **Acta Odontol Scand** 2004 Oct; 62(5): 245-50.

25. Roberts A. Bacteria in the mouth. **Dent update** 2005; 32: 134-42.

26. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Res** 2011 Feb 23; 45(1): 69-86.

27. Silverman S, Wilder R. Antimicrobial mouthrinse as a part of a comprehensive oral care regimen safety and compliance factors. **JADA.** 2006; 137: 22S-6S.

28. Micheal LB. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. **JADA.** 2006; 137: 16S-21S.

29. McDonald ER, Avery RD, Dean AJ. **Dentistry for the child and adolescent**. 8th, editor. India: Elsevier; 2004.

30. Davies A, Finlay I. Oral care in advanced disease. Great Britain: Oxford University Press; 2005.

31. Mandel ID. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. **J Clin Periodontol.** 1988 Sep; 15(8): 488-98.

32. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res.** 1992 Jul;71(7):1431-8.

33. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. **J Clin Periodontol.** 2002 Nov; 29(11): 965-74.

34. Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. **J Periodontal Res Suppl.** 1973; 12: 55-60.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

35. Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. **J Clin Periodontol.** 1981 Aug; 8(4): 295-310.

36. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. **J Am Dent Assoc**. 2006 Dec; 137(12): 1649-57.

37. Cronan CA, Potempa J, Travis J, Mayo JA. Inhibition of Porphyromonas gingivalis proteinases (gingipains) by chlorhexidine: synergistic effect of Zn(II). **Oral Microbiol Immunol** 2006 Aug; 21(4): 212-7.

38. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. **Antimicrob Agents Chemother.** 1993 May; 37(5): 1158-9.

39. Keltjens HM, Creugers TJ, Schaeken MJ, Van der Hoeven JS. Effects of chlorhexidine-containing gel and varnish on abutment teeth in patients with overdentures. **J Dent Res.** 1992 Sep; 71(9): 1582-6.

40. Emilson CG. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. **J Dent Res** 1994 Mar; 73(3): 682-91.

41. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. **Dent Mater.** 2006 Jul; 22(7): 647-52.

42. Galili D, Donitza A, Garfunkel A, Sela MN. Gram-negative enteric bacteria in the oral cavity of leukemia patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1992 Oct; 74(4): 459-62.

43. Breslin PA, Tharp CD. Reduction of saltiness and bitterness after a chlorhexidine rinse. **Chem Senses.** 2001 Feb; 26(2):105-16.

44. Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Physiol Behav.** 2001 Sep 1-15;74(1-2): 85-99.

45. Helms JA, Della-Fera MA, Mott AE, Frank ME. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Arch Oral Biol.** 1995 Oct;40(10):913-20.

46. Kolahi J, Soolari A. Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. **Quintessence Int.** 2006 Sep; 37(8): 605-12.

47. Van Strydonck DA, Demoor P, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. The anti-plaque efficacy of a chlorhexidine mouthrinse used in combination with toothbrushing with dentifrice. **J Clin Periodontol** 2004 Aug; 31(8): 691-5.

48. Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brecx M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. **J Periodontal Res.** 2005 Oct;40(5):373-7.

49. Giertsen E, Scheie AA, Rolla G. Inhibition of plaque formation and plaque acidogenicity by zinc and chlorhexidine combinations. **Scand J Dent Res.** 1988 Dec; 96(6): 541-50.

50. Vandekerckhove B, Steenberghe D, Tricio J, Rosenberg D, Encarnacion M. Efficacy on supragingival plaque control of cetylpyridinium chloride in a slow-release dosage form. **J Clin Periodontol.** 1992; 22: 824-9.

51. Busscher HJ, White DJ, Atema-Smith J, Geertsema-Doombusch G, Vries J. Surfactive and antibacterial activity of cetylpyridinium chloride formulation in vitro and in vivo. **J Clin Periodontol.** 2008; 35: 547-54.

52. Charles SC, Cronin JM, Conforti JN, Dembling ZW, Petrone MD, McGuire AJ. Anticalculus efficacy of an antiseptic mouthrinse containing zinc chloride. **J Am Dent Assoc**. 2001; 132: 92-8.

53. Thrane PS, Young A, Jonski G, Rolla G. A new mouthrinse combining zinc and chlorhexidine in low concentrations provides superior efficacy against halitosis compared to existing formulations: a double-blind clinical study. **J Clin Dent.** 2007; 18(3): 82-6.

54. Krespi YP, Shrime MG, Kacker A. The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2006 Nov; 135(5): 671-6.

55. Phan TN, Buckner T, Sheng J, Baldeck JD, Marquis RE. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. **Oral Microbiol Immunol.** 2004 Feb; 19(1): 31-8.

56. Smullen J, Koutsou AG, Foster AH, Zumbe A, Storey MD. The Antibacterial Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols against *Streptococcus mutans.* **Caries Res**. 2007; 41: 342-9.

57. Haffajee DA, Yaskell T, Socransky SS. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. **J Am Dent Assoc.** 2008; 139(5): 606-11.

58. Nuuja T, Meurman JH, Torkko H. Xylitol and the bactericidal effect of chlorhexidine and fluoride on *Streptococcus mutans* and Streptococcus sanguis. **Acta Odontol Scand**. 1993 Apr; 51(2): 109-14.

59. Decker EM, Maier G, Axmann D, Brecx M, von Ohle C. Effect of xylitol/chlorhexidine versus xylitol or chlorhexidine as single rinses on initial biofilm formation of cariogenic streptococci. **Quintessence Int.** 2008 Jan;39(1):17-22.

60. Steinberg D, Heling I, Daniel I, Ginsburg I. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against Streptococcus sobrinus, Streptococcus faecalis and Staphylococcus aureus. **J Oral Rehabil.** 1999 Feb; 26(2): 151-6.

61. Storeklagen S, OSE N, Midha S. **Dentifrices and mouthwashes ingredients and their use**. Oslo: Oslo university; 2003.

62. Pihlanto-Leppala A, Soderling E, Makinen KK. Expulsion mechanism of xylitol 5-phosphate in *Streptococcus mutans*. **Scand J Dent Res.** 1990 Apr;98(2):112-9.

63. Berenbaum MC. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. **Adv Cancer Res.** 1981; 35: 269-335.

64. Botelho MG. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. **J Dent.** 2000 Nov; 28(8): 565-70.

65. EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin Microbiol Infect. 2000 Sep;6(9):503-8.

66. Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. **J Clin Periodontol**. 2005 Mar; 32(3): 305-9.

67. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiol Immunol**. 2005 Aug; 20(4): 221-5.

68. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Arch Oral Biol.** 2001 Jun; 46(6): 477-86.

69. Filoche SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. **J Microbiol Methods.** 2007 Jun; 69(3): 489-96.

70. McDaid O, Stewart-Knox B, Parr H, Simpson E. Dietary zinc intake and sex differences in taste acuity in healthy young adults. **J Hum Nutr Diet.** 2007 Apr; 20(2): 103-10.

71. สุวิมล ติรกานันท์. **สถิตินันพาราเมตริก**. 1st ed. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553.

72. Stier R. **Taste-making actives; Masking bitter taste of pharmaceutical actives**. [cited]; Available from: http://www.gelfix.com/documents/Taste_Masking_Actives.pdf.

73. Özdemir A, Sayal A, Akca A, Aydin A. The determine of salivary zinc level following delivery from zinc containing toothpaste. **Tr J of medical sciences.** 1998; 28: 281-3.

74. Campos D, Jr., Veras Neto MC, Silva Filho VL, Leite MF, Holanda MB, Cunha NF. [Zinc supplementation may recover taste for salt meals]. **J Pediatr (Rio J)**. 2004 Jan-Feb; 80(1): 55-9.

75. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002 May; 46(5): 1302-9.

76. Hernandez-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martinez-Gutierrez F, Martinez AE, Guillen Ade J, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine**. 2008 Sep; 4(3): 237-40.

77. Bonaβace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2002 Dec; 44(4): 363-6.

78. Waler SM, Rolla G. Plaque inhibiting effect of combinations of chlorhexidine and the metal ions zinc and tin. A preliminary report. **Acta Odontol Scand.** 1980; 38(4): 213-7.

79. Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brecx M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on Streptococcus sanguinis. **Eur J Oral Sci**. 2003 Apr;111(2): 144-8.

80. Reed DR, Tanaka T, McDaniel AH. Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. **Physiol Behav.** 2006 Jun 30; 88(3): 215-26.

81. Pieroni A, Torry B. Does the taste matter? Taste and medicinal perceptions associated with five selected herbal drugs among three ethnic groups in West Yorkshire, Northern England. **J Ethnobiol Ethnomed.** 2007; 3: 21.

82. Faas MM, Melgert BN, de Vos P. A Brief Review on How Pregnancy and Sex Hormones Interfere with Taste and Food Intake. **Chemosens Percept.** 2010 Mar; 3(1): 51-6.

ภาคผนวก

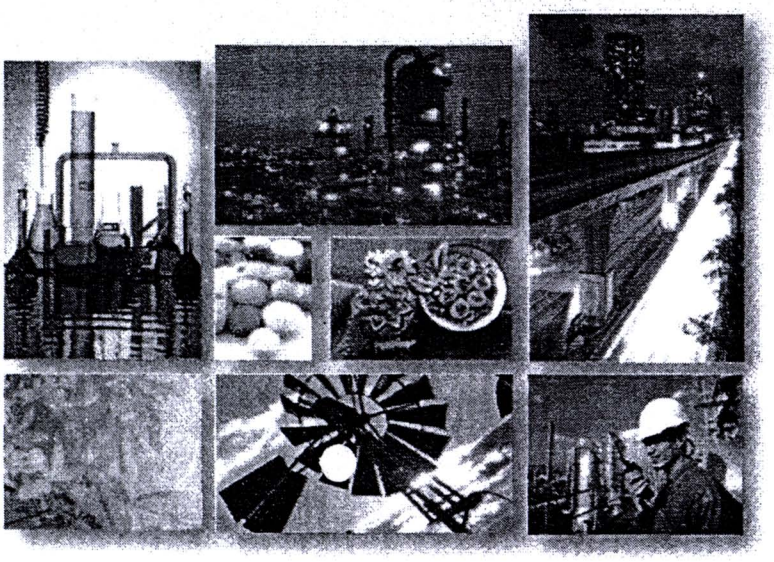
ภาคผนวก ก
บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในเอกสารประชุมวิชาการ

การประชุมวิชาการ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 5

TRF-Master Research Congress V

วันที่ 30 มีนาคม - 1 เมษายน 2554

โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
The Thailand Research Fund

ISBN 978-616-7070 59-9

การนำเสนอแบบปากเปล่า

Marine III

9.30 - 9.45	การพัฒนาวิธีตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนส จาก EGFR เพื่อใช้ในการคัดสรรหายาขับยั้งมะเร็ง	อ.ดร.เกียรติทวี ชุวงศ์โกมล	นางสาวศิริเกษ ฤาทัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	บัดโครงการ
9.45 - 10.00	การวิเคราะห์หาตำแหน่งที่สามารถเป็นเป้าหมายของยาต้านไวรัสบนโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก	1. รศ.ดร.พรทิพภา เล็กเจริญสุข 2. อ.ดร.เกียรติทวี ชุวงศ์โกมล	นายกรภพ คล้ายวงษ์	โครงการสหวิทยาการ ภาควิชาพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	บัดโครงการ

รับประทานอาหารว่าง (เสริฟในห้องประชุม)

Chairperson: อ.ดร.จันทร์ดี ระแบบเลิศ

10.00 - 10.15	การเกิดฟองอากาศและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุพิมพ์ปากอัลจิเนตที่ได้รับการผสมด้วยวิธีที่แตกต่างกัน	1. อ.ดร.สุคนธ์ทิพย์ อาริชนาการ 2. รศ ดร ปาชัย ชุชสันติสกุลชัย 3. รศ.ดร.สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์ 4. ผศ ดร.ชาญณรงค์ สายแก้ว	นายกิรติ รัตนะกนกชัย	ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	บัดโครงการ
10.15 - 10.30	การตอบสนองของเซลล์ T lymphocyte ต่อสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der f 2 ในคนไทย	1. อ.ดร.จันทร์ดี ระแบบเลิศ 2. ผศ ดร.ณัฐ มาลัยนวล	นายดวงเทพ ทองดี	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร	รายงาน ความก้าวหน้า
10.30 - 10.45	การวิเคราะห์หาคุณสมบัติต่อต้านมะเร็งตับและ ฤทธิ์ต้านไวรัสในผักบ้านของไทย	อ.ดร.ณัฐนันท์ ปัญจวรัญาณ	นางสาววรรณวิสา ไวยพุฒ	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	รายงาน ความก้าวหน้า
10.45 - 11.00	ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการเสริมฤทธิ์ การดานไบโอฟิล์มความหนาเพาะต่อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และรสชาติ	1. ผศ ดร.สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์ 2. อ.ดร.ปฏิมาพร พึงขาญชัยกุล	นางรสริน สมประสงค์	ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	รายงาน ความก้าวหน้า
11.00 - 11.15	การออกแบบอุปกรณ์สำหรับการเฝ้าระวังผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคการกระจายหน้าคลื่นเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์ข้อมูลพร้องและ	1. ผศ ดร.นภิสพร นิมงคล 2. อ.ดร วรรณรัช สันติอนรทัด	นายพีรยุ จันทร์สอง	ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	รายงาน ความก้าวหน้า
11.15 - 11.30	ประสิทธิภาพของแอนโทไซยานิน โคโปรพอร์ไฟริน กับอิริโทรซินในการสร้างรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์และการฆ่า พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสในไบโอฟิล์มโดยการบำบัดด้วยโฟโตไดนามิกส์ในหลอดทดลอง	1. รศ อรณ ทีรธพงศ์ 2. ผศ.ดร นพวรรณ ภูมาลา มอราเลส	นายเพิ่มรัตนะ สิริระเหวิน	ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	รายงาน ความก้าวหน้า
11.30 - 11.45	สารสนเทศเพื่อการพัฒนาทรัพยากรมนุษย์แห่งการเรียนรู้ของศูนย์บริการลูกค้า เอสซีที โกลบอล จำกัด (มหาชน)	1. อ ดร ทวิลิปี กุลนภาดล 2. ผศ.ดร อำนวย ปาอำย	นางสาวสมาลี พวงทอง	ภาควิชาสังคมศาสตร์เพื่อการพัฒนา คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์	บัดโครงการ

Effects of Improved Chlorhexidine Mouthwash on Synergy, Antiplaque Activity, Substantivity, Specificity for Mutans Streptococci, and Taste Preference

Rossarin Somprasong,[a] Patimaporn Pungchanchaikul [b] and Somkiat Luengpailin[c]

[a] *Master of Science student, Department of Paediatric Dentistry, Faculty of dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*

[b] *Department of Paediatric Dentistry, Faculty of dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*

[c] *Asst. Prof. Department of Oral biology, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*

Introduction and Objective

Antiseptic mouthwash containing chlorhexidine (CHX) is the gold standard for anti-plaque and anti-gingivitis.[1] It is commonly prescribed to temporarily sustain healthy oral hygiene, for patients who are susceptible for systemic infection *e.g.* those undergoing chemotherapy.[2] This is due to its properties in controlling dental-plaque formation by affecting on cariogenic bacteria. However, it has bitter taste therefore lowering patient's compliance, especially in paediatric patients. Retention time is crucial in order to prolong therapeutic activities for a period of time after a 30 second rinsing. Our study aims to formulate a CHX mouthwash, which remains highly effective in anti-bacterial but its taste is improved.

Methods

Analyses for antibacterial and anti-adhesion activities of mouthwashes against biofilms were determined by SYTO®9/propidium iodide dual fluorescent staining and plate count technique. Antibacterial activity of three mouthwashes was determined at 0, 2, 4, 8 and 12 hours after treatment in comparison with untreated control. Visual analogue scale was exploited to compare taste preference between original and 2 modified mouthwashes in 56 volunteers.

Results

The ratio of live/dead micro-organisms and numbers of bacteria of three mouthwash-treated groups are statistically significant decreased when compared antibacterial and anti-adhesion activities with untreated control group ($p>0.05$). However, there is no statistically significant difference when compared amongst all the treated groups ($p<0.05$). There is no statistically different of the visual analogue scale of taste preference of the original and 2 modified mouthwash ($p>0.05$).

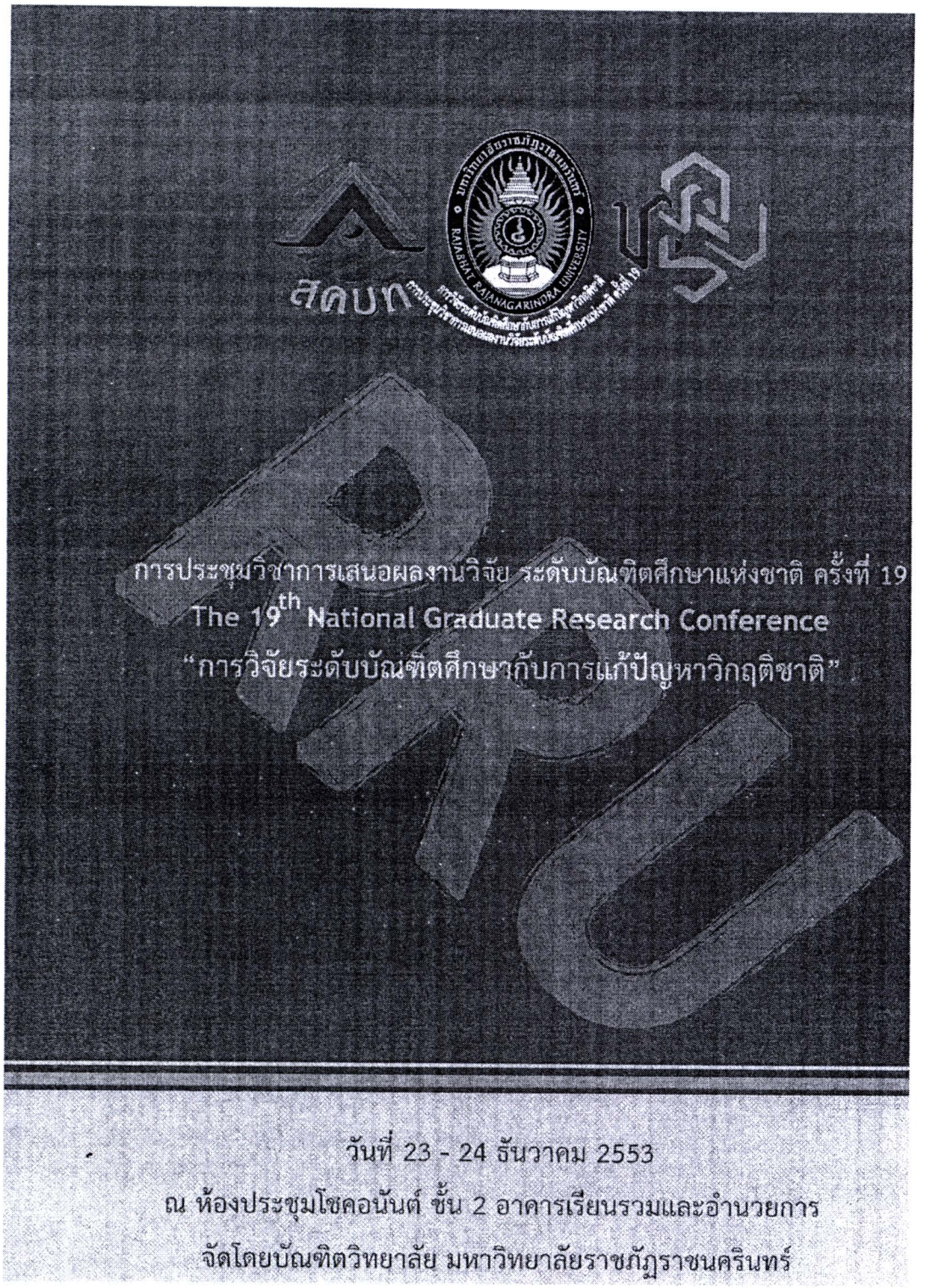
Conclusion

The result derived from bioflims models, mimicking oral condition, suggests that the original and 2 modified mouthwashes are not different in both anti-plaque activity and in taste preference, but the modified formula contained lower chlorhexidine concentration as compared to the original mouthwash. Further clinical trials should be conducted to determine the effectiveness in reducing dental plaque and side effects of the modified mouthwashes.

Keywords: chlorhexidine mouthwash, live/dead cell ratio, anti-plaque activity, taste preference

Selected References:

1. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. J Am Dent Assoc. 2006 Dec;137(12):1649-57.
2. Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review. Br Dent J. 1999 Mar 27;186(6):286-96.


สดบท
การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 19
The 19th National Graduate Research Conference
"การวิจัยระดับบัณฑิตศึกษากับการแก้ปัญหาวิกฤติชาติ"
วันที่ 23 - 24 ธันวาคม 2553
ณ ห้องประชุมโชคอนันต์ ชั้น 2 อาคารเรียนรวมและอำนวยการ
จัดโดยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์

สารบัญ (ต่อ)

กลุ่มมนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ และบริหารธุรกิจ

56 ประสบการณ์การด้านจิตใจของพ่อแม่เลี้ยงเดี่ยวในการเลี้ยงลูกบุตร : การศึกษาเชิงคุณภาพ 518
สุชาดา สร้อยสน

57 การบริหารจัดการขององค์การบริหารส่วนตำบล ด้านการพัฒนาและส่งเสริมคุณภาพชีวิตที่มีผลต่อความพึงพอใจของประชาชนในจังหวัดอ่างทอง 526
เพชรรัตน์ ทองหยอด

58 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพชีวิตการทำงานกับความผูกพันต่อองค์การ ของหมู่งานมหาวิทยาลัย สายสนับสนุนวิชาการ มหาวิทยาลัยบูรพา 533
มาธวี เลิกทำ

59 ความสำคัญส่วนประสมการตลาดที่มีต่อพฤติกรรมการท่องเที่ยวที่ตลาดน้ำวัดสำพญา อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม 543
พัชนี อยู่เย็น

60 ผลกระทบของร่างมาตรฐานการบัญชีอสังหาริมทรัพย์เพื่อการลงทุนที่มีต่องบการเงิน : กรณีธุรกิจพัฒนาอสังหาริมทรัพย์ที่จดทะเบียนในตลาดหลักทรัพย์แห่งประเทศไทย 549
วาสนา เตียวงษ์สมุทร

กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ

61 ผลของการจัดการเรียนการสอนแบบบูรณาการที่มีต่อผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่องโภชนาการ ของนักเรียนประถมศึกษาปีที่ 4 560
เอกราช ดีเลิศ

62 ความสัมพันธ์ระหว่างโรคปริทันต์กับโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ 571
ชัญญารัตน์ โชควิริยะจิตต์

63 ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม และความจำเพาะต่อ มิว แทน สเตรปโตคอกไก 578
รสริน สมประสงค์

64 การพัฒนาหลักสูตรวิทยาศาสตร์สุขภาพสำหรับผู้สูงอายุ 587
ลัดรชัย ประภัศร

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เกษตร สิ่งแวดล้อม

65 หนองหานกุมภวาปี – ความเป็นไปได้ในการใช้ข้อมูลจากตะกอนเพื่อบ่งชี้ถึงความรุนแรงของมรสุมโบราณ 599
วิชุราศรี กลับแสง

66 การศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง 608
เยาวลักษณ์ เจริญสุข

การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 19
"การวิจัยระดับบัณฑิตศึกษากับการแก้ปัญหาวิกฤติชาติ"

O-HS03

ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม และความจำเพาะต่อมิวแทนส์ สเตรปโตคอกไค

EFFECTS OF IMPROVED CHLORHEXIDINE MOUTHWASH ON THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST BIOFILMS AND SPECIFICITY FOR MUTANS STREPTOCOCCI

นางรสริน สมประสงค์/ดร.สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์/ดร.ปฏิมาพร พึ่งชาญชัยกุล

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนสูตรปรับปรุงกับสูตรดั้งเดิมต่อการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม และความจำเพาะต่อมิวแทนส์ สเตรปโตคอกไค **วิธีการวิจัย:** ทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่างคลอร์เฮกซิดีนกับซิงค์คลอไรด์ในการยับยั้งสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยวิธี broth dilution method และทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มด้วยวิธีการย้อมสี SYTO^{R}9/propidium iodide dual fluorescent staining และวิธีการนับโคโลนีบนวุ้นเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติ One-way ANOVA หรือ Kruskal Wallis Test ในการเปรียบเทียบผลของน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุง ต่ออัตราส่วนจำนวนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์ม และอัตราส่วนของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอกไคต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด และต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอกไคทั้งหมด **ผลการทดลอง:** น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนสูตรปรับปรุง0.12% และ 0.08% สามารถลดอัตราส่วนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.005$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (น้ำกลั่น) โดยสามารถลดได้เป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เทียบกับค่าก่อนใช้น้ำยาบ้วนปาก และมีผลต่อความจำเพาะในการฆ่าเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอกไค ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิม **อภิปราย:** น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน 0.08% สูตรปรับปรุงให้มีรสชาติดีขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะสามารถเพิ่มความร่วมมือของผู้ป่วยในการใช้น้ำยาบ้วนปากได้ โดยยังคงรักษาประสิทธิภาพได้ใกล้เคียงกับสูตรดั้งเดิม

ABSTRACT

Objective: To compare efficiency of modified and original chlorhexidine (CHX) mouthwashes on the antibacterial activity against biofilms and specificity for mutans streptococci. **Methods:** Analysis of synergistic effect between CHX and $ZnCl_2$ on the inhibition of *S. mutans* was carried out by broth dilution method. Antibacterial activity of mouthwashes against biofilms was determined by SYTO^{R}9/propidium iodide dual fluorescent staining and plate count technique. Data were analyzed using One-way ANOVA. **Results:** Both modified 0.12% and 0.08% CHX mouthwashes significantly reduced live/dead ratio in treated biofilms ($p = 0.005$) compared to negative control (deionized water). The ratio was lower than that before rinse for at least 4 h. Specific effect for mutans streptococci was insignificantly decreased in modified mouthwashes compared to the original formula. **Discussion:** The 0.08% CHX mouthwash modified in this study for better taste would promote patient compliance while keeping the original high efficiency.

วันพฤหัสบดีที่ 23-วันศุกร์ที่ 24 ธันวาคม 2553

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์

บทนำ

การควบคุมคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิล์มเพื่อป้องกันโรคฟันผุและโรคปริทันต์สามารถทำได้ทั้งทางกลและทางเคมี วิธีทางกลได้แก่ การขบเคี้ยวฟัน และการใช้ไหมขัดฟัน ส่วนวิธีทางเคมีได้แก่ การใช้ยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือควบคุมคราบจุลินทรีย์ (R. M. Davies, 2008; Eley, 1999; Gunsolley, 2006) วิธีทางกลซึ่งใช้กันเป็นประจำนั้นมีข้อจำกัดในคนบางกลุ่ม เช่น ผู้สูงอายุที่มีปัญหาในการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ ผู้พิการมือหรือแขน ผู้ป่วยหลังการรักษาโดยวิธีศัลยกรรมในช่องปาก ผู้ป่วยที่มีภาวะความผิดปกติของขากรรไกรที่ทำให้อ้าปากไม่ได้ ผู้ป่วยโรคทางระบบที่ทำให้ไม่สามารถแปรงฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ผู้ป่วยโรคเลือดที่มีเกล็ดเลือดต่ำและมีเลือดออกผิดปกติเมื่อได้รับการสัมผัสหรือกระแทกจากแปรงสีฟันหรือไหมขัดฟัน เป็นต้น (Hong & daFonseca, 2008) ในกลุ่มคนเหล่านี้การใช้น้ำยาบ้วนปากจะมีความสำคัญมากเพราะต้องใช้ทดแทนในช่วงเวลาที่ไม่สามารถแปรงฟันและใช้ไหมขัดฟันได้

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อในช่องปากที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะในเด็ก สาเหตุหลักของโรคเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ สเตรปโตคอกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับจุลินทรีย์อื่นๆ ในไบโอฟิล์ม (Loesche, 1986) เชื้อกลุ่มนี้ผลิตกรดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะน้ำตาล กรดแลคติกที่ผลิตออกมาสามารถทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุที่ผิวฟันและเกิดรอยโรคฟันผุตามมาได้ (Featherstone, 2008) คลอร์เฮ็กซิดีนเป็นสารยับยั้งเชื้อที่มีความจำเพาะต่อสเตรปโตคอกคัส มิวแทนส์ (Jarvinen, Tenovuo, Huovinen, 1993) จึงมีการนำสารนี้มาใช้ในการป้องกันโรคฟันผุ

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งคราบจุลินทรีย์ได้มากที่สุด (Gunsolley, 2006) แต่มีข้อด้อยที่สำคัญ ได้แก่ มีรสชาติขม ทำให้เกิดการติดสีบนตัวฟันและลิ้น และหากใช้เป็นเวลานานอาจมีการสูญเสียการรับรส (Eriksen, Nordbo, Kantanen, & Ellingsen, 1985; Hepso, Bjornland, & Skoglund, 1988) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนจึงถูกควบคุมให้สั่งจ่ายโดยบุคลากรทางการแพทย์ โดยทันตแพทย์จะสั่งจ่ายให้แก่ผู้ป่วยสังกล่าวข้างต้นที่ไม่สามารถแปรงฟันได้และให้ใช้ในระยะเวลาสั้นๆเท่านั้น อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมักไม่นิยมใช้ (Hepso et al., 1988) เนื่องจากข้อด้อยต่างๆของคลอร์เฮ็กซิดีน ความร่วมมือและประสิทธิภาพในการใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนจึงลดลง

มหาวิทยาลัยขอนแก่นใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 0.12% ที่ผลิตเอง แต่ผลิตภัณฑ์ยังมีข้อด้อยดังที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะปรับปรุงสูตรน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสำหรับจ่ายแก่ผู้ป่วยเพื่อเพิ่มความร่วมมือในการใช้น้ำยาบ้วนปากและให้ผลการรักษาดีขึ้น โดยการใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสให้มีรสชาติที่ยอมรับได้มากกว่าเดิม และหาสารออกฤทธิ์ร่วมที่มีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์หรือทดแทนฤทธิ์ของคลอร์เฮ็กซิดีน ที่ทำให้สามารถลดความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนในน้ำยาบ้วนปากลดลงได้โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในไบโอฟิล์ม

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนระหว่างสูตรปรับปรุงกับสูตรดั้งเดิมต่อการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม และความจำเพาะต่อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบการออกฤทธิ์เสริมในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

ทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่างคลอร์เฮกซิดีน (สารออกฤทธิ์หลัก) กับ ซิงค์คลอไรด์ (สารออกฤทธิ์รอง) โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration หรือ MIC) สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ UA159 โดยใช้วิธี broth dilution method แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่า FIC (fractional inhibitory concentration index) ตามเกณฑ์ของสมาคมจุลชีววิทยาแห่งสหรัฐอเมริกา ดังนี้

$$FIC_{\text{สารออกฤทธิ์หลัก}} = MIC_{\text{สารออกฤทธิ์หลักในส่วนผสมระหว่างสารออกฤทธิ์หลักกับสารออกฤทธิ์รอง}} / MIC_{\text{สารออกฤทธิ์หลักอย่างเดียว}}$$

$$FIC_{\text{สารออกฤทธิ์รอง}} = MIC_{\text{สารออกฤทธิ์รองในส่วนผสมระหว่างสารออกฤทธิ์หลักกับสารออกฤทธิ์รอง}} / MIC_{\text{สารออกฤทธิ์รองอย่างเดียว}}$$

$$\Sigma FIC = FIC_{\text{สารออกฤทธิ์หลัก}} + FIC_{\text{สารออกฤทธิ์รอง}}$$

การแปลผล

ถ้า $\Sigma FIC \leq 0.5$ หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กัน เมื่อนำมาผสมกันจะทำให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆเพิ่มขึ้นจากการใช้สารชนิดเดียว หรือมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆเท่าเดิมแต่ใช้สารปริมาณลดลงกว่าเดิม

ถ้า $0.5 < \Sigma FIC \leq 4$ หมายถึง สารทั้งสองชนิดไม่มีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กัน เมื่อนำมาผสมกันจะทำให้มีผลลัพธ์ไม่แตกต่างจากผลรวมที่เกิดจากสารแต่ละชนิด

ถ้า $\Sigma FIC > 4$ หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านกัน เมื่อนำมาผสมกันจะทำให้มีคุณสมบัติในการต้านต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆลดลงจากเดิม

การเตรียมน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนสูตรปรับปรุง

เตรียมน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนสูตรปรับปรุง 2 สูตร โดยสูตรปรับปรุง 1 มีความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีน 0.12% เท่าเดิม และสูตรปรับปรุง 2 มีความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีน ลดลงจากเดิมเหลือ 0.08%

นอกจากนี้น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงยังประกอบด้วยสารประกอบพื้นฐานอื่น ดังนี้ 1) สารป้องกันการยกตัว 1-2% ได้แก่ โพลียูริธีนไกลคอล 2) สารให้ความชุ่มชื้น 20-35% ได้แก่ กลีเซอรอล และซอร์บิทอล 3) สารให้ความหวาน 0.4-4% ได้แก่ ไซลิทอล 4) สารกันเสีย 0.05-0.5% ได้แก่ โซเดียมเบนโซเอท 5) ตัวทำละลาย 1-30% ได้แก่ เอทานอล 6) สารออกฤทธิ์เสริม 0.1-6% ได้แก่ ซิงค์คลอไรด์

น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำกลั่น (Deionized water, DDW) เป็นกลุ่มควบคุมลบ ส่วนน้ำยาบ้วนปากที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพมีทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน 0.12% สูตรดั้งเดิม (Original formula, O) ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก 2) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน 0.12% สูตรปรับปรุง 1 (Modified formula 1, M1) และ 3) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน 0.08% สูตรปรับปรุง 2 (Modified formula 2, M2)

การเตรียมไบโอฟิล์ม

เติมน้ำเสายจำนวน 10 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผสมกับ Di-thiothreitol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิโมล่าร์ กรองผ่านใยแก้วประสงเชื้อ (sterile glass wool) แล้วนำเติมลงในไมโครไทเตอร์เพลท (96-well plate) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงให้เชื้อในน้ำเสายสร้างไบโอฟิล์มโดยการเกาะกับเพลท แล้วเติมสารละลายน้ำเสายเทียม หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนในตู้อบเลี้ยงเชื้อคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มด้วยวิธีการย้อมสี SYTO® 9/propidium iodide dual fluorescent staining

เตรียมไบโอฟิล์มตามวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้นใน black 96-well plate, clear bottom ดูดน้ำเสายเทียมออก ล้าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำยาบ้วนปากที่ต้องการทดสอบลงบนไบโอฟิล์ม นาน 30 วินาที แล้วจึงดูดน้ำยาบ้วนปากออกให้หมด เติมน้ำเสายเทียมแล้วนำไปบ่มเลี้ยงต่อในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทำการเปลี่ยนน้ำเสายเทียมทุกๆ 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดน้ำเสายเทียมออกให้หมด เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ลงไปจำนวน 100 ไมโครลิตร นำสีย้อม SYTO® 9 และ propidium iodide ที่เตรียมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตใส่ในหลุมไบโอฟิล์มจำนวน 100 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไมโครเพลทที่มีไบโอฟิล์มเข้าเครื่องวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซ็นต์ จากนั้นคำนวณเซลล์ส่วนเซลล์เป็นเซลล์ตาย จากค่าฟลูออเรสเซ็นต์ของ SYTO® 9 และ propidium iodide

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มด้วยวิธีการนับโคโลนีบนรุ้นเลี้ยงเชื้อ

ดูดสารละลายน้ำเสายเทียมออกให้หมดจากไบโอฟิล์มที่เตรียมไว้ ล้างแบคทีเรียที่ไม่ได้ยึดเกาะออกโดยการล้าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำยาบ้วนปากที่ต้องการทดสอบลงบนไบโอฟิล์ม แช่ทิ้งไว้นาน 30 วินาที แล้วจึงดูดน้ำยาบ้วนปากออกให้หมด เติม 20 มิลลิโมล่าร์ โปแตสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ทิปปลายตัด (pipette tip) ดูดไบโอฟิล์มออกให้มากที่สุด จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียทีละ 10 เท่า ในสารละลาย 20 มิลลิโมล่าร์ โปแตสเซียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ $1:10^6$ ถึง $1:10^7$ เท่า ดูดเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 25 ไมโครลิตร นำไปเกาะโคโลนีในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง บนรุ้นเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ดังนี้ 1) รุ้นเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเลือด สำหรับนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 2) รุ้นเลี้ยงเชื้อไมติส ซาไลวาเรียส สำหรับนับจำนวนสเตรปโตคอคไคทั้งหมด และ 3) รุ้นเลี้ยงเชื้อไมติส ซาไลวาเรียส บาเซ็ทราซิน สำหรับนับจำนวนมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค คำนวณอัตราส่วนจำนวนเชื้อระหว่างมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค สเตรปโตคอคไคทั้งหมด และเชื้อทั้งหมด เพื่อแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะในการฆ่าเชื้อของน้ำยาบ้วนปากต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้สถิติ One-way ANOVA ในการเปรียบเทียบผลของน้ำยาบ้วนปาก 3 ชนิด (สูตรดั้งเดิม และสูตรปรับปรุงสองสูตร) ต่อการเปรียบเทียบอัตราส่วนเชื้อมีชีวิตและเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์ม และต่ออัตราส่วนของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด และต่อจำนวนเชื้อสเตรปโตคอคไคทั้งหมด

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบการออกฤทธิ์เสริมในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ พบว่า

1. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์เฮกซิดีนในส่วนผสมระหว่างคลอร์เฮกซิดีนกับซิงค์คลอไรด์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออยู่ในช่วง 0.00006-0.00008%

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของคลอร์เฮกซิดีนอย่างเดียวที่สามารถยับยั้งเชื้ออยู่ในช่วง 0.0001-0.0002%

3. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของซิงค์คลอไรด์ในส่วนผสมระหว่างคลอร์เฮกซิดีนกับซิงค์คลอไรด์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออยู่ในช่วง 0.000781-0.009375%

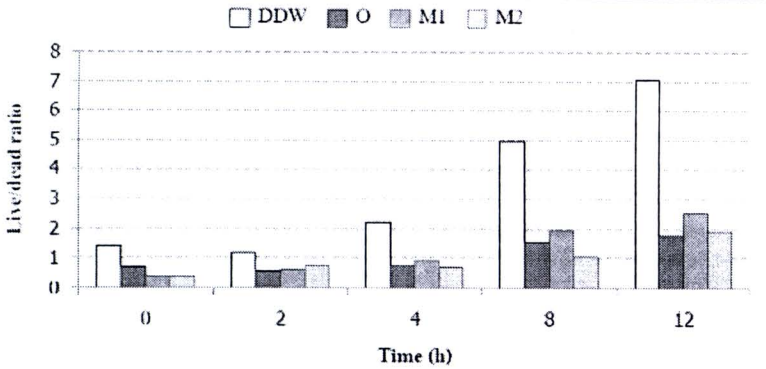
4. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของซิงค์คลอไรด์อย่างเดียวที่สามารถยับยั้งเชื้ออยู่ในช่วง 0.005859-0.015625%

ค่า ΣFIC ที่ได้จากการคำนวณในการทดลองแต่ละครั้งมีค่าอยู่ในช่วง 0.90-0.93 แสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดไม่มีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กันอย่างชัดเจนในการยับยั้งเชื้อ สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม โดยวิธี SYTO$^{®}$9/propidium iodide dual fluorescent staining พบว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนทั้ง 3 ชนิดสามารถลดอัตราส่วนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.005$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้ผ่านน้ำยาบ้วนปากในแต่ละช่วงระยะเวลาที่ทำการทดสอบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยที่น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงทั้ง 2 สูตรสามารถฆ่าเชื้อได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิม (ภาพที่ 1)

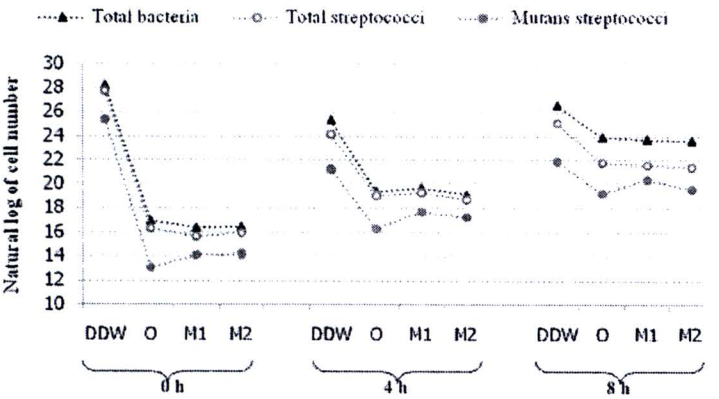
เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์มหลังจากการฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาบ้วนปากที่เวลาต่างๆกับกลุ่มควบคุมลบที่เวลาเริ่มต้น พบว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนทั้ง 3 ชนิดสามารถลดอัตราส่วนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์มได้เป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มด้วยวิธีการนับไคโลนีบนวุ้นเลี้ยงเชื้อ พบว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนทั้ง 3 ชนิดสามารถฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนทั้ง 3 ชนิด สามารถลดจำนวนเชื้อมีชีวิตในไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญเป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มด้วยน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงทั้ง 2 สูตรกับน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิม (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงสัดส่วนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์มหลังจากได้รับน้ำยาบ้วนปากที่เวลาต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ต่อเชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคไคทั้งหมด หรือต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนสูตรดั้งเดิมมีความจำเพาะในการยอกฤทธิ์ฆ่าเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคมากกว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนสูตรปรับปรุงทั้ง 2 สูตร ในขณะที่น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนทั้ง 3 สูตร มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคไคทั้งหมด หรือแบคทีเรียทั้งหมดไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2 กราฟแสดงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไบโอฟิล์มหลังจากได้รับน้ำยาบ้วนปากที่เวลาต่างๆ

อภิปรายผล

แนวทางหนึ่งในการลดข้อด้อยของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนคือปรับปรุงสูตรให้มีระดับเดิมน้อยลง และลดผลข้างเคียงโดยลดปริมาณการใช้คลอร์เฮ็กซิดีนให้น้อยลงในขณะที่เติมสารออกฤทธิ์ยืมเสริมเข้าไปแทน ได้แก่ซิงค์คลอไรด์ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากระหว่างสูตรปรับปรุงกับสูตรดั้งเดิมในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มมีรายงานแสดงให้เห็นว่าการใช้ซิงค์ร่วมกับคลอร์เฮ็กซิดีนทำให้ประสิทธิภาพในการต้านต่อคราบจุลินทรีย์ดีขึ้น และทำให้ภาวะความเป็นกรดของคราบจุลินทรีย์ลดลง(Giertsen, Scheie, & Rolla, 1988) และเมื่อใช้เป็นส่วนผสมร่วมกันในน้ำยาบ้วนปากยังสามารถลดคราบสีชาได้อย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย (Thrane, Young, Jonski, & Rolla, 2007) การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ซิงค์คลอไรด์เป็นสารออกฤทธิ์ร่วมเพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน

MIC ของคลอร์เฮ็กซิดีนต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่เคยมีรายงานมีค่าอยู่ในช่วง 0.000025 - 0.0001% (Jarvinen, Tenovuo, & Huovinen, 1993) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า MIC ของคลอร์เฮ็กซิดีนต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ มีค่าอยู่ในช่วง 0.0001-0.0002% ซึ่งสูงกว่าแต่ใกล้เคียงกันกับค่าที่เคยมีการรายงานมาก่อน ส่วน MIC ของซิงค์คลอไรด์ในการทดลองครั้งนี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.005859-0.015625% ซึ่งต่ำกว่าค่าที่เคยรายงานมาก่อน (0.02-0.08%) (Hernandez-Sierra et al., 2008)

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ ซิงค์คลอไรด์และคลอร์เฮ็กซิดีนไม่มีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กันอย่างชัดเจนในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ แม้ว่ากลไกในการออกฤทธิ์ของซิงค์คลอไรด์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียยังไม่เป็นที่กระจ่างแน่ชัด แต่ก็มีรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าซิงค์คลอไรด์และคลอร์เฮ็กซิดีนมีกลไกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ไม่จำเพาะของที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเหมือนกัน (Giertsen et al., 1988; Young, Jonski, & Rolla, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบที่พบว่าการเติมซิงค์คลอไรด์ในสูตรปรับปรุง 1 ให้ผลในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มไม่ดีกว่าสูตรดั้งเดิมที่มีปริมาณคลอร์เฮ็กซิดีน 0.12% เท่ากัน คลอร์เฮ็กซิดีนเป็นสารกลุ่มบีสควินไนด์ที่มีประจุบวก (cationic bisguanide) และมีกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยการเพิ่มความสามารถในการเข้าออกเซลล์หรือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นซิงค์ไอออนซึ่งมีประจุบวกจึงอาจแย่งตำแหน่งในการจับของคลอร์เฮ็กซิดีนได้ นอกจากนี้คลอไรด์ที่มีประจุลบอาจสามารถจับกับประจุบวกของคลอร์เฮ็กซิดีน ทำให้คลอร์เฮ็กซิดีนจับกับเซลล์แบคทีเรียได้น้อยลง และมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง (R. Davies, 2000) แต่การเติมซิงค์คลอไรด์ปริมาณที่น้ำกันลงในสูตรปรับปรุง 2 ซึ่งมีปริมาณคลอร์เฮ็กซิดีนเพียง 0.08% กลับให้ผลในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทั้งสองสามารถนำมาใช้เพื่อหวังผลในลักษณะเพิ่มเติมกันได้ (addition effect) หากใช้ในสัดส่วนที่เหมาะสมและไม่มากเกินกว่าเสถียรหนึ่งในการยับหรือออกฤทธิ์ของสารทั้งสอง

การใช้ซิงค์คลอไรด์ร่วมกับคลอร์เฮ็กซิดีนในสูตรปรับปรุงส่งผลทำให้ความจำเพาะในการฆ่าเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคของคลอร์เฮ็กซิดีนลดลงประมาณ 1 natural log scale ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรคฟันผุของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนได้ ในทางกลับกันการที่ไบโอฟิล์มกลุ่มที่ได้รับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุงทั้ง 2 สูตร มีสัดส่วนของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ต่อเชื้อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

กลุ่มสเตรปโตคอกไคทั้งหมด หรือต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด สอดคล้องกันกับในไบโอฟิล์มกลุ่มควบคุมลบ แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศน์ของเชื้อจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์ม

ในช่วงสองชั่วโมงแรก น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2 ที่มีคลอร์เฮ็กซิดีน 0.08% ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์มช้ากว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสูตรปรับปรุง 1 ที่มีซิงก์คลอไรด์ผสม แต่มีคลอร์เฮ็กซิดีน 0.12% แต่ที่เวลา 4 ชั่วโมงเป็นต้นไป สัดส่วนเชื้อมีชีวิตต่อเชื้อไม่มีชีวิตในไบโอฟิล์มที่ได้รับน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2 กลับน้อยกว่าสัดส่วนในไบโอฟิล์มที่ได้รับน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 1 แสดงให้เห็นว่าสูตรปรับปรุง 2 สามารถยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มได้ช้ากว่าแต่นานกว่าสูตรปรับปรุง 1 อย่างไรก็ตามกลไกที่เกี่ยวข้องยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด

ในการปรับปรุงน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนให้มีรสชาติที่ดีขึ้นและผลข้างเคียงลดลงนี้ น่าจะสามารถเพิ่มความร่วมมือของผู้ป่วยในการใช้น้ำยาบ้วนปากนี้ได้ โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยเด็ก เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการป้องกันโรคในช่องปากได้มากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุง 2 สามารถฆ่าเชื้อในสภาวะไบโอฟิล์มที่จำลองขึ้นในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพึงพอใจเมื่อเทียบกับสูตรดั้งเดิม อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาทางคลินิกต่อไปในอาสาสมัครเพื่อประเมินผลในสภาวะจริงในการควบคุมโรคในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์ม และการลดผลข้างเคียงจากการใช้คลอร์เฮ็กซิดีนที่มีความเข้มข้นน้อยลง รวมถึงการยอมรับรสชาติและความร่วมมือของผู้ป่วยในการใช้น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงใหม่นี้ โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยเด็ก นอกจากนี้ควรใช้หลักฐานระดับโมเลกุลเพื่อยืนยันผลการวัดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย และควรมีการศึกษาคุณสมบัติของสารอื่นเพิ่มเติมในการเสริมฤทธิ์กับคลอร์เฮ็กซิดีน

เอกสารอ้างอิง

Davies, R. (2000). **Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis.** *Periodontol,* 48, 23-30.

Davies, R. M. (2008). **Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis.** *Periodontol* 2000, 48, 23-30.

Eley, B. M. (1999). **Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review.** *Br Dent J,* 186(6), 286-296.

Eriksen, H. M., Nordbo, H., Kantanen, H., & Ellingsen, J. E. (1985). **Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. A review of possible mechanisms.** *J Clin Periodontol,* 12(5), 345-350.

Giertsen, E., Scheie, A. A., & Rolla, G. (1988). **Inhibition of plaque formation and plaque acidogenicity by zinc and chlorhexidine combinations.** *Scand J Dent Res.* 96(6), 541-550.

Gunsolley, J. C. (2006). A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc,* 137(12), 1649-1657.

Hepso, H. U., Bjornland, T., & Skoglund, L. A. (1988). **Side-effects and patient acceptance of 0.2% versus 0.1% chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash.** *Int J Oral Maxillofac Surg.* 17(1), 17-20.

Hernandez-Sierra, J. F., Ruiz, F., Pena, D. C., Martinez-Gutierrez, F., Martinez, A. E., Guillen Ade, J., et al. (2008). **The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold.** *Nanomedicine,* 4(3), 237-240.

Hong, C. H., & daFonseca, M. (2008). **Considerations in the pediatric population with cancer.** *Dent Clin North Am,* 52(1), 155-181, ix.

Jarvinen, H., Tenovuo, J., & Huovinen, P. (1993). **In vitro susceptibility of Streptococcus mutans to chlorhexidine and six other antimicrobial agents.** *Antimicrob Agents Chemother,* 37(5), 1158-1159.

Loesche, W. J. (1986). **Role of Streptococcus mutans in human dental decay.** *Microbiol Rev* 50, 353-380.

Thrane, P. S., Young, A., Jonski, G., & Rolla, G. (2007). A new mouthrinse combining zinc and chlorhexidine in low concentrations provides superior efficacy against halitosis compared to existing formulations: a double-blind clinical study. *J Clin Dent,* 18(3), 82-86.

Young, A., Jonski, G., & Rolla, G. (2003). Combined effect of zinc ions and cationic antibacterial agents on intraoral volatile sulphur compounds (VSC). *Int Dent J,* 53(4), 237-242.

ภาคผนวก ข
การพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

โครงการวิจัยเรื่อง: ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการเสริมฤทธิ์ การต้านไบโอฟิล์ม ความคงตัวในไบโอฟิล์ม ความจำเพาะต่อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และรสชาติ

Effects of improved chlorhexidine mouthwash on synergy, antiplaque activity, substantivity, specificity for Mutans streptococci, and taste preference

ผู้วิจัย:

1. ทันตแพทย์หญิงรสริน สมประสงค์
   คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร.ปฏิมาพร พึ่งชาญชัยกุล
   คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์
   คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำหรับเอกสาร:

1. แบบเสนอเพื่อขอรับการพิจารณาด้านจริยธรรมของการวิจัยในมนุษย์ เวอร์ชั่น 1.1 ฉบับวันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2553
2. โครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ฉบับภาษาไทย เวอร์ชั่น 1.1 ฉบับวันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2553
3. แบบคำชี้แจงอาสาสมัคร ฉบับภาษาไทย เวอร์ชั่น 1.0 ฉบับวันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2553
4. แบบยินยอมอาสาสมัคร ฉบับภาษาไทย เวอร์ชั่น 1.0 ฉบับวันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2553
5. แบบสอบถามการวิจัย เวอร์ชั่น 1.0 ฉบับวันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2553
6. ประวัติผู้วิจัย

ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (ICH GCP)

ให้ไว้ ณ วันที่ 27 สิงหาคม พ.ศ. 2553

(รองศาสตราจารย์จิราพร สิทธิถาวร)

รองประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลำดับที่ : 4.2.12 : 09/2553

เลขที่ : HE532166

วันหมดอายุ : 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2554

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น
สำนักงาน: อาคารสมเด็จพระศรีนครินทรา บรมราชชนนี อนุสรณ์ 1 (ชั้น 17)
โทร. (043) 366616, (043) 366617 โทรสาร (043) 366617

Institutional Review Board Number; IRB00001189
Federal Wide Assurance; FWA00003418

ภาคผนวก ค
คำชี้แจงสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

...ะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รับรองสำหรับ
โครงที่...2 7...ส.ค...2553

เอกสารคำชี้แจงสำหรับอาสาสมัคร

ชื่อโครงการวิจัย

"ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการเสริมฤทธิ์ การต้านไบโอฟิล์ม ความคงตัวในไบโอฟิล์ม ความจำเพาะต่อบิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และรสชาติ"

หัวหน้าโครงการวิจัย

ทพญ.รสริน สมประสงค์ ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์ 0-4320-2405 ต่อ 11157 หรือ โทรศัพท์มือถือ 08-1473-8297 Email rieng@windowslive.com

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

อ.ทพญ.ดร.ปฏิมาพร พึ่งชาญชัยกุล ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ทพ.ดร.สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์ ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำและความเป็นมาของโครงการวิจัย

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อในช่องปากที่พบได้บ่อย สาเหตุหลักของโรคเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ เสตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับจุลินทรีย์อื่นๆบนแผ่นฟิล์มชีวภาพฟัน โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุได้แก่ อาหารประเภทน้ำตาล องค์ประกอบในน้ำลาย ภูมิคุ้มกันร่างกาย การดูแลทำความสะอาดช่องปากของแต่ละคน และการได้รับฟลูออไรด์ เป็นต้น ถ้าแผ่นฟิล์มชีวภาพฟันมีทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรคอาศัยอยู่ร่วมกันอย่างสมดุลจะไม่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก แต่ถ้าสภาวะแวดล้อมของเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไป เช่น การบริโภคอาหารประเภทน้ำตาลบ่อยๆ จะทำให้สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เพิ่มจำนวนมากขึ้น เนื่องจากสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ และยึดเกาะกับผิวฟันได้ดีมากขึ้น ในภาวะที่มีน้ำตาล จึงทำให้เกิดโรคฟันผุตามมาได้ ซึ่งเราสามารถป้องกันการเกิดโรคได้โดยการควบคุมคราบจุลินทรีย์ที่อยู่บนตัวฟันให้อยู่ในภาวะที่ไม่ก่อโรคในช่องปาก

การควบคุมคราบจุลินทรีย์มีทั้งทางกลและทางเคมี ซึ่งทางกลได้แก่ การแปรงฟันและใช้ไหมขัดฟัน ส่วนทางเคมีได้แก่ การใช้ยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือควบคุมคราบจุลินทรีย์ วิธีทางกลซึ่งใช้กันเป็นประจำนั้นมีข้อจำกัดในกลุ่มคนบางกลุ่ม เช่น กลุ่มเด็กที่ยังมีกล้ามเนื้อไม่แข็งแรง กลุ่มคนสูงอายุที่มีปัญหาการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ กลุ่มผู้พิการมือหรือแขนที่ไม่สามารถแปรงฟันหรือใช้ไหมขัดฟันได้ กลุ่มคนที่เข้ารับการรักษาศัลยกรรมในช่องปาก เช่น ศัลยปริทันต์ ผ่าตัดขากรรไกร ผู้ป่วยที่ได้รับการบัดฟัน เป็นต้น7 กลุ่มคนที่มีปัญหาสุขภาพร่างกาย เช่น โรคเลือดที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำมาก และมีเลือดออกเมื่อได้รับการสัมผัสหรือกระแทกจากแปรงสีฟันหรือไหมขัดฟัน และเลือดไหลไม่หยุดตามปกติ หรือผู้ป่วยมะเร็งเป็นต้น ในกลุ่มคนเหล่านี้การใช้น้ำยาบ้วนปากจะมีความสำคัญมากเพราะต้องใช้ทดแทนในช่วงระยะเวลาที่ไม่สามารถแปรงฟันร่วมกับการใช้ไหมขัดฟันได้

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งคราบจุลินทรีย์ได้มากที่สุด แต่เนื่องจากมีข้อด้อยที่สำคัญ ได้แก่ รสชาติขม การสูญเสียการรับรสเค็มและรสขมแบบย้อนกลับได้ การติดสีที่ตัวฟันและลิ้น การระคายเคืองต่อเยื่อบุผิวช่องปากไปจนถึงความรู้สึกปวดแสบปวดร้อน หากมีการใช้เป็นระยะเวลานาน จึงไม่เป็นที่นิยมในผู้ป่วยหรือบุคคลทั่วไป ดังนั้นส่วนใหญ่ทันตแพทย์มักจะจ่ายให้ผู้ป่วยกลุ่มที่มีโรคทางระบบหรือผู้ป่วยที่มีปัญหาทางร่างกายที่ทำให้ไม่สามารถแปรงฟันได้ในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อหวังผลให้เกิดการลดลงของคราบจุลินทรีย์และลดการเกิดโรคในช่องปากของผู้ป่วยกลุ่มนี้ แต่เนื่องจากข้อด้อยด้านรสชาติของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนทำให้ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการใช้ โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยเด็ก ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเด็กบางคนที่มีความจำเป็นต้องใช้น้ำยาบ้วนปากยับยั้งเชื้อ ได้แก่ กรณีผู้ป่วยที่มีภาวะโรคทางระบบ เช่น โรคหัวใจ หลังจากที่เข้ารับการรักษาทางทันตกรรมทั้งปากภายใต้การดมยาสลบ เป็นต้น ผู้ป่วยยังไม่สามารถ

เอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รับรองวันที่ 27 ต.ค. 2553
โรงที่...

แปรงฟันได้ แต่ต้องได้รับการป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาสจากแผลถอนฟัน เพราะมีโอกาสที่ผู้ป่วยจะเกิดโรคแทรกซ้อนมาก ทำให้เกิดความยุ่งยากและสิ้นเปลืองทรัพยากรในการรักษาภายหลังหากไม่ใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนที่หันตแพทย์จ่ายให้

น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนที่ผลิตและวางจำหน่ายมี 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.12% และ 0.2% ซึ่งมีผลการศึกษาพบว่าทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งคราบจุลินทรีย์และเหงือกอักเสบได้ต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ในประเทศไทยน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนต้องจ่ายโดยบุคลากรทางการแพทย์เท่านั้น ผู้ป่วยไม่สามารถหาซื้อใช้ได้เอง โรงพยาบาลส่วนใหญ่จะผลิตน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนเองโดยเภสัชกร เพื่อจ่ายให้แก่ผู้ป่วยในโรงพยาบาล ปัจจุบันผู้ป่วยในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 0.12% ที่ผลิตโดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แต่จากข้อด้อยของผลิตภัณฑ์ที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ผู้วิจัยเกิดแนวคิดที่จะปรับปรุงน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนให้มีรสชาติและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคให้ดีขึ้นกว่าเดิม

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสูตรน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนโดยนำสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นๆ รวมถึงสารปรุงแต่งรสชาติมาผสมเพิ่มเติม เพื่อให้ได้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสำหรับจ่ายแก่ผู้ป่วยคณะทันตแพทยศาสตร์ ที่มีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคพีนผุ ด้านการสะสมของแผ่นฟิล์มชีวภาพ มีการคงอยู่ในช่องปากได้นานขึ้น และมีรสชาติที่ดีกว่าเดิม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสูตรน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน โดยนำสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นและสารปรุงแต่งรสชาติมาผสมเพิ่มเติม เพื่อให้ได้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสำหรับจ่ายแก่ผู้ป่วยคณะทันตแพทยศาสตร์ ที่มีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคพีนผุ ด้านการสะสมของแผ่นฟิล์มชีวภาพ มีการคงอยู่ในช่องปากได้นานขึ้น และมีรสชาติที่ดีกว่าเดิม

การเข้าร่วมโครงการวิจัย

เอกสารคำนี้แจงนี้จะให้ข้อมูลแก่ท่านเกี่ยวกับโครงการวิจัย นอกจากนี้ท่านจะได้รับเอกสารความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน หากท่านมีข้อสงสัยกรุณาสอบถามผู้วิจัย ผู้วิจัยมีความยินดีตอบคำถามหรือข้อสงสัยของท่าน เมื่อท่านเข้าใจและลงลงเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ กรุณาเซ็นชื่อในแบบยินยอมอาสาสมัคร ซึ่งจะมีสำเนาหนึ่งชุดให้ท่านเก็บไว้เป็นหลักฐานและเพื่อติดต่อกับผู้ดำเนินโครงการวิจัย

สิ่งที่ท่านควรทราบก่อนเข้าร่วมในการวิจัยนี้คือ

1. การเข้าร่วมในการวิจัยของท่านเป็นไปโดยอิสระและด้วยความสมัครใจ
2. ท่านสามารถสอบถามรายละเอียดที่ไม่เข้าใจจนกว่าจะได้รับความกระจ่างที่สุด
3. การตัดสินใจไม่เข้าร่วมหรือการถอนตัวออกจากการวิจัยไม่ว่าเวลาใดท่านสามารถกระทำได้โดยอิสระ
4. การปฏิเสธการเข้าร่วมหรือการถอนตัวออกจากการวิจัยไม่มีผลต่อการศึกษา การทำงาน หรือการได้รับบริการจากสถานบริการใดๆทั้งสิ้น

ขั้นตอนการปฏิบัติตัวหากท่านเข้าร่วมโครงการวิจัย

เมื่อท่านตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัยและเซ็นชื่อเป็นหลักฐานในแบบยินยอมอาสาสมัครแล้ว ท่านจะได้รับการนัดหมายวันเวลาเพื่อมาทำการทดสอบความพึงพอใจในรสชาติของน้ำยาบ้วนปาก ที่คลินิกทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ชนิดเท่านั้น เวลาเดียวกันทุกครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. ให้ท่านอมน้ำยาบ้วนปากปริมาณ 20 มิลลิลิตร กลั้วในปากนาน 30 วินาที แล้วบ้วนออก
2. ให้ท่านประเมินผลหลังการใช้น้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิด โดยให้คะแนนความพึงพอใจในแบบสอบถามด้านต่างๆ ได้แก่ กลิ่น สี รสชาติ ความขม และการคงค้างของรสชาติในช่องปาก

...กรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รับรองเมื่อ
วันที่... 7...30...2553

ความเสี่ยงและ/หรือความไม่สบายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมการวิจัย

การใช้น้ำยาบ้วนปากในงานวิจัยครั้งนี้อาจทำให้ท่านรู้สึกไม่สบายที่ลิ้นและเหงือกจากรสชาติขมของคลอร์เฮ็กซิดีน แต่ไม่มีความเสี่ยงอันตรายหรือผลข้างเคียงอื่นต่อร่างกายของท่าน เพราะทำตามวิธีมาตรฐานที่แนะนำให้ใช้โดยทั่วไป และไม่ได้เป็นการใช้อย่างต่อเนื่อง โดยทำการทดสอบเพียง 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ จึงไม่ทำให้เกิดคราบสีดำบนตัวฟันและลิ้น และไม่ทำให้การรับรสชาติของท่านเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ สารทุกตัวที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำยาบ้วนปากมีความบริสุทธิ์สูงหรือมีความปลอดภัยในระดับที่ใช้ทำอาหารได้ และใช้ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ตามข้อกำหนดของสำนักคณะกรรมการอาหารและยาแห่งประเทศไทย

หากท่านเคยมีประวัติแพ้ยา ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก สารปรุงแต่งรสชาติ หรือสารเคมีใดๆ โปรดแจ้งผู้วิจัยเพื่อทราบและพิจารณาไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของท่าน

อย่างไรก็ตามหากท่านไม่เคยมีประวัติการแพ้ยาหรือสารเคมี แต่เกิดความผิดปกติจากการแพ้สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในน้ำยาบ้วนปากที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยมีการวางแผนที่จะป้องกันผลแทรกซ้อนและดูแลรักษากรณีเกิดผลแทรกซ้อน ดังนี้

1. ให้อาสาสมัครทำการทดลองบ้วนน้ำยาบ้วนปากที่คลินิกทันตกรรมสำหรับเด็ก
2. ผู้วิจัยเตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับช่วยเหลือกู้ชีพผู้ป่วย และเตรียมการส่งต่อไปยังห้องดูแลผู้ป่วยฉุกเฉิน โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้ทันทีที่เกิดความผิดปกติขึ้นกับอาสาสมัคร โดยผู้วิจัยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลกรณีเกิดผลแทรกซ้อนขึ้นกับอาสาสมัคร
3. ท่านสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ทางโทรศัพท์มือถือ 08-1473-8297 ตลอด 24 ชั่วโมง กรณีเกิดผลข้างเคียงภายหลังการใช้

ประโยชน์ที่อาสาสมัครจะได้รับ

1. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน และประสบการณ์ในการใช้
2. ค่าตอบแทนที่อาสาสมัครจะได้รับตลอดการทดลอง 3 ครั้ง รวมทั้งสิ้นตนละ 120 บาท โดยแบ่งจ่ายเป็น 3 งวดๆละ 40 บาท เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบและการประเมินความพึงพอใจของท่านในการใช้น้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิด

การรักษาความลับ

การบันทึกข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับตัวท่านจะถูกเก็บเป็นความลับและจะไม่ปรากฏชื่อท่านในสิ่งพิมพ์หรือการเผยแพร่ใดๆ

ชื่อ/ที่อยู่/โทรศัพท์ของอาจารย์ที่ปรึกษาผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยที่ติดต่อได้สะดวก

ชื่อ-สกุล ผศ.ทพ.ดร.สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ที่อยู่ 123 ถนนมิตรภาพ อ.เมือง จังหวัดขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40002
โทรศัพท์ 0-4320-2405 ต่อ 11275 โทรศัพท์มือถือ 08-9623-3382
โทรสาร 0-4320-2862
E-mail som_luc@kku.ac.th

แหล่งให้ข้อมูลหากมีข้อสงสัยเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร

สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ชั้น 17 อาคารสมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี คณะแพทยศาสตร์
โทรศัพท์ 0-4336-6616-7 เบอร์ภายใน 66616, 66617
โทรสาร 0-4336-6617

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รับรองแล้ว
รับที่ 27 ส.ค. 2553

แหล่งทุนสนับสนุน

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

1. ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Window II ปี 2552
สำนักประสานงาน ชุดโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กทม. 10520
โทรศัพท์ 0-2739-2387, 0-2739-2418-9 ต่อ 167
โทรสาร 0-2739-2387

2. ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ชั้น 3 อาคารศูนย์วิชาการ
ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ 0-4320-2420 โทรศัพท์ภายใน 12584-6
โทรสาร 0-4320-2421

ประโยชน์ของโครงการนี้

ได้ข้อมูลว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงใหม่มีรสชาติเป็นอย่างไร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิม โดยข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะนำไปเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนาน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน สำหรับจ่ายแก่ผู้ป่วยกลุ่มที่จำเป็นต้องใช้ ที่เข้ารับบริการที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นและลดผลข้างเคียง ทำให้ผู้ป่วยมีความร่วมมือในการใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนมากขึ้น และลดอัตราการติดเชื้อฉวยโอกาสของผู้ป่วย

ใบเซ็นยินยอม

เมื่อท่านได้อ่านใบยินยอมและเข้าใจข้อมูลการวิจัยนี้ และตกลงที่จะเป็นอาสาสมัครเข้าร่วมการวิจัยนี้ กรุณาลงนามในหนังสือยินยอมให้ทำการศึกษาที่แนบท้ายมาด้วย

ภาคผนวก ง
แบบฟอร์มใบยินยอมเข้าร่วมวิจัย

...คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รับรองแล้วนา
ในที่... 27 ต.ค. 2553

แบบยินยอมอาสาสมัคร

ข้าพเจ้า (นาย/นางสาว).....นามสกุล.....อายุ.....ปี.....เดือน
อยู่บ้านเลขที่.....หมู่ที่.....ซอย.....ถนน.....
แขวง/ตำบล.....เขต/อำเภอ.....จังหวัด.....
รหัสไปรษณีย์.....บัตรประชาชนเลขที่.....

ได้รับฟังคำอธิบาย ด้วยวาจา จาก ทพญ.วสรัน สมประสงค์ และ ได้รับเอกสารคำชี้แจง เกี่ยวกับการเป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยเรื่อง "ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการเสริมฤทธิ์ การต้านไบโอฟิล์ม ความคงตัวในไบโอฟิล์ม ความจำเพาะต่อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และรสชาติ" และได้รับทราบถึงรายละเอียดของโครงการวิจัยเกี่ยวกับ

- วัตถุประสงค์และระยะเวลาที่ทำการวิจัย
- ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติตัวที่ข้าพเจ้าต้องปฏิบัติ
- ผลประโยชน์ที่ข้าพเจ้าจะได้รับ รวมทั้งผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด
- ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมโครงการ
- การที่ข้าพเจ้าสามารถถอนตัวจากการศึกษานี้เมื่อใดก็ได้ถ้าข้าพเจ้าปรารถนา โดยไม่เสียสิทธิ์ใด ๆ ในการรับการรักษาพยาบาลที่จะเกิดขึ้นตามมาในโอกาสต่อไปทั้งในปัจจุบันและอนาคต ณ สถานพยาบาลแห่งนี้หรือสถานพยาบาลอื่น และหากเกิดมีอาการข้างเคียงขึ้น ข้าพเจ้าจะรายงานให้ผู้วิจัยหรืออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทราบทันที
- ผู้วิจัยและ/หรือผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยขอให้คำรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยเฉพาะในรูปที่เป็นการสรุปการวิจัย โดยไม่ระบุตัวบุคคลผู้เป็นเจ้าของข้อมูล

ข้าพเจ้าได้อ่านและเข้าใจคำอธิบายข้างต้นแล้ว จึงได้ลงนามยินยอมเป็นอาสาสมัครของโครงการวิจัยดังกล่าว

ลายมือชื่ออาสาสมัคร .....
(.....)

ลายมือชื่อผู้ให้ข้อมูล .....
(ทพญ.วสรัน สมประสงค์)

พยาน ..... (ไม่ใช่ผู้อธิบาย)
(.....)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

หมายเหตุ:
(1) พยานต้องไม่ใช่ทันตแพทย์หรือผู้วิจัย
(2) ผู้ให้ข้อมูล/คำอธิบายชัดเจนต้องไม่เป็นอาจารย์ เพื่อป้องกันการเข้าร่วมโครงการด้วยความเกรงใจ

ภาคผนวก จ
แบบสอบถามงานวิจัย

รหัส 4 ตำแหน่ง □-□□-□

แบบสอบถามการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง "ผลของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุงต่อการเสริมฤทธิ์ การต้านไบโอฟิล์ม ความคงตัวในไบโอฟิล์ม ความจำเพาะต่อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และรสชาติ"

คำชี้แจงการตอบคำถามข้อ 1-14 ให้อาสาสมัครทำเครื่องหมายถูกในช่องสี่เหลี่ยม ☑ หน้าคำตอบของท่าน โดยเลือกตอบเพียงตัวเลือกเดียวเท่านั้น และเขียนคำอธิบายในช่องว่างที่เว้นไว้

ข้อมูลทั่วไป

1. เพศ □ ชาย □ หญิง
2. อายุ.....ปี.....เดือน
3. ท่านเคยแพ้ยาหรือสารเคมี หรือไม่ ?
   □ ไม่เคย □ เคย โปรดระบุ.....
4. ท่านเคยใช้น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน หรือไม่ ?
   □ ไม่เคย □ เคย โปรดให้ข้อมูล.....

ข้อมูล<u>ก่อน</u>การเข้าร่วมการวิจัย

5. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก หรือไม่ ?
   □ ใช้ □ ไม่ใช้ ข้ามไปข้อ 11
6. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก เป็นประจำทุกวันหรือไม่ ?
   □ ทุกวัน □ ไม่ทุกวัน โปรดระบุ.....ข้ามไปข้อ 8
7. สำหรับท่านที่ใช้น้ำยาบ้วนปากทุกวัน ท่านใช้บ่อยแค่ไหน ?
   □ 1 ครั้งต่อวัน □ 2 ครั้งต่อวัน □ มากกว่า 2 ครั้งต่อวัน □ อื่นๆ โปรดระบุ.....
8. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก เวลาใด ?
   □ เช้า □ กลางวัน □ ก่อนนอน □ อื่นๆ โปรดระบุ.....
9. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก ยี่ห้อใด ? (เลือกตอบได้มากกว่า 1 ยี่ห้อ)
   □ Colgate plax □ Emoform □ Fluocaril □ Listerine □ Mybacin
   □ Oralmed □ Systema □ อื่นๆ โปรดระบุ.....
10. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก ชนิดหรือสูตรใด ? (เลือกตอบได้มากกว่า 1 ชนิด)
    □ ผสมฟลูออไรด์ □ ลดกลิ่นปาก □ ลดหินปูน □ สูตรฟันขาว
    □ อื่นๆ โปรดระบุ.....

ข้อมูล<u>ระหว่าง</u>การเข้าร่วมการวิจัย

11. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก หรือไม่ ?
    □ ใช้ □ ไม่ใช้ ข้ามไปข้อ 15
12. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก เป็นประจำทุกวันหรือไม่ ?
    □ ทุกวัน □ ไม่ทุกวัน โปรดระบุ.....ข้ามไปข้อ 14
13. สำหรับท่านที่ใช้น้ำยาบ้วนปากทุกวัน ท่านใช้บ่อยแค่ไหน ?
    □ 1 ครั้งต่อวัน □ 2 ครั้งต่อวัน □ มากกว่า 2 ครั้งต่อวัน □ อื่นๆ โปรดระบุ.....
14. ท่านใช้น้ำยาบ้วนปาก เวลาใด ?
    □ เช้า □ กลางวัน □ ก่อนนอน □ อื่นๆ โปรดระบุ.....

คำชี้แจงการตอบคำถามข้อ 15-25

ให้อาสาสมัครขีดเส้นตรงในแนวดิ่ง | ตัดกับเส้นนอนยาว 10 เซนติเมตรที่ตำแหน่งสัมพันธ์กับระดับความพึงพอใจ

15. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีสีน่าใช้หรือไม่ ?

สีไม่น่าใช้เลย ↓ สีน่าใช้มาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

16. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีกลิ่นหอมน่าใช้หรือไม่ ?

กลิ่นเหม็นไม่น่าใช้เลย ↓ กลิ่นหอมน่าใช้มาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

17. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีกลิ่นฉุนหรือไม่ ?

กลิ่นไม่ฉุนเลย ↓ กลิ่นฉุนมากเกินไป ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

18. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีรสขมหรือไม่ ?

ไม่มีรสขมเลย ↓ มีรสขมมากเกินไป ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

19. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีรสหวานหรือไม่ ?

ไม่มีรสหวานเลย ↓ มีรสหวานมากเกินไป ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

20. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีรสเปรี้ยวหรือไม่ ?

ไม่มีรสเปรี้ยวเลย ↓ มีรสเปรี้ยวมากเกินไป ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

21. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ ทำให้รู้สึกเย็นซ่าหรือไม่ ?

ไม่รู้สึกเย็นซ่าเลย ↓ รู้สึกเย็นซ่ามากเกินไป ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

22. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ ทำให้รู้สึกฟันและปากสะอาดหรือไม่ ?

ไม่รู้สึกฟันและปากสะอาดเลย ↓ รู้สึกฟันและปากสะอาดมาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

23. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ ช่วยกำจัดกลิ่นปากหรือไม่ ?

ไม่ช่วยกำจัดกลิ่นปากเลย ↓ ช่วยกำจัดกลิ่นปากได้ดีมาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

24. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ ทำให้รู้สึกสดชื่นหรือไม่ ?

ไม่ทำให้รู้สึกสดชื่นเลย ↓ ทำให้รู้สึกสดชื่นมาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

25. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ มีรสขมคงค้างในช่องปากนานหรือไม่ ?

ไม่มีรสขมคงค้างในช่องปากเลย ↓ มีรสขมคงค้างในช่องปากนานมาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

26. ท่านคิดว่าน้ำยาบ้วนปากที่ท่านทดลองใช้ในครั้งนี้ น่าพึงพอใจในการใช้มากน้อยเพียงใด ?

ไม่น่าใช้เลย ↓ น่าใช้มาก ↓

_____

โปรดให้ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

โปรดระบุระยะเวลาที่รสขมคงค้างในช่องปาก นาน.....ชั่วโมง.....นาที

ขอขอบคุณที่กรุณาตอบแบบสอบถาม

ภาคผนวก ฉ
ข้อมูลทั้งหมดของผลการทดลอง

ผลอัตราส่วนเซลล์เป็นต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์ม ณ เวลา 0, 2, 4, 8 และ 12 ชั่วโมงหลังได้รับกลุ่มทดลอง

เวลาที่ 0

	28/9/2010			2/12/2010			6/1/2011		
กลุ่มควบคุม	0.9279	1.4531	1.3717	2.1843	2.6413	3.7437	2.1843	2.6413	3.7437
สูตรดั้งเดิม	0.7843	0.6269	1.1059	0.4021	0.3825	0.4216	0.4021	0.3825	0.4216
สูตรปรับปรุง 1	0.4093	0.3917	0.3327	0.6636	0.5754	0.5275	0.6636	0.5754	0.5275
สูตรปรับปรุง 2	0.3967	0.3541	0.5239	0.5287	0.5490	0.7255	0.5287	0.5490	0.7255

เวลาที่ 2

	28/9/2010			2/12/2010			6/1/2011		
กลุ่มควบคุม	1.1284	1.2484	0.8267	2.6288	3.5169	4.4166	2.6288	3.5169	4.4166
สูตรดั้งเดิม	0.5415	0.5647	0.5039	0.3699	0.4646	0.4548	0.3699	0.4646	0.4548
สูตรปรับปรุง 1	1.7953	0.9509	0.5777	0.6108	0.7190	0.7333	0.6108	0.7190	0.7333
สูตรปรับปรุง 2	0.6668	1.0348	0.6033	0.5783	0.5816	0.4913	0.5783	0.5816	0.4913

เวลาที่ 4

	28/9/2010			2/12/2010			6/1/2011		
กลุ่มควบคุม	2.4535	2.1632	2.2268	2.8729	3.8721	2.3709	2.8729	3.8721	2.3709
สูตรดั้งเดิม	0.8250	0.7678	0.7376	0.4217	0.4139	0.3839	0.4217	0.4139	0.3839
สูตรปรับปรุง 1	0.7117	0.7034	0.5393	1.1411	0.8759	0.6120	1.1411	0.8759	0.6120
สูตรปรับปรุง 2	1.0151	0.8630	2.1611	0.5656	0.5489	0.4457	0.5656	0.5489	0.4457

ผลอัตราส่วนเซลล์เป็นต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์ม ณ เวลา 0, 2, 4, 8 และ 12 ชั่วโมงหลังได้รับกลุ่มทดลอง(ต่อ)

เวลาที่ 8

	28/9/2010			2/12/2010			6/1/2011		
กลุ่มควบคุม	4.8016	5.1049	5.7508	2.0649	2.6836	2.7432	2.0649	2.6836	2.7432
สูตรดั้งเดิม	1.1266	1.4219	1.6460	0.7403	0.5389	0.6475	0.7403	0.5389	0.6475
สูตรปรับปรุง 1	0.7957	0.9976	1.1118	2.1456	2.0009	1.4473	2.1456	2.0009	1.4473
สูตรปรับปรุง 2	1.5230	1.8869	1.9612	1.6502	1.4010	0.8267	1.6502	1.4010	0.8267

เวลาที่ 12

	28/9/2010			2/12/2010			6/1/2011		
กลุ่มควบคุม	8.0335	7.1527	7.0188	2.5523	2.8004	3.0658	2.5523	2.8004	3.0658
สูตรดั้งเดิม	1.2304	1.7844	1.7144	1.5037	3.1366	2.4207	1.5037	3.1366	2.4207
สูตรปรับปรุง 1	0.9806	1.6924	2.0771	1.2017	2.1303	1.8411	1.2017	2.1303	1.8411
สูตรปรับปรุง 2	2.3794	3.8343	2.6389	2.3429	1.7715	2.1478	2.3429	1.7715	2.1478

ตัวเลขที่ขีดเส้นใต้หมายถึงข้อมูลที่ตัดออก

จำนวนเชื้อในไบโอฟิล์มในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มของน้ำยาบ้วนปาก

ชั่วโมงที่ 0	กลุ่มควบคุม			สูตรดั้งเดิม			สูตรปรับปรุง 1			สูตรปรับปรุง 2		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
28/9/2010	12.322	12.000	11.000	7.301	7.041	5.477	7.114	6.699	6.114	7.041	6.903	6.114
	12.146	12.114	11.000	7.342	7.000	5.699	7.114	6.778	6.114	7.114	7.000	6.146
	12.255	12.000	11.079	7.398	7.114	5.778	7.079	6.845	6.114	7.204	6.778	6.204
2/12/2010	8.471	8.134	7.803	6.365	6.158	6.158	6.840	6.494	6.225	6.937	6.848	6.580
	8.265	7.982	7.806	6.453	6.093	6.093	6.606	6.483	5.912	7.199	6.914	6.547
6/1/2011	8.459	8.079	7.982	6.687	6.455	6.296	6.899	6.784	6.598	6.707	6.597	6.466
	8.401	8.146	7.903	6.534	6.414	6.003	6.888	6.593	6.408	6.806	6.586	6.468
ชั่วโมงที่ 4	กลุ่มควบคุม			สูตรดั้งเดิม			สูตรปรับปรุง 1			สูตรปรับปรุง 2		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
28/9/2010	11.000	10.415	9.079	8.415	8.301	7.000	8.380	8.301	7.681	8.255	8.146	7.580
	10.130	10.230	9.041	7.217	7.903	6.845	8.362	8.114	7.362	8.041	7.778	7.079
	9.322	10.176	9.000	8.875	7.954	6.903	8.204	8.114	7.114	8.176	7.903	7.255
2/12/2010	10.178	10.040	9.729	5.075	4.922	4.459	5.647	5.387	4.812	5.745	5.571	5.362
	10.279	9.872	9.792	5.250	4.926	4.511	5.521	5.521	4.606	5.459	5.542	4.833
6/1/2011	9.070	8.355	8.120	7.310	6.519	6.219	7.177	6.821	6.313	7.084	7.026	6.822
	8.968	8.287	8.066	7.073	6.526	6.233	7.166	6.989	6.344	7.297	7.064	6.797

จำนวนเชื้อในไบโอฟิล์มในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มของน้ำยาบ้วนปาก(ต่อ)

ชั่วโมงที่ 8	กลุ่มควบคุม			สูตรดั้งเดิม			สูตรปรับปรุง 1			สูตรปรับปรุง 2		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
28/9/2010	11.415	10.820	9.505	10.415	9.447	8.301	10.447	9.342	8.820	10.380	9.380	8.477
	11.322	10.643	9.230	10.041	9.146	8.079	9.778	9.079	8.591	9.778	8.903	8.230
	11.778	11.204	9.255	10.146	9.230	8.000	10.204	9.146	8.544	9.954	9.000	8.255
2/12/2010	9.320	9.358	9.064	8.000	7.784	7.459	8.049	7.937	7.494	8.134	8.061	7.692
	9.566	9.387	8.788	7.968	7.850	7.547	8.123	7.962	7.401	8.096	8.029	7.760
6/1/2011	11.328	11.181	11.058	9.248	9.078	8.812	9.261	9.057	8.892	9.290	9.118	8.968
	11.344	11.194	11.032	9.239	9.152	8.899	9.217	9.125	8.930	9.201	9.089	8.817

*กลุ่มที่ 1 หมายถึง จำนวนเชื้อA/Fทั้งหมด, กลุ่มที่ 2 หมายถึง จำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด, กลุ่มที่ 3 หมายถึง จำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด

จำนวนเชื้อA/Fทั้งหมด = เชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมด

ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อในไบโอฟิล์มวัดผลโดยวัดอัตราส่วนเซลล์มีชีวิตต่อเซลล์ตาย

	2/12/2010			5/1/2011			6/1/2011		
กลุ่มควบคุม	0.7982	1.2040	0.9168	0.9963	1.7395	2.4659	2.1374	1.3639	1.8000
สูตรดั้งเดิม	0.5182	0.3302	0.2387	0.2300	0.3473	0.4516	0.5033	0.2537	0.3242
สูตรปรับปรุง 1	0.5820	1.5260	0.2673	0.1717	0.3016	0.3306	0.3139	0.2603	0.4685
สูตรปรับปรุง 2	0.3577	0.3832	0.2790	0.1786	0.3061	0.2635	0.4597	0.3522	0.2472

จำนวนเชื้อในไบโอฟิล์มในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อในไบโอฟิล์มของน้ำยาบ้วนปาก

วันที่	กลุ่มควบคุม			สูตรดั้งเดิม			สูตรปรับปรุง 1			สูตรปรับปรุง 2		
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
2/12/2010	7.178	6.298	5.381	5.075	4.833	4.516	5.185	4.943	4.604	5.256	5.007	4.643
5/1/2011	7.384	6.147	5.928	5.423	5.334	5.072	5.504	5.439	5.318	5.474	5.425	5.382
	7.580	5.455	5.695	6.111	6.009	5.845	6.182	6.100	5.924	6.204	6.107	6.037
	7.049	6.929	6.613	5.425	5.276	5.149	5.566	5.433	5.305	5.458	5.386	5.360
	7.944	7.806	7.556	6.045	5.973	5.778	6.068	6.009	5.914	6.086	6.057	5.996
6/1/2011	7.389	7.326	6.929	5.494	5.270	5.137	5.609	5.504	5.384	5.615	5.554	5.334
	7.602	6.556	7.255	5.792	5.568	5.342	6.173	6.009	5.863	6.384	6.253	6.100
	7.199	7.104	6.833	5.430	5.297	5.188	5.576	5.473	5.387	5.697	5.522	5.461
	7.415	7.362	6.954	5.690	5.491	5.380	5.886	5.806	5.633	6.170	6.064	5.919

*กลุ่มที่ 1 หมายถึง จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด, กลุ่มที่ 2 หมายถึง จำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด, กลุ่มที่ 3 หมายถึง จำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด

ภาคผนวก ช
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าตัวแปร

Negative control = DDW = กลุ่มควบคุม/ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

Original MW = O = น้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิม

0.12% MW = M1 = น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 1

0.08% MW = M2 = น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2

Total bacteria = total aerobic and facultative = เชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมด

Total streptococci = เชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด

Mutans streptococci = เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด

1. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์ม

1.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มโดยวิธีการย้อมสีเซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซ้นท์

1.1.1 ณ เวลา 30 วินาที ข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติจึงใช้สถิติไม่ใช้พาราเมตริก

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
RATIO	negative control	9	28.22
	original MW	8	13.50
	0.12% MW	9	13.89
	0.08% MW	9	15.89
	Total	35	

Test Statistics[a,b]

	RATIO
Chi-Square	12.330
df	3
Asymp. Sig.	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

เมื่อพบความแตกต่างจากสถิติ Kruskal-Wallis test, p= 0.006

จึงนำมาเปรียบเทียบรายคู่จากการใช้ค่าวิกฤตและค่า mean rank ที่ได้จาก kruskal wallis test โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$Z_{\alpha/k(k-1)} = Z_{0.05/4(4-1)} = Z_{0.00416} \sim 1.73$$

คำนวณค่า mean rank $\left|\overline{R}_u - \overline{R}_v\right|$

คำนวณค่าวิกฤตจากสูตร $Z_{\alpha/k(k-1)} \sqrt{\frac{N(N+1)\{(1/nu)+(1/nv)\}}{12}}$

Ri-Rj ≥ ค่าวิกฤตจากสูตร = มีความแตกต่าง

Ri-Rj < ค่าวิกฤตจากสูตร = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนเซลล์มีชีวิตต่อเซลล์ตายเป็นรายคู่ ณ เวลา 30 วินที

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	28.22-13.50=14.72	1.73*√(35*36)/12*(1/9 + 1/8)= 8.614	DDW ≠ O
DDW-M1	28.22-13.89=14.33	1.73*√(35*36)/12*(1/9 + 1/9)= 8.863	DDW ≠ M1
DDW-M2	28.22-15.89=12.33	8.863	DDW ≠ M2
O-M1	13.89-13.50=0.39	8.614	O =M1
O-M2	15.89-13.50=2.39	8.614	O = M2
M1-M2	15.89-13.89=2	8.863	M1=M2

สรุป ณ เวลา 30 วินาทีอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมมากว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่น้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test, p= 0.006

1.1.2 **ชั่วโมงที่ 2 ข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติ**

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
RATIO	negative control	8	26.13
	original MW	8	7.88
	0.12% MW	8	17.13
	0.08% MW	8	14.88
	Total	32	

Test Statistics[a,b]

	RATIO
Chi-Square	15.460
df	3
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

ตารางแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนเซลล์มีชีวิตต่อเซลล์ตายเป็นรายคู่ ณ เวลา 2 ชั่วโมง

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	26.13-7.88=18.25	1.73*√88*0.25= 8.114	DDW ≠ O
DDW-M1	26.13-17.13=9	8.114	DDW ≠ M1
DDW-M2	26.13-14.88=11.25	8.114	DDW ≠ M2
O-M1	17.13-7.88=9.25	8.114	O ≠M1
O-M2	14.88-7.88=7	8.114	O = M2
M1-M2	17.13-14.88=2.25	8.114	M1=M2

สรุป ณ เวลา 2 ชั่วโมงหลังทำการทดสอบพบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมมากว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2 มีอัตราส่วนนี้มากกว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย Kruskal-Wallis test, p= 0.001

1.1.3 ชั่วโมงที่ 4 ข้อมูลกระจายปกติ แต่มีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน

ANOVA

RATIO

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		37.590	3	12.530	29.080	.000
	Linear Term	Contrast	16.167	1	16.167	37.522	.000
		Deviation	21.423	2	10.712	24.859	.000
Within Groups			13.788	32	.431		
Total			51.379	35			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: RATIO

Tamhane

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	2.55506*	.366353	.000	1.31819	3.79192
	0.12% MW	2.35620*	.375389	.001	1.11798	3.59443
	0.08% MW	2.06427*	.415624	.002	.77686	3.35169
original MW	negative control	-2.55506*	.366353	.000	-3.79192	-1.31819
	0.12% MW	-.19885	.136969	.669	-.61682	.21912
	0.08% MW	-.49078	.224916	.282	-1.22284	.24127
0.12% MW	negative control	-2.35620*	.375389	.001	-3.59443	-1.11798
	original MW	.19885	.136969	.669	-.21912	.61682
	0.08% MW	-.29193	.239352	.816	-1.04116	.45729
0.08% MW	negative control	-2.06427*	.415624	.002	-3.35169	-.77686
	original MW	.49078	.224916	.282	-.24127	1.22284
	0.12% MW	.29193	.239352	.816	-.45729	1.04116

*. The mean difference is significant at the .05 level.

สรุป ณ 4 ชั่วโมงหลังการทดสอบพบว่าอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมมากกว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่น้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ One-way ANOVA with Post hoc comparison (Tamhane), p=0.001

1.1.4 ชั่วโมงที่ 8 ข้อมูลกระจายปกติ แต่มีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน

ANOVA

RATIO

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		62.817	3	20.939	11.480	.000
	Linear Term	Contrast	27.404	1	27.404	15.025	.000
		Deviation	35.413	2	17.706	9.708	.001
Within Groups			58.366	32	1.824		
Total			121.183	35			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: RATIO

Tamhane

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	3.34000*	.759254	.005	.94552	5.73448
	0.12% MW	2.95701*	.751484	.013	.57307	5.34095
	0.08% MW	2.72890*	.769660	.023	.31875	5.13905
original MW	negative control	-3.34000*	.759254	.005	-5.73448	-.94552
	0.12% MW	-.38299	.467188	.964	-1.78425	1.01826
	0.08% MW	-.61110	.495897	.801	-2.09873	.87652
0.12% MW	negative control	-2.95701*	.751484	.013	-5.34095	-.57307
	original MW	.38299	.467188	.964	-1.01826	1.78425
	0.08% MW	-.22811	.483917	.998	-1.68175	1.22553
0.08% MW	negative control	-2.72890*	.769660	.023	-5.13905	-.31875
	original MW	.61110	.495897	.801	-.87652	2.09873
	0.12% MW	.22811	.483917	.998	-1.22553	1.68175

*. The mean difference is significant at the .05 level.

สรุป ณ 8 ชั่วโมงหลังการทดสอบพบว่าอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมมากกว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่น้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ One-way ANOVA with Post hoc comparison (Tamhane), p=0.001

1.1.5 **ชั่วโมงที่ 12 ข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติ**

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
RATIO	negative control	9	28.44
	original MW	9	14.56
	0.12% MW	9	12.11
	0.08% MW	9	18.89
	Total	36	

Test Statistics[a,b]

	RATIO
Chi-Square	12.602
df	3
Asymp. Sig.	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

ตารางแสดงการเปรียบเทียบอัตราส่วนเซลล์มีชีวิตต่อเซลล์ตายเป็นรายคู่ ณ เวลา 12 ชั่วโมง

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	28.44-14.56=13.88	$1.73*\sqrt{88}*0.25= 8.59$	DDW ≠ O
DDW-M1	28.44-12.11=16.33	8.59	DDW ≠ M1
DDW-M2	28.44-18.89=9.55	8.59	DDW ≠ M2
O-M1	14.56-12.11=2.45	8.59	O =M1
O-M2	18.89-14.56=4.33	8.59	O = M2
M1-M2	18.89-12.11=6.78	8.59	M1=M2

สรุป ณ เวลา 12 ชั่วโมงอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมมากว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่น้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test, p= 0.006

1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มโดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

1.2.1 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดและเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดในไบโอฟิล์ม ภายหลังได้รับน้ำยาบ้วนปากทันที (ชั่วโมงที่ 0)

เนื่องจากข้อมูลมีการกระจายที่ไม่ปกติจึงใช้สถิติไม่ใช้พารามิเตอร์ชนิด Kruskal-Wallis test

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
total bacteria	negative control	7	25.00
	original MW	7	10.14
	0.12% modified MW	7	10.57
	0.08% modified MW	7	12.29
	Total	28	
total streptococci	negative control	7	25.00
	original MW	7	9.93
	0.12% modified MW	7	9.64
	0.08% modified MW	7	13.43
	Total	28	
mutan streptococci	negative control	7	25.00
	original MW	7	6.29
	0.12% modified MW	7	11.50
	0.08% modified MW	7	15.21
	Total	28	

Test Statistics[a,b]

	total bacteria	total streptococci	mutan streptococci
Chi-Square	15.490	16.140	19.428
df	3	3	3
Asymp. Sig.	.001	.001	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

1.2.1.1 Total bacteria ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

ตารางแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟเป็นรายคู่ ณ เวลา 30 วินาที

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	25.00-10.14=14.86	1.73*$\sqrt{}$67.66*0.286= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	25.00-10.57=14.43	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	25.00-12.29=12.71	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	10.57-10.14=0.43	7.61	O =M1
O-M2	12.29-10.14=2.15	7.61	O = M2
M1-M2	12.29-10.57=1.72	7.61	M1=M2

ณ เวลา 30 วินาทีพบว่ากลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมดมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด แต่กลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามไม่มีความแตกต่างกัน Kruskal-Wallis test, p= 0.001

1.2.1.2 Total streptococci ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

ตารางแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคคัสเป็นรายคู่ ณ เวลา 30 วินาที

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	25.00-9.93=15.07	1.73*$\sqrt{}$67.66*0.286= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	25.00-9.64=15.36	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	25.00-13.43=11.57	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	9.93-9.64=0.29	7.61	O =M1
O-M2	13.43-9.93=3.5	7.61	O = M2
M1-M2	13.43-9.64=3.79	7.61	M1=M2

ณ เวลา 30 วินาทีพบว่ากลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด แต่กลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามไม่มีความแตกต่างกัน Kruskal-Wallis test, p= 0.001

1.2.1.3 mutans streptococci ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

ตารางแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคคัสเป็นรายคู่ ณ เวลา 30 วินาที

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	25.00-6.29=18.71	1.73*$\sqrt{}$67.66*0.286= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	25.00-11.50=13.50	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	25.00-15.21=9.79	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	11.50-6.29=5.21	7.61	O =M1
O-M2	15.21-6.29=8.92	7.61	O ≠ M2
M1-M2	15.21-11.50=3.71	7.61	M1=M2

ณ เวลา 30 วินาทีพบว่ากลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด และน้ำยาบ้วนปากสูตรดั้งเดิมน้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2 p= 0.001

1.2.2 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดและเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดในไบโอฟิล์ม ภายหลังได้รับน้ำยาบ้วนปากแล้ว 4 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 4)

1.2.2.1 Total bacteria ข้อมูลจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีการกระจายปกติและมีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มไม่ต่างกัน

ANOVA

total bacteria

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		38.944	3	12.981	9.530	.000
	Linear Term	Contrast	21.945	1	21.945	16.110	.001
		Deviation	17.000	2	8.500	6.240	.007
Within Groups			32.693	24	1.362		
Total			71.637	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: total bacteria

Bonferroni

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	2.81873*	.623859	.001	1.02508	4.61238
	0.12% modified MW	2.64150*	.623859	.002	.84785	4.43515
	0.08% modified MW	2.69849*	.623859	.001	.90484	4.49215
original MW	negative control	-2.81873*	.623859	.001	-4.61238	-1.02508
	0.12% modified MW	-.17723	.623859	1.000	-1.97088	1.61642
	0.08% modified MW	-.12024	.623859	1.000	-1.91389	1.67341
0.12% modified MW	negative control	-2.64150*	.623859	.002	-4.43515	-.84785
	original MW	.17723	.623859	1.000	-1.61642	1.97088
	0.08% modified MW	.05699	.623859	1.000	-1.73666	1.85065
0.08% modified MW	negative control	-2.69849*	.623859	.001	-4.49215	-.90484
	original MW	.12024	.623859	1.000	-1.67341	1.91389
	0.12% modified MW	-.05699	.623859	1.000	-1.85065	1.73666

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ณ เวลา 4 ชั่วโมงหลังการทดสอบพบว่ากลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมดมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด แต่กลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามไม่มีความแตกต่างกัน One-way ANOVA with Post hoc comparison (Bonferroni), p=0.001

1.2.2.2 Total streptococci มีการกระจายของข้อมูลไม่ปกติ

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
total streptococci	negative control	7	24.71
	original MW	7	10.00
	0.12% modified MW	7	11.79
	0.08% modified MW	7	11.50
	Total	28	

Test Statistics[a,b]

	total streptococci
Chi-Square	14.593
df	3
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

ตารางแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคคัสเป็นรายคู่ ณ เวลา 4 ชั่วโมง

ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	24.71-10.00= 14.71	$1.73*\sqrt{67.66*0.286}$= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	24.71-11.79=12.92	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	24.71-11.50=13.21	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	11.79-10.00=1.79	7.61	O =M1
O-M2	11.50-10.00=1.50	7.61	O = M2
M1-M2	11.79-11.50=0.29	7.61	M1=M2

ณ เวลา 4 ชั่วโมงพบว่ากลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดมากกว่ากลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด แต่กลุ่มน้ำยาบ้วนปากทั้งสามไม่มีความแตกต่างกัน Kruskal-Wallis test, p= 0.002

1.57.11.3 mutans streptococci มีการกระจายของข้อมูลไม่ปกติ

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
mutan streptococci	negative control	7	25.00
	original MW	7	8.57
	0.12% modified MW	7	11.86
	0.08% modified MW	7	12.57
	Total	28	

Test Statistics[a,b]

	mutan streptococci
Chi-Square	16.148
df	3
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	25.00-8.57= 16.43	$1.73*\sqrt{67.66*0.286}$= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	25.00-11.86=13.14	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	25.00-12.57=12.43	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	11.86-8.57=3.29	7.61	O =M1
O-M2	12.57-8.57=4.00	7.61	O = M2
M1-M2	12.57-11.86=0.71	7.61	M1=M2

1.2.3 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดและเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดในไบโอฟิล์ม ภายหลังได้รับน้ำยาบ้วนปากแล้ว 8 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 8) เนื่องจากข้อมูลของเชื้อทั้งสามกลุ่มมีการกระจายไม่ปกติ

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
total bacteria	negative control	7	22.43
	original MW	7	11.57
	0.12% modified MW	7	12.21
	0.08% modified MW	7	11.79
	Total	28	
total streptococci	negative control	7	24.57
	original MW	7	12.36
	0.12% modified MW	7	10.79
	0.08% modified MW	7	10.29
	Total	28	
mutan streptococci	negative control	7	24.00
	original MW	7	9.71
	0.12% modified MW	7	12.71
	0.08% modified MW	7	11.57
	Total	28	

Test Statistics[a,b]

	total bacteria	total streptococci	mutan streptococci
Chi-Square	8.695	14.236	12.923
df	3	3	3
Asymp. Sig.	.034	.003	.005

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

1.2.1.4 Total bacteria

ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	22.43-11.57=10.86	1.73*√67.66*0.286= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	22.43-12.21=10.22	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	22.43-11.79=10.64	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	12.21-11.57=0.64	7.61	O =M1
O-M2	11.79-11.57=0.22	7.61	O = M2
M1-M2	12.21-11.79=0.42	7.61	M1=M2

1.2.1.5 Total streptococci

ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	24.57-12.36=12.21	1.73*√67.66*0.286= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	24.57-10.79=13.78	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	24.57-10.29=14.28	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	12.36-10.79=1.57	7.61	O =M1
O-M2	12.36-10.29=2.07	7.61	O = M2
M1-M2	10.79-10.29=0.5	7.61	M1=M2

1.2.1.6 Mutans streptococci

ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	24.00-9.71=14.29	1.73*√67.66*0.286= 7.61	DDW ≠ O
DDW-M1	24.00-12.71=11.29	7.61	DDW ≠ M1
DDW-M2	24.00-11.57=12.43	7.61	DDW ≠ M2
O-M1	12.71-9.71=3	7.61	O =M1
O-M2	11.57-9.71=1.86	7.61	O = M2
M1-M2	12.71-11.57=1.14	7.61	M1=M2

1.3 ความจำเพาะต่อเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค

1.3.1 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

1.3.1.1 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ณ ชั่วโมงที่ 0

ข้อมูลมีการกระจายปกติและมีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน

ANOVA

ms/tb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.032	3	.011	.303	.823
Within Groups	.835	24	.035		
Total	.866	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ms/tb

Bonferroni

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	-.06014	.099680	1.000	-.34673	.22645
	0.12% modified MW	-.02650	.099680	1.000	-.31309	.26009
	0.08% modified MW	-.08881	.099680	1.000	-.37540	.19778
original MW	negative control	.06014	.099680	1.000	-.22645	.34673
	0.12% modified MW	.03364	.099680	1.000	-.25295	.32023
	0.08% modified MW	-.02867	.099680	1.000	-.31526	.25792
0.12% modified MW	negative control	.02650	.099680	1.000	-.26009	.31309
	original MW	-.03364	.099680	1.000	-.32023	.25295
	0.08% modified MW	-.06231	.099680	1.000	-.34890	.22428
0.08% modified MW	negative control	.08881	.099680	1.000	-.19778	.37540
	original MW	.02867	.099680	1.000	-.25792	.31526
	0.12% modified MW	.06231	.099680	1.000	-.22428	.34890

1.3.1.2 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ณ ชั่วโมงที่ 4

ข้อมูลมีการกระจายปกติแต่มีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน

ANOVA

ms/tb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.086	3	.029	1.500	.240
Within Groups	.460	24	.019		
Total	.546	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ms/tb

Tamhane

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	.05228	.084337	.991	-.21451	.31907
	0.12% modified MW	.07898	.066721	.858	-.16788	.32584
	0.08% modified MW	-.06634	.088703	.978	-.34529	.21262
original MW	negative control	-.05228	.084337	.991	-.31907	.21451
	0.12% modified MW	.02670	.055531	.998	-.17559	.22898
	0.08% modified MW	-.11862	.080625	.667	-.37253	.13529
0.12% modified MW	negative control	-.07898	.066721	.858	-.32584	.16788
	original MW	-.02670	.055531	.998	-.22898	.17559
	0.08% modified MW	-.14532	.061962	.279	-.37327	.08263
0.08% modified MW	negative control	.06634	.088703	.978	-.21262	.34529
	original MW	.11862	.080625	.667	-.13529	.37253
	0.12% modified MW	.14532	.061962	.279	-.08263	.37327

1.3.1.3 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ณ ชั่วโมงที่ 8

ข้อมูลมีการกระจายปกติและมีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน

ANOVA

ms/tb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.009	3	.003	.061	.980
Within Groups	1.187	24	.049		
Total	1.197	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ms/tb

Bonferroni

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	.03631	.118895	1.000	-.30553	.37815
	0.12% modified MW	.03526	.118895	1.000	-.30658	.37709
	0.08% modified MW	-.00049	.118895	1.000	-.34233	.34135
original MW	negative control	-.03631	.118895	1.000	-.37815	.30553
	0.12% modified MW	-.00105	.118895	1.000	-.34289	.34078
	0.08% modified MW	-.03680	.118895	1.000	-.37864	.30504
0.12% modified MW	negative control	-.03526	.118895	1.000	-.37709	.30658
	original MW	.00105	.118895	1.000	-.34078	.34289
	0.08% modified MW	-.03575	.118895	1.000	-.37758	.30609
0.08% modified MW	negative control	.00049	.118895	1.000	-.34135	.34233
	original MW	.03680	.118895	1.000	-.30504	.37864
	0.12% modified MW	.03575	.118895	1.000	-.30609	.37758

1.3.2 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด

1.3.1.2 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด ณ ชั่วโมงที่ 0

ANOVA

ms/tb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.032	3	.011	.303	.823
Within Groups	.835	24	.035		
Total	.866	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ms/tb

Bonferroni

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	-.06014	.099680	1.000	-.34673	.22645
	0.12% modified MW	-.02650	.099680	1.000	-.31309	.26009
	0.08% modified MW	-.08881	.099680	1.000	-.37540	.19778
original MW	negative control	.06014	.099680	1.000	-.22645	.34673
	0.12% modified MW	.03364	.099680	1.000	-.25295	.32023
	0.08% modified MW	-.02867	.099680	1.000	-.31526	.25792
0.12% modified MW	negative control	.02650	.099680	1.000	-.26009	.31309
	original MW	-.03364	.099680	1.000	-.32023	.25295
	0.08% modified MW	-.06231	.099680	1.000	-.34890	.22428
0.08% modified MW	negative control	.08881	.099680	1.000	-.19778	.37540
	original MW	.02867	.099680	1.000	-.25792	.31526
	0.12% modified MW	.06231	.099680	1.000	-.22428	.34890

1.3.1.3 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด ณ ชั่วโมงที่ 4

ANOVA

ms/tb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.086	3	.029	1.500	.240
Within Groups	.460	24	.019		
Total	.546	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ms/tb

Tamhane

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original MW	.05228	.084337	.991	-.21451	.31907
	0.12% modified MW	.07898	.066721	.858	-.16788	.32584
	0.08% modified MW	-.06634	.088703	.978	-.34529	.21262
original MW	negative control	-.05228	.084337	.991	-.31907	.21451
	0.12% modified MW	.02670	.055531	.998	-.17559	.22898
	0.08% modified MW	-.11862	.080625	.667	-.37253	.13529
0.12% modified MW	negative control	-.07898	.066721	.858	-.32584	.16788
	original MW	-.02670	.055531	.998	-.22898	.17559
	0.08% modified MW	-.14532	.061962	.279	-.37327	.08263
0.08% modified MW	negative control	.06634	.088703	.978	-.21262	.34529
	original MW	.11862	.080625	.667	-.13529	.37253
	0.12% modified MW	.14532	.061962	.279	-.08263	.37327

1.3.1.4 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด ณ ชั่วโมงที่ 8

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
ms/ts	negative control	7	12.86
	original MW	7	13.57
	0.12% modified MW	7	16.14
	0.08% modified MW	7	15.43
	Total	28	

Test Statistics[a,b]

	ms/ts
Chi-Square	.737
df	3
Asymp. Sig.	.865

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อบน ไบโอฟิล์ม

2.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อบนไบโอฟิล์ม ด้วยวิธีย้อมสีเซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซ้นท์

ANOVA

green/red ratio

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		8.560	3	2.853	28.017	.000
	Linear Term	Contrast	5.437	1	5.437	53.384	.000
		Deviation	3.123	2	1.562	15.334	.000
Within Groups			2.852	28	.102		
Total			11.411	31			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: green/red ratio

Tamhane

(I) ชนิดของน้ำยาบ้วนปาก	(J) ชนิดของน้ำยาบ้วนปาก	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
negative control	original mouthwash	1.16887*	.218912	.005	.39594	1.94179
	0.12% modified mouthwash	1.19028*	.219684	.004	.41799	1.96256
	0.08% modified mouthwash	1.22175*	.216960	.004	.44681	1.99670
original mouthwash	negative control	-1.16887*	.218912	.005	-1.94179	-.39594
	0.12% modified mouthwash	.02141	.062036	1.000	-.16853	.21135
	0.08% modified mouthwash	.05289	.051566	.905	-.10741	.21319
0.12% modified mouthwash	negative control	-1.19028*	.219684	.004	-1.96256	-.41799
	original mouthwash	-.02141	.062036	1.000	-.21135	.16853
	0.08% modified mouthwash	.03148	.054751	.994	-.14025	.20321
0.08% modified mouthwash	negative control	-1.22175*	.216960	.004	-1.99670	-.44681
	original mouthwash	-.05289	.051566	.905	-.21319	.10741
	0.12% modified mouthwash	-.03148	.054751	.994	-.20321	.14025

*. The mean difference is significant at the .05 level.

2.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อบนไบโอฟิล์มด้วยวิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

พบว่าข้อมูลจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนเชื้อกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดและจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดมีการกระจายปกติและมีความแปรปรวนแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน

ANOVA

				Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
total bacteria	Between Groups	(Combined)		18.055	3	6.018	56.089	.000
		Linear Term	Contrast	8.962	1	8.962	83.521	.000
			Deviation	9.093	2	4.547	42.372	.000
	Within Groups			3.004	28	.107		
	Total			21.059	31			
total streptococci	Between Groups	(Combined)		12.131	3	4.044	21.920	.000
		Linear Term	Contrast	5.333	1	5.333	28.910	.000
			Deviation	6.798	2	3.399	18.425	.000
	Within Groups			5.165	28	.184		
	Total			17.296	31			
mutan streptococci	Between Groups	(Combined)		10.584	3	3.528	13.823	.000
		Linear Term	Contrast	4.197	1	4.197	16.442	.000
			Deviation	6.387	2	3.194	12.513	.000
	Within Groups			7.146	28	.255		
	Total			17.730	31			

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
total bacteria	negative control	original MW	1.84818*	.163782	.000	1.38321	2.31315
		0.12% modified MW	1.69907*	.163782	.000	1.23410	2.16404
		0.08% modified MW	1.62747*	.163782	.000	1.16251	2.09244
	original MW	negative control	-1.84818*	.163782	.000	-2.31315	-1.38321
		0.12% modified MW	-.14911	.163782	1.000	-.61408	.31586
		0.08% modified MW	-.22071	.163782	1.000	-.68567	.24426
	0.12% modified MW	negative control	-1.69907*	.163782	.000	-2.16404	-1.23410
		original MW	.14911	.163782	1.000	-.31586	.61408
		0.08% modified MW	-.07160	.163782	1.000	-.53657	.39337
	0.08% modified MW	negative control	-1.62747*	.163782	.000	-2.09244	-1.16251
		original MW	.22071	.163782	1.000	-.24426	.68567
		0.12% modified MW	.07160	.163782	1.000	-.39337	.53657
total streptococci	negative control	original MW	1.56089*	.214750	.000	.95123	2.17055
		0.12% modified MW	1.36421*	.214750	.000	.75455	1.97387
		0.08% modified MW	1.28269*	.214750	.000	.67302	1.89235
	original MW	negative control	-1.56089*	.214750	.000	-2.17055	-.95123
		0.12% modified MW	-.19668	.214750	1.000	-.80634	.41298
		0.08% modified MW	-.27820	.214750	1.000	-.88787	.33146
	0.12% modified MW	negative control	-1.36421*	.214750	.000	-1.97387	-.75455
		original MW	.19668	.214750	1.000	-.41298	.80634
		0.08% modified MW	-.08153	.214750	1.000	-.69119	.52814
	0.08% modified MW	negative control	-1.28269*	.214750	.000	-1.89235	-.67302
		original MW	.27820	.214750	1.000	-.33146	.88787
		0.12% modified MW	.08153	.214750	1.000	-.52814	.69119
mutan streptococci	negative control	original MW	1.48587*	.252600	.000	.76875	2.20298
		0.12% modified MW	1.25494*	.252600	.000	.53782	1.97205
		0.08% modified MW	1.15665*	.252600	.001	.43954	1.87377
	original MW	negative control	-1.48587*	.252600	.000	-2.20298	-.76875
		0.12% modified MW	-.23093	.252600	1.000	-.94805	.48618
		0.08% modified MW	-.32922	.252600	1.000	-1.04633	.38790
	0.12% modified MW	negative control	-1.25494*	.252600	.000	-1.97205	-.53782
		original MW	.23093	.252600	1.000	-.48618	.94805
		0.08% modified MW	-.09829	.252600	1.000	-.81540	.61883
	0.08% modified MW	negative control	-1.15665*	.252600	.001	-1.87377	-.43954
		original MW	.32922	.252600	1.000	-.38790	1.04633
		0.12% modified MW	.09829	.252600	1.000	-.61883	.81540

*. The mean difference is significant at the .05 level.

2.2.1 การลดลงของจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคเทียบกับกลุ่มควบคุม

ANOVA

DDW-test, mutan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	2	.001	.002	.998
Within Groups	11.513	21	.548		
Total	11.516	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DDW-test, mutan
Bonferroni

(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
original MW	0.12% modified MW	.01451	.370223	1.000	-.94858	.97759
	0.08% modified MW	.02356	.370223	1.000	-.93952	.98664
0.12% modified MW	original MW	-.01451	.370223	1.000	-.97759	.94858
	0.08% modified MW	.00905	.370223	1.000	-.95403	.97213
0.08% modified MW	original MW	-.02356	.370223	1.000	-.98664	.93952
	0.12% modified MW	-.00905	.370223	1.000	-.97213	.95403

2.2.2 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
ms/tb	negative control	8	10.25
	original MW	8	11.75
	0.12% modified MW	8	21.25
	0.08% modified MW	8	22.75
	Total	32	

Test Statistics[a,b]

	ms/tb
Chi-Square	11.205
df	3
Asymp. Sig.	.011

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

Ri-Rj ≥ ค่าวิกฤตจากสูตร = มีความแตกต่าง

Ri-Rj < ค่าวิกฤตจากสูตร = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่า mean rank ได้จาก kruskal wallis test

i-j	Ri-Rj	ค่าวิกฤตจากสูตร	ผลสรุป
DDW-O	11.75-10.25=1.5	$1.73*\sqrt{88}*0.25=8.114$	DDW = O
DDW-M1	21.25-10.25=11	8.114	DDW ≠ M1
DDW-M2	22.75-10.25=12.5	8.114	DDW ≠ M2
O-M1	21.25-11.75=9.5	8.114	O ≠M1
O-M2	22.75-11.75=11	8.114	O ≠ M2
M1-M2	22.75-21.25=1.5	8.114	M1=M2

2.2.3 อัตราส่วนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคทั้งหมดต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

Ranks

	TYPE	N	Mean Rank
ms/ts	negative control	8	11.13
	original MW	8	14.63
	0.12% modified MW	8	19.38
	0.08% modified MW	8	20.88
	Total	32	

Test Statistics[a,b]

	ms/ts
Chi-Square	5.438
df	3
Asymp. Sig.	.142

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: TYPE

ภาคผนวก ซ
คู่มือการใช้สีย้อมเซลล์

Molecular Probes
Invitrogen detection technologies

Product Information

Revised: 15-July-2004

LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits

L7007 LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit *"for microscopy"*
L7012 LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit *"for microscopy and quantitative assays"*
L13152 LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit *"10 applicator sets"*

Quick Facts

Storage upon receipt:

Kits L7007 and L7012
- ≤–20°C
- Protect from light

Kit L13152
- Room temperature
- Protect from light

Note: Do not use Component C as immersion oil.

Introduction

Molecular Probes' LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kits provide a novel two-color fluorescence assay of bacterial viability that has proven useful for a diverse array of bacterial genera. Conventional direct-count assays of bacterial viability are based on metabolic characteristics or membrane integrity. However, methods relying on metabolic characteristics often only work for a limited subset of bacterial groups,[1] and methods for assessing bacterial membrane integrity commonly have high levels of background fluorescence.[2] Both types of determinations suffer from being very sensitive to growth and staining conditions.[3,4] Because of the marked differences in morphology, cytology and physiology among the many bacterial genera, a universally applicable direct-count viability assay has been very difficult to achieve. Our LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits now allow researchers to easily, reliably and quantitatively distinguish live and dead bacteria in minutes, even in a mixed population containing a range of bacterial types.

The LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits utilize mixtures of our SYTO® 9 green-fluorescent nucleic acid stain and the red-fluorescent nucleic acid stain, propidium iodide. These stains differ both in their spectral characteristics and in their ability to penetrate healthy bacterial cells. When used alone, the SYTO 9 stain generally labels all bacteria in a population — those with intact membranes and those with damaged membranes. In contrast, propidium iodide penetrates only bacteria with damaged membranes, causing a reduction in the SYTO 9 stain fluorescence when both dyes are present. Thus, with an appropriate mixture of the SYTO 9 and propidium iodide stains, bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green, whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red. The excitation/emission maxima for these dyes are about 480/500 nm for SYTO 9 stain and 490/635 nm for propidium iodide. The background remains virtually nonfluorescent. Furthermore, although the dye ratios suggested for the LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits have been found to work well with a broad spectrum of bacterial types, these kits also accommodate fine-tuning of the dye combinations so that optimal staining of bacteria can be achieved under a variety of environmental conditions.

A common criterion for bacterial viability is the ability of a bacterium to reproduce in suitable nutrient medium. Exponentially growing cultures of bacteria typically yield results with the LIVE/DEAD *Bac*Light bacterial viability assay that correlate well with growth assays in liquid or solid media. Under certain conditions, however, bacteria having compromised membranes may be able to recover and reproduce — such bacteria may be scored as "dead" in this assay. Conversely, some bacteria with intact membranes may be unable to reproduce in nutrient medium, and yet these may be scored as "alive."[5]

The LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits have been thoroughly tested with a variety of organisms and under several different conditions (see *Bacteria That Have Been Tested*, below). The kits are well suited for use in fluorescence microscopy or for use in quantitative analysis with a fluorometer, fluorescence microplate reader, flow cytometer[6] or other instrumentation. In our original LIVE/DEAD *Bac*Light Kit (L7007), the dyes are provided mixed at different proportions in two solutions. Kit L7007 is still available for customers who have already developed protocols using that formulation. Kit L7012, however, is more flexible because it provides separate solutions of the SYTO 9 and propidium iodide stains. Having separate staining components facilitates the calibration of bacterial fluorescence for quantitative procedures. For added convenience, our LIVE/DEAD *Bac*Light kit (L13152) contains the separate dyes premeasured into pairs of polyethylene transfer pipets. Besides having the convenience of being packaged in handy applicator pipets, kit L13152 has a formulation that does not require dimethyl sulfoxide (DMSO), nor does it require refrigerated storage.

The LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits are intended as research tools and our Technical Assistance Department welcomes any feedback on the performance of these kits with bacterial strains and environmental conditions not described in this enclosure.

Materials

Kit Contents for Viability Kit, L7007

- **SYTO 9 dye, 1.67 mM / Propidium iodide, 1.67 mM** (Component A), 300 µL solution in DMSO
- **SYTO 9 dye, 1.67 mM / Propidium iodide, 18.3 mM** (Component B), 300 µL solution in DMSO
- ***Bac*Light mounting oil** (Component C), 10 mL, for bacteria immobilized on membranes. The refractive index at 25°C is 1.517 ± 0.003. DO NOT USE FOR IMMERSION OIL.

Kit Contents for Viability Kit, L7012

- **SYTO 9 dye, 3.34 mM** (Component A), 300 µL solution in DMSO
- **Propidium iodide, 20 mM** (Component B), 300 µL solution in DMSO
- ***Bac*Light mounting oil** (Component C), 10 mL, for bacteria immobilized on membranes. The refractive index at 25°C is 1.517 ± 0.003. DO NOT USE FOR IMMERSION OIL.

Note that a 1:1 mixture of Components A and B of kit L7012 is exactly equivalent to a 1:1 mixture of Components A and B of kit L7007.

Kit Contents for Viability Kit, L13152

- **SYTO 9 dye** (Component A), stabilized as a solid in 10 sealed applicator pipets
- **Propidium iodide** (Component B), as a solid in 10 sealed applicator pipets
- ***Bac*Light mounting oil** (Component C), 10 mL, for bacteria immobilized on membranes. The refractive index at 25°C is 1.517 ± 0.003. DO NOT USE FOR IMMERSION OIL.

For use of the applicator pipets provided in kit L13152, snip off the sealed ends and dissolve the contents in deionized water, as described in the protocols below.

Number of Tests Possible

At the recommended reagent dilutions and volumes, kits L7007 and L7012 contain sufficient material to perform ≥1000 individual tests in 96-well assay plates, many more tests by fluorescence microscopy or ~200 tests by flow cytometry. In kit L13152, each applicator pair contains sufficient dye to perform 50 individual tests in a 96-well assay plate, ~1000 assays by fluorescence microscopy or 10 tests by flow cytometry.

Storage and Handling

For either kit L7007 or L7012, the DMSO stock solutions should be stored frozen at ≤–20°C and protected from light. Allow reagents to warm to room temperature and centrifuge briefly before opening the vials. Before refreezing, seal all vials tightly. When stored properly, these stock solutions are stable for at least one year.

For kit L13152, store at room temperature, protected from light. The new stain formulation is solid phase and is chemically stable when stored at 37°C for more than six months, protected from light. The dissolved dye solutions are stable for up to a year, when stored frozen at ≤–20°C and protected from light.

The *Bac*Light mounting oil may be stored at room temperature, and is stable indefinitely.

Caution: Propidium iodide and SYTO 9 stain bind to nucleic acids. Propidium iodide is a potential mutagen, and we have no data addressing the mutagenicity or toxicity of the SYTO 9 stain. Both reagents should be used with appropriate care. The DMSO stock solutions should be handled with particular caution as DMSO is known to facilitate the entry of organic molecules into tissues. We strongly recommend using double gloves when handling the DMSO stock solutions. As with all nucleic acid stains, solutions containing these reagents should be poured through activated charcoal before disposal. The charcoal must then be incinerated to destroy the dyes.

Experimental Protocols, General Considerations

The following protocols are provided as examples to guide researchers in the development of their own bacterial staining procedures. Researchers at Molecular Probes have used these procedures and found them to be simple and reliable for both gram-positive and gram-negative bacteria.

Culture Conditions and Preparation of Bacterial Suspensions

Note: Care must be taken to remove traces of growth medium before staining bacteria with these kit reagents. The nucleic acids and other media components can bind the SYTO 9 and propidium iodide dyes in unpredictable ways, resulting in unacceptable variations in staining. A single wash step is usually sufficient to remove significant traces of interfering media components from the bacterial suspension. Phosphate wash buffers are not recommended because they appear to decrease staining efficiency.

1.1 Grow 30 mL cultures of either *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* to late log phase in nutrient broth (e.g., DIFCO catalog number 0003-01-6).

1.2 Concentrate 25 mL of the bacterial culture by centrifugation at 10,000 × g for 10–15 minutes.

1.3 Remove the supernatant and resuspend the pellet in 2 mL of 0.85% NaCl or appropriate buffer.

1.4 Add 1 mL of this suspension to each of two 30–40 mL centrifuge tubes containing either 20 mL of 0.85% NaCl or appropriate buffer (for live bacteria) or 20 mL of 70% isopropyl alcohol (for killed bacteria).

1.5 Incubate both samples at room temperature for 1 hour, mixing every 15 minutes.

1.6 Pellet both samples by centrifugation at 10,000 × g for 10–15 minutes.

1.7 Resuspend the pellets in 20 mL of 0.85% NaCl or appropriate buffer and centrifuge again as in step 1.6.

1.8 Resuspend both pellets in separate tubes with 10 mL of 0.85% NaCl or appropriate buffer each.

1.9 Determine the optical density at 670 nm (OD_{670}) of a 3 mL aliquot of the bacterial suspensions in glass or acrylic absorption cuvettes (1 cm pathlength).

1.10 For suggested concentrations of *E. coli* or *S. aureus* suspensions, please refer to the section appropriate for your

instrumentation: fluorescence microscope, fluorometer, fluorescence microplate reader or flow cytometer.

Bacteria That Have Been Tested

The LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits have been tested at Molecular Probes on the following bacterial species: *Bacillus cereus, B. subtilis, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Micrococcus luteus, Mycobacterium phlei, Pseudomonas aeruginosa, P. syringae, Salmonella oranienburg, Serratia marcescens, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. All of these bacterial types have shown a good correlation between the results obtained with the LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kits and those obtained with standard plate counts. These tests were performed on logarithmically growing cultures of organisms. In addition, we have received favorable reports from researchers who have used these kits with: *Agrobacterium tumefaciens, Edwardsiella ictaluri, Eurioplasma aurilytica, Lactobacillus* sp., *Mycoplasma hominus, Propionibacterium* sp., *Proteus mirabilis* and *Zymomonas* sp.

Optimization of Staining

The two dye components provided with the LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits have been balanced so that a 1:1 mixture provides good live/dead discrimination in most applications. Occasionally, however, the proportions of the two dyes must be adjusted for optimal discrimination. For example, if green fluorescence is too prominent in the preparation, we suggest that you try either lowering the concentration of SYTO 9 stain (by using less of Component A) or by raising the concentration of propidium iodide (by using more of Component B).

To thoroughly optimize the staining, we recommend experimenting with a range of concentrations of SYTO 9 dye, each in combination with a range of propidium iodide concentrations. In the case of Kits L7007 and L7012, you may wish to try staining 1.0 mL of the bacterial suspension with 3 µL of dye pre-mixed at different Component A:Component B ratios. In the case of kit L13152, separate dye solutions can be made by dissolving the contents of one Component A pipet in 2.5 mL filter-sterilized dH_2O and the contents of one Component B pipet in 2.5 mL filter-sterilized dH_2O. These separate solutions can be blended at different ratios, and then the mixtures applied 1:1 with the bacterial suspension.

Fluorescence Microscopy Protocols

Selection of Optical Filters

The fluorescence from both live and dead bacteria may be viewed simultaneously with any standard fluorescein longpass filter set. Alternatively, the live (green fluorescent) and dead (red fluorescent) cells may be viewed separately with fluorescein and Texas Red bandpass filter sets. A summary of the fluorescence microscope filter sets recommended for use with the LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kits shown in Table 1.

Staining Bacteria in Suspension with either Kit L7007 or L7012

2.1 Combine equal volumes of Component A and Component B in a microfuge tube, mix thoroughly.

2.2 Add 3 µL of the dye mixture for each mL of the bacterial suspension. When used at the recommended dilutions, the reagent mixture will contribute 0.3% DMSO to the staining solution. Higher DMSO concentrations may adversely affect staining.

2.3 Mix thoroughly and incubate at room temperature in the dark for 15 minutes.

2.4 Trap 5 µL of the stained bacterial suspension between a slide and an 18 mm square coverslip.

2.5 Observe in a fluorescence microscope equipped with any of the filter sets listed in Table 1.

Staining Bacteria in Suspension with Kit L13152

3.1 Prepare a 2X stock solution of the LIVE/DEAD *Bac*Light staining reagent mixture by dissolving the contents of one Component A pipet (containing yellow-orange solids) and one Component B pipet (containing red solids) in a common 5 mL–volume of filter-sterilized dH_2O.

3.2 Combine a sample of the 2X stock solution with an equal volume of the bacterial suspension. The final concentration of each dye will be 6 µM SYTO 9 stain and 30 µM propidium iodide.

Table 1. Characteristics of common filters suitable for use with the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits.

Omega Filters*	Chroma Filters*	Notes
XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010	Longpass and dual emission filters useful for simultaneous viewing of SYTO 9 and propidium iodide stains
XF22, XF23	31001, 41001	Bandpass filters for viewing SYTO 9 alone
XF32, XF43 XF102, XF108	31002, 31004 41002, 41004	Bandpass filters for viewing propidium iodide alone

* Catalog numbers for recommended bandpass filter sets for fluorescence microscopy. Omega® filters are supplied by Omega Optical Inc. (www.omegafilters.com). Chroma filters are supplied by Chroma Technology Corp. (www.chroma.com).

between 620–650 (em2; red) for each bacterial suspension.

$$\text{Ratio}_{G/R} = \frac{F_{cell,em1}}{F_{cell,em2}}$$

6.3 Plot the ratio of integrated green fluorescence to integrated red fluorescence ($R_{G/R}$) versus percentage of live cells in the *E. coli* suspension (Figure 1b).

Fluorescence Microplate Readers

Conditions required for measurement of fluorescence in microplate readers are very similar to those required for fluorescence spectroscopy of bacterial cell suspensions. As in fluorescence spectroscopy experimental protocols, reagent concentrations are the same as those recommended for fluorescence microscopy, and the ratio of green to red fluorescence emission is proportional to the relative numbers of live bacteria.

Staining Bacterial Suspensions with either Kit L7007 or L7012

7.1 Adjust the *E. coli* suspensions (live and killed) to 2×10^8 bacteria/mL (~0.06 OD_{670}) or the *S. aureus* suspensions (live and killed) to 2×10^7 bacteria/mL (~0.30 OD_{670}). *S. aureus* suspensions typically should be 10-fold less concentrated than *E. coli* when using a fluorescence microplate reader.

Table 3. *Volumes of live- and dead-cell suspensions to mix to achieve various proportions of live:dead cells for fluorescence microplate readers.*

Ratio of Live:Dead Cells	mL Live-Cell Suspension	mL Dead-Cell Suspension
0:100	0	2.0
10:90	0.2	1.8
50:50	1.0	1.0
90:10	1.8	0.2
100:0	2.0	0

7.2 Mix five different proportions of *E. coli* or *S. aureus* (Table 3) in 16 × 125 mm borosilicate glass culture tubes. The total volume of each of the five samples will be 2 mL.

7.3 Mix 6 µL of Component A with 6 µL of Component B in a microfuge tube.

7.4 Prepare a 2X stain solution by adding the entire 12 µL of the above mixture to 2.0 mL of filter-sterilized dH_2O in a 16 × 125 mm borosilicate glass culture tube and mix well.

7.5 Pipet 100 µL of each of the bacterial cell suspension mixtures into separate wells of a 96-well flat-bottom microplate. We recommend that you prepare samples in triplicate. The outside wells (rows A and H and columns 1 and 12) are usually kept empty to avoid spurious readings.

7.6 Using a new tip for each well, pipet 100 µL of the 2X staining solution (from step 7.4) to each well and mix thoroughly by pipetting up and down several times.

7.7 Incubate at room temperature in the dark for 15 minutes.

Staining Bacterial Suspensions with Kit L13152

8.1 Adjust the *E. coli* suspensions (live and killed) to 4×10^8 bacteria/mL (~0.12 OD_{670}) or the *S. aureus* suspensions (live and killed) to 4×10^7 bacteria/mL (~0.60 OD_{670}). *S. aureus* suspensions typically should be 10-fold less concentrated than *E. coli* when using a fluorescence microplate reader.

8.2 Mix five different proportions of *E. coli* or *S. aureus* (Table 3) in 16 × 125 mm borosilicate glass culture tubes.

8.3 Prepare a 2X working solution of the LIVE/DEAD *Bac*Light staining reagent mixture by dissolving the contents of one Component A pipet (containing yellow-orange solids) and one Component B pipet (containing red solids) in a common 5 mL–volume of filter-sterilized dH_2O.

8.4 Pipet 100 µL of each of the bacterial cell suspension mixtures into separate wells of a 96-well flat-bottom microplate. We recommend that you prepare samples in triplicate. The outside wells (rows A and H and columns 1 and 12) are usually kept empty to avoid spurious readings.

8.5 Using a new tip for each well, pipet 100 µL of the 2X working stain solution (from step 8.3) to each well and mix thoroughly by pipetting up and down several times.

8.6 Incubate the sample at room temperature in the dark for 15 minutes.

Fluorescence Measurement and Data Analysis

9.1 With the excitation wavelength centered at about 485 nm, measure the fluorescence intensity at a wavelength centered at about 530 nm (emission 1; green) for each well of the entire plate.

9.2 With the excitation wavelength still centered at about 485 nm, measure the fluorescence intensity at a wavelength centered about 630 nm (emission 2; red) for each well of the entire plate.

9.3 Analyze the data by dividing the fluorescence intensity of the stained bacterial suspensions (F_{cell}) at emission 1 by the fluorescence intensity at emission 2.

$$\text{Ratio}_{G/R} = \frac{F_{cell,em1}}{F_{cell,em2}}$$

9.4 Plot the $\text{Ratio}_{G/R}$ versus percentage of live cells in the *E. coli* suspension (Figure 2).

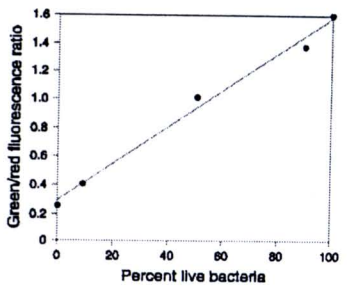


Figure 2. Analysis of relative viability of E. coli suspensions in a fluorescence microplate reader. Samples of E. coli were prepared and stained as outlined in the text. The integrated intensities of the green (530 ± 12.5 nm) and red (620 ± 20 nm) emission of suspensions excited at 485 ± 10 nm were acquired, and the green/red fluorescence ratios ($Ratio_{G/R}$) were calculated for each proportion of live/dead E. coli. Each point represents the mean of ten measurements. The line is a least-squares fit of the relationship between % live bacteria (x) and $Ratio_{G/R}$ (y).

Flow Cytometry

Instrument capabilities may vary considerably but the techniques and parameters established here should aid considerably in setting up similar analyses in the majority of flow cytometers now in use, both in research and clinical environments.

Table 4. Volumes of live- and dead-cell suspensions to mix to achieve various proportions of live:dead cells for flow cytometry.

Ratio of Live:Dead Cells	mL Live-Cell Suspension	mL Dead-Cell Suspension
0:100	0	2.0
10:90	0.2	1.8
20:80	0.4	1.6
30:70	0.6	1.4
40:60	0.8	1.2
50:50	1.0	1.0
60:40	1.2	0.8
70:30	1.4	0.6
80:20	1.6	0.4
90:10	1.8	0.2
100:0	2.0	0

Staining Bacterial Suspensions with either Kit L7007 or L7012

10.1 Adjust the *E. coli* suspensions (live and killed) to 1×10^9 bacteria/mL (~0.03 OD_{670}), then dilute them 1:100 in filter-sterilized dH_2O to reach a final density of 1×10^6 bacteria/mL.

10.2 Mix 11 different proportions of *E. coli* in 16 × 125 mm borosilicate glass tubes according to Table 4. The volume of each of the 11 samples will be 2 mL.

10.3 Mix 35 µL of Component A with 35 µL of Component B in a microfuge tube. If Kit L7012 is used, it may be desirable to prepare additional bacterial samples for staining with Component A alone and with Component B alone.

10.4 Add 6 µL of the combined reagent mixture to each of the 11 samples (11 samples x 6 µL = 66 µL total) and mix thoroughly by pipetting up and down several times.

10.5 Incubate at room temperature in the dark for 15 minutes.

Staining Bacterial Suspensions with Kit L13152

11.1 Adjust the *E. coli* suspensions (live and killed) to 1×10^9 bacteria/mL (~0.03 OD_{670}), then dilute them 1:50 in filter-sterilized dH_2O to reach a final density of 2×10^6 bacteria/mL.

11.2 Mix 11 different proportions of *E. coli* in 16 × 125 mm borosilicate glass tubes according to Table 4. Note that when using kit L13152, only one-half of the cell suspension volume (1.0 mL) listed in Table 3 will be used.

11.3 Prepare a 2X working solution of the LIVE/DEAD *Bac*Light staining reagent mixture by dissolving the contents of one Component A pipet (containing yellow-orange solids) and one Component B pipet (containing red solids) in a common 5 mL-volume of filter-sterilized dH_2O. It may be desirable to prepare additional bacterial samples for staining with Component A alone (dissolved in 5 mL of filter-sterilized dH_2O) and with Component B alone (dissolved in 5 mL of filter-sterilized dH_2O).

11.4 Mix 1 mL of the 2X working solution of the LIVE/DEAD *Bac*Light staining reagent mixture with an equal volume (1 mL) of the bacterial suspension. Note that, as described above, three applicator sets will be needed (11 samples × 1 mL = 11 mL total); however it may be possible to use smaller volumes.

11.5 Incubate the sample at room temperature in the dark for 15 minutes.