

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของโยเกิร์ตโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ต่อเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากและการเกิดฟันผุในเด็กอายุ 12-15 ปี: การศึกษาแบบสุ่มชนิคมิ กลุ่มควบคุมที่มีการปกปิดสองทาง

ชวรสต์ มาไพศาลสิน*,** รวี เถียรไพศาล**,*** พิชานัน ศรีสมหมาย*,** สุพัชรินทร์ พิวัฒน์*,**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินและเปรียบเทียบผลของโยเกิร์ตโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค แลคโตบาซิลโล และสภาวะฟันผุในเด็ก ทำการศึกษาโดยวิธีการสุ่มเข้ากลุ่มแบบมีกลุ่มควบคุมและมีการปกปิดสองทาง อาสาสมัครอายุ 12-15 ปี จำนวน 102 คน ถูกสุ่มเข้ากลุ่มศึกษาที่ได้โยเกิร์ตที่มีโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 หรือกลุ่มควบคุมที่ได้โยเกิร์ตปกติที่มีแลคโตบาซิลลัส บัลการิส โดยทั้งสองกลุ่มได้โยเกิร์ตปริมาณ 100 มิลลิกรัม ทุกวันเป็นเวลา 3 เดือน ทำการนับจำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค และแลคโตบาซิลโลในน้ำลายที่เวลาเริ่มต้น (T0) 3 เดือน (T3) 6 เดือน (T6) และ 9 เดือน (T9) และตรวจการเกิดฟันผุที่เวลา 9 เดือน เทียบกับเวลาเริ่มต้น พบว่าที่เวลา 3 เดือน ในกลุ่มโพรไบโอติกมีปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค ต่ำกว่าก่อนการทดลองและต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบเชื้อแลคโตบาซิลโลที่เวลา 3 เดือน สูงกว่าก่อนการทดลองและสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตามที่เวลา 6 เดือนและ 9 เดือนระดับเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม การเปลี่ยนแปลงสภาวะฟันผุ (transitional probability) ระหว่าง 2 กลุ่ม พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่พบอาการข้างเคียงใด ๆ ในทั้ง 2 กลุ่ม สรุปผลการศึกษาพบว่าการได้รับแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีความปลอดภัย พบการเพิ่มขึ้นของแลคโตบาซิลโล มีการลดลงของเชื้อก่อโรคฟันผุ มิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค ใน 3 เดือน แต่ไม่พบผลต่อการป้องกันการลุกลามของฟันผุ

คำสำคัญ : โพรไบโอติก แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 มิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค ฟันผุ เด็ก

วันที่รับบทความ 21 สิงหาคม 2566

วันที่แก้ไขบทความ 26 พฤศจิกายน 2566

วันที่ตอบรับบทความ 19 ธันวาคม 2566

*สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

**ศูนย์วิจัยโรคที่พบบ่อยในช่องปากและวิทยาการระบาด มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

***สาขาวิชาโสตศูรวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

ติดต่อผู้นิพนธ์ สุพัชรินทร์ พิวัฒน์ อีเมล : supacharin@hotmail.com

doi : 10.14456/thdentphj.2024.4

Original article

Effect of *Lactobacillus rhamnosus* SD11 as a probiotic in yogurt on oral microbial and caries outcomes in 12-15 years old children: A double blind randomized controlled trial

Chavarot Mapaisansin^{*,**}, Rawee Teanpaisan^{***}, Pichanun Srisommai^{*,**}, Supatcharin Piwat^{*,**}

Abstract

This study aims to evaluate effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on salivary mutans streptococci and lactobacilli count, and dental caries in children. A double-blind randomized control trial was conducted. A total of 102 children, aged 12-15 years, were recruited, and randomly assigned to either the probiotic group receiving yogurt containing *L. rhamnosus* SD11 or control group receiving standard yogurt containing *L. bulgaricus*. One hundred milliliters of yogurt were provided once daily for 3 months. The salivary samples were collected at baseline (T0), 3 months (T3), 6 months (T6) and 9 months (T9) for counting the numbers of mutans streptococci and lactobacilli. Dental caries was examined at baseline and at the end of study (T9). At T3, mutans streptococci in probiotic group was significantly lower ($p < 0.05$) than the control group and a significant reduction ($p < 0.05$) were found when compare with T0. Simultaneously, the numbers of lactobacilli in probiotic group were significantly increased ($p < 0.01$) at T3 when compared with T0 and with control group. However, there were no significant differences between the groups at T6 and T9. The caries progression (transitional probability) was not significantly different between groups. No adverse event was found in both groups. In conclusion, the consumption of *L. rhamnosus* SD11 daily for 3 months is safe. The increasing of lactobacilli and reduction of cariogenic pathogen, mutans streptococci were found within 3 months of the study. However, the effect to prevent caries progression was not presented.

Keywords : probiotics, *Lactobacillus rhamnosus* SD11, mutans streptococci, dental caries, children

Received date 21 August 2023

Revised date 26 November 2023

Accepted date 19 December 2023

*Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110

**Common Oral Diseases and Epidemiology Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110

***Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110

Correspondence to Supatcharin Piwat email : supacharin@hotmail.com

doi : 10.14456/thdentphj.2024.4

บทนำ

โรคฟันผุเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสุขภาพช่องปากที่สามารถพบได้ในประชากรทุกเพศ ทุกวัย จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลกพบว่า เด็กช่วงวัยเรียนทั่วโลกมีฟันผุร้อยละ 60.0-90.0¹ จากข้อมูลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งที่ 8 ปี พ.ศ. 2560 จัดทำโดยสำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย พบว่าเด็กอายุ 12 ปี ที่เป็นโรคฟันผุในฟันแท้มีร้อยละ 52.0 มีค่าเฉลี่ย ผุถอน อุด (DMFT) 1.4 ซี่ต่อคน² โรคฟันผุมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัยร่วมกัน แบ่งออกเป็นปัจจัยก่อโรค (pathologic factors) และปัจจัยป้องกันโรค (protective factors) เมื่อเกิดการเสียสมดุลระหว่างปัจจัยก่อโรคกับปัจจัยป้องกันโรคทำให้เกิดการสลายแร่ธาตุมากกว่าการคืนกลับแร่ธาตุ เมื่อเกิดต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดเป็นรอยโรคทางคลินิกโดยแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการเกิดฟันผุ คือเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโคไค (mutans streptococci: MS) ซึ่งพบได้ในช่องปากบริเวณแผ่นคราบจุลินทรีย์และน้ำลาย ซึ่งเด็กที่มีฟันผุมักจะพบเชื้อมากกว่าจำนวนมากกว่าเด็กที่ปราศจากฟันผุ³ จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีแนวทางในการป้องกันฟันผุหลายวิธีแต่ความชุกของการเกิดฟันผุก็ยังคงสูงอยู่ จึงมีความพยายามศึกษาหาวิธีการใหม่ที่จะช่วยลดการเกิดฟันผุ โดยเน้นการควบคุมและลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรค ได้แก่ การใช้โพรไบโอติกซึ่งมีการพัฒนามากขึ้นในปัจจุบัน

โพรไบโอติก (probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับในปริมาณที่พอเหมาะทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์⁴ โดยมีแนวคิดในการนำแบคทีเรียที่มีประโยชน์มาช่วยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทำให้ลดจำนวนเชื้อก่อโรค และร่างกายสามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ดีขึ้น⁵ จากการศึกษาในปัจจุบันถึงประโยชน์ในการใช้โพรไบโอติกในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคทางระบบ

ทางเดินอาหาร โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น⁶ ต่อมาได้มีการศึกษาพัฒนาการนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในช่องปาก เช่น การป้องกันโรคฟันผุ โรคปริทันต์ ภาวะกลิ่นปาก และรักษาการติดเชื้อราในช่องปาก⁷ เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเป็นเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติก (lactic-acid bacteria) ที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic) หรือแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic gram positive bacilli) เช่น โบกิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*) แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส (*Lactobacillus rhamnosus*) แลคโตบาซิลลัส รูทีไร (*Lactobacillus reuteri*) เป็นต้น⁶⁻⁷ กลไกการทำงานของโพรไบโอติกในช่องปากมีทั้งทางตรงและทางอ้อมที่ช่วยให้สุขภาพช่องปากดีขึ้น ผลทางตรงคือ เชื้อโพรไบโอติกแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับผิวต่าง ๆ ส่งผลให้เชื้อก่อโรคมียึดเกาะในช่องปากได้น้อยลง เข้าจับกับเชื้อก่อโรคเพื่อลดฤทธิ์ในการก่อโรค และแย่งอาหารหรือปัจจัยต่าง ๆ ที่เชื้อก่อโรคใช้ในการเจริญเติบโต⁸ ส่วนผลทางอ้อมคือ การส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลุดออก และเหนี่ยวนำให้เกิดสิ่งแวดล้อมที่เป็นปกติในช่องปาก ช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะของร่างกายให้พร้อมสำหรับการต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเนื้อเยื่อในการป้องกันเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกาย⁹

โดยจากการศึกษาของ Piwat และคณะ ได้มีการจำแนกและคัดเลือกเชื้อจากในช่องปากที่มีความสามารถเป็นโพรไบโอติกได้คือ แลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี เอสดี 1 (*Lactobacillus paracasei* SD1) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของจุลินทรีย์ประจำถิ่นจากช่องปากเด็กที่ปราศจากฟันผุ¹⁰ ได้นำมาศึกษาในระยะสั้นและระยะยาวในอาสาสมัครวัยรุ่นสุขภาพดี ได้รับนมที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส พาราคาเซอี เอสดี 1 ระยะสั้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และระยะยาวเป็นเวลา 6 เดือน

พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้ และสามารถตรวจพบเชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเชอี เอสดี 1 ในช่องปากได้หลังจากหยุดดื่มนมไปถึง 3 เดือน¹¹⁻¹² ต่อมาได้มีการศึกษาเพื่อหาเชื้อโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติสามารถป้องกันโรคในช่องปากได้ เช่นเดียวกับแลคโตบาซิลลัส พาราคาเชอี เอสดี 1 คือ แลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 (*Lactobacillus rhamnosus* SD11) จากการศึกษาทางห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เป็นเชื้อที่ได้มาจากช่องปากเด็กที่ปราศจากฟันผุ สามารถยึดเกาะ (adhesion) กับเยื่อบุผิวในช่องปากได้ และเกาะกลุ่มระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (autoaggregation) และต่างชนิดกัน (coaggregation) ได้ดีกว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราคาเชอี¹³ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 (*Streptococcus mutans* ATCC 25175) ได้ดีกว่าเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹⁴

นอกจากนี้ แลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 เป็นโพรไบโอติกที่ได้รับการทดสอบแล้วว่าสามารถหมักนมให้เกิดเป็นโยเกิร์ตได้ดีและให้รสชาติที่ดี เป็นทางเลือกหนึ่งในการนำโพรไบโอติกไปบริโภค และมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ได้มีการศึกษาระยะสั้นในอาสาสมัครวัยรุ่นสุขภาพดี ได้รับโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 วันละครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มโพรไบโอติกมีจำนวนเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถตรวจพบเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 ในช่องปากได้ถึงร้อยละ 81.0 ของกลุ่มโพรไบโอติกที่ได้รับโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกเมื่อติดตามไปจนถึง 4 สัปดาห์¹⁵ อย่างไรก็ตาม การใช้ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุและติดตามการเกิดฟันผุอาจจำเป็นต้องมีการใช้โพรไบโอติกต่อเนื่องเป็นระยะยาวขึ้นและมีการติดตามที่นานขึ้น

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการต่อยอดจากการศึกษาก่อนหน้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของการใช้โพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 ในรูปแบบโยเกิร์ตเป็นเวลา 3 เดือน ต่อการปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคและเชื้อแลคโตบาซิลลัสในช่องปาก และต่อการเกิดฟันผุ รวมถึงประเมินผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น ในกลุ่มเด็กอายุ 12-15 ปี

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษานี้ได้ออกแบบการวิจัยเชิงทดลองแบบสุ่มและปกปิดสองทางเทียบกับกลุ่มควบคุม (double blinded randomized controlled trial study design) โดยกลุ่มศึกษาได้รับโยเกิร์ตที่เตรียมจากเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 กลุ่มควบคุมได้รับโยเกิร์ตที่เตรียมจากเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลการิส ซึ่ง เป็นเชื้อที่ใช้ผลิตโยเกิร์ตทั่วไปในท้องตลาด โดยศึกษาในเด็กอายุ 12-15 ปี ในอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา จำนวน 102 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 51 คน โดยสุ่มแบบแบ่งชั้น (stratified randomization) เพื่อให้กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมีค่ามิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคเริ่มต้นใกล้เคียงกัน โดยใช้ปริมาณมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่เวลาเริ่มต้นเป็นตัวกำหนด แบ่งกลุ่มเด็กเป็น 3 กลุ่ม คือ ปริมาณเชื้อต่ำ (น้อยกว่า $2 \log_{10}\text{CFU/ml}$); ปานกลาง ($2-4 \log_{10}\text{CFU/ml}$); สูง (มากกว่า $4 \log_{10}\text{CFU/ml}$) แล้วจึงสุ่ม (simple randomization) จากระหัสการเข้าร่วมวิจัยของเด็กในแต่ละกลุ่มระดับเชื้อ เข้ากลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม โดยใช้เลขสุ่มที่สร้างจากคอมพิวเตอร์ (computer generated random sequence)

เกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) ของอาสาสมัคร คือ เด็กอายุ 12-15 ปี ที่มีฟันแท้ขึ้น และไม่มีฟันน้ำนมแล้ว มีสุขภาพร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง มีฟันผุเป็นรู (ตาม The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) มากกว่าหรือเท่ากับระดับ 5) ไม่เกิน 3 ซี่ ผู้ปกครองและเด็กยินยอมเข้าร่วม

การศึกษา เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) คือ มีโรคทางระบบที่มีผลต่อภูมิคุ้มกัน มีประวัติแพ้แก้วและหรือน้ำตาลแลคโตส มีประวัติไข้ยาด้านจุลชีวก่อนเข้าร่วมโครงการเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ และมีประวัติรับประทานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก หรือโพลีทอลเป็นประจำ และกรณีที่อาสาสมัครหยุดการใช้โยเกิร์ตในการศึกษาเอง หรือไม่มาตรวจติดตามผลถือว่าเป็นเกณฑ์ให้อาสาสมัครออกจากการศึกษา (withdrawal criteria) เด็กและผู้ปกครองได้ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษานี้โดยการชี้แจงจากผู้วิจัยและได้รับเอกสารโครงการวิจัยในการประชุมผู้ปกครองของโรงเรียน ซึ่งเด็กและผู้ปกครองที่สนใจเข้าร่วมการศึกษาต้องลงนามในใบยินยอมเพื่อเข้าร่วมการศึกษา

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างใช้สูตรคำนวณขนาดตัวอย่างระหว่างค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน¹⁶ ดังนี้

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

โดย $\alpha = 0.05$ และ power ร้อยละ 80.0 ($\beta = 0.20$) ใช้ค่าความแตกต่างระหว่างปริมาณค่าเฉลี่ยของเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคโคในกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม ($\mu_1 - \mu_2$) เท่ากับ 0.9^{12} ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม (σ) เท่ากับ 1.4^{12} และเพิ่มกลุ่มตัวอย่างประมาณร้อยละ 25.0 เพื่อสำรองการลดลงของกลุ่มตัวอย่าง ได้กลุ่มตัวอย่างการศึกษา คือ 50 คน/กลุ่ม

การเตรียมโยเกิร์ตจัดทำโดยบริษัทแคร์โฮมจำกัด และทดสอบมาตรฐานโดยห้องปฏิบัติการจุลชีวกวทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ก่อนนำไปใช้ โดยควบคุมให้โยเกิร์ตกลุ่มศึกษามีปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 และโยเกิร์ตกลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส

บัลการิซิส อย่างน้อย 10^7 colony-forming unit ต่อ มิลลิลิตร (CFU/ml) โยเกิร์ตถูกเก็บไว้ในตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) ในระหว่างการศึกษา

ผู้ช่วยวิจัยเป็นผู้จัดเตรียมโยเกิร์ตให้อาสาสมัคร ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อวัน โดยได้รับทุกวัน วันละ 1 ครั้ง รวมระยะเวลาทั้งหมด 3 เดือน มีการตรวจสอบความร่วมมือในการรับประทานโยเกิร์ต และมีการติดตามผลหลังจากหยุดได้รับโยเกิร์ตเป็นเวลา 6 เดือน โดยอาสาสมัครและผู้ตรวจไม่ทราบชนิดของโยเกิร์ตที่อาสาสมัครได้รับ

เก็บรวบรวมข้อมูลโดยทำการตรวจฟันและเก็บตัวอย่างน้ำลาย ด้วยวิธีการบ้วนเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลาเริ่มต้น (T0) จากนั้นเมื่อได้รับโยเกิร์ตครบ 3 เดือน (T3) และที่ระยะติดตาม 3 เดือนหลังหยุดได้รับโยเกิร์ต (T6) ได้รับการเก็บตัวอย่างน้ำลายอีกครั้ง และที่ระยะติดตาม 6 เดือน (T9) ได้รับการตรวจฟันและเก็บตัวอย่างน้ำลาย มีการบันทึกความร่วมมือในการรับประทานโยเกิร์ตของอาสาสมัคร และติดตามอาการแพ้และผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นโดยครุณามัย ในแบบฟอร์มบันทึกประจำวันตลอดการศึกษา

การตรวจฟันทำโดยใช้กระจกส่องปาก และ probe WHO-621 ภายใตแสงจากโคมไฟ โดยใช้เกณฑ์การตรวจดัดแปลงมาจากเกณฑ์การตรวจและประเมินโรคฟันผุ ด้วยระบบ The International Caries Detection and Assessment System II (ICDAS II) ดังแสดงในตาราง 1 ทำการตรวจฟันโดยทันตแพทย์จำนวน 3 คน ได้รับการปรับมาตรฐานภายในผู้ตรวจซ้ำในบุคคลเดียวกัน (intra-examiner reliability) มีค่า kappa เท่ากับ 0.81-0.93 และทำการปรับมาตรฐานระหว่างผู้ตรวจเพื่อทดสอบความเที่ยงในการตรวจฟันระหว่างผู้ประเมิน (inter-examiner reliability) มีค่า kappa เท่ากับ 0.84-0.85

ตาราง 1 แสดงเกณฑ์การตรวจคัดแปลงมาจากเกณฑ์การตรวจและประเมินโรคฟันผุด้วยระบบ ICDAS II

Table 1 Caries examination criteria modified from The International Caries Detection and Assessment System II (ICDAS II)

ICDAS II score	ICDAS dental terms	ICDAS activity + (active) / - (inactive)	modified ICDAS II
0	sound		0
1	first visual change in enamel (when dry)		
2	distinct visual change in enamel	+	1
	distinct visual change in enamel	-	2
3	localized enamel breakdown	+	3
	localized enamel breakdown	-	4
4	underlying dentine shadow		5
5, 6	distinct cavity with visible dentine	+	6
	extensive cavity within visible describe	-	7

การตรวจหาจำนวนเชื้อในน้ำลาย ทำโดยนำน้ำลายมาทำการเจือจาง (serial dilution) และเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือก (selective media) เชื้อมีวแทนส์ สเตريبโตคอคโค โดย ใช้ ไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทรากิน อะการ์ (Mitis salivarius bacitracin agar) ในสภาวะที่มี 10% CO₂ และคัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลลัส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแมนโรโกซ่าชาร์ป (Man Rogosa Sharpe agar) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic, 80% N₂, 10% CO₂ และ 10% H₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อต่าง ๆ โดยมีหน่วยเป็น CFU/ml (colony-forming unit per milliliter)

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) เพื่อแสดงลักษณะประชากรปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตريبโตคอคโค เชื้อแลคโตบาซิลลัส และจำนวนฟันผุ ระหว่างกลุ่มศึกษาและกลุ่ม

ควบคุม ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตريبโตคอคโค และเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่เปลี่ยนแปลงไป ระหว่างกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 และกลุ่มควบคุม ที่เวลาเริ่มต้น เวลา 3 เดือน 6 เดือน และ 9 เดือน ใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางเมื่อมีการวัดซ้ำ (Two-way ANOVA with Repeated Measures) เมื่อพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้การเปรียบเทียบภายหลังการทดสอบ (Post hoc test) โดยวิธีของบอนเฟอร์โรนี (Bonferroni)

การวัดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะรอยโรคฟันผุ (transitional probability) ที่เวลาเริ่มต้น (T0) เทียบกับที่เวลา 9 เดือน แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ 1. สภาวะฟันผุคงที่ (stable) 2. มีการลุกลามของรอยโรคฟันผุ (progression) หมายถึงมีการดำเนินของรอยโรคที่มาก

ขึ้น 3. การคืนกลับของรอยโรคฟันผุ (regression) หมายถึงมีการดำเนินของรอยผุลดลง เช่น เปลี่ยนแปลงจากรอยผุแบบลุกลาม (active caries) ไปเป็นผุแบบไม่ลุกลาม (inactive caries) ดังนี้

$$\text{ความน่าจะเป็นของการเปลี่ยนแปลงสภาวะฟันผุ} = \frac{\text{จำนวนฟันที่เปลี่ยนแปลง} \times 100}{\text{จำนวนฟันของฟันที่ขึ้นในช่องปาก}}$$

กำหนดระดับนัยสำคัญของการทดสอบสมมติฐานที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EC5912-51-L-HR) วันที่ 3 มีนาคม 2560 และลงทะเบียนงานวิจัยแบบทดลองทางคลินิกของประเทศไทย (Thai Clinical Trials Registry, TCTR20170601002) วันที่ 31 พฤษภาคม 2560

ผล

จากเด็กจำนวน 229 คน ได้รับความยินยอม และผ่านเกณฑ์การคัดเข้าทั้งหมด 102 คน แบ่งเป็นกลุ่มศึกษา 51 คน และกลุ่มควบคุม 51 คน กลุ่มศึกษาได้รับโยเกิร์ตที่เตรียมจากเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมนอสส์ เอสดี 11 และกลุ่มควบคุมได้รับโยเกิร์ตที่เตรียมจากเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานของ

กลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม พบว่า เพศ อายุเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยของระดับปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และแลคโตบาซิลไลในน้ำลาย รวมทั้งค่าเฉลี่ยจำนวนฟันผุเป็นรูที่เวลาเริ่มต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตาราง 2) กลุ่มตัวอย่างเป็นเพศชาย 43 คน เพศหญิง 59 คน ช่วงอายุ 12-15 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย 13.3 ± 1.04 ปี มีฟันที่ผุเป็นรูเฉลี่ย 1.7 ± 2.03 ด้าน มีระดับปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และแลคโตบาซิลไลในน้ำลายเฉลี่ย 3.1 ± 1.91 และ $7.1 \pm 0.70 \log_{10}\text{CFU/ml}$ ตามลำดับ และหลังจากสิ้นสุดระยะเวลาศึกษา 9 เดือน พบว่ามีอาสาสมัครจำนวน 12 คน (ร้อยละ 11.8) ที่ไม่สามารถเข้าร่วมการศึกษาได้ครบตามกำหนด เนื่องจากมีเด็กบางส่วนย้ายออกจากโรงเรียน เด็กขาดเรียนในวันที่เก็บน้ำลายและหรือตรวจฟัน เป็นต้น โดยอยู่ในกลุ่มโพรไบโอติก 3 คน (ร้อยละ 5.9) และกลุ่มควบคุม 9 คน (ร้อยละ 17.7) และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างที่ยังคงอยู่จนสิ้นสุดการศึกษา พบว่าทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม มี เพศ อายุเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยของระดับปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และแลคโตบาซิลไลในน้ำลาย รวมทั้งค่าเฉลี่ยจำนวนฟันผุเป็นรูที่เวลาเริ่มต้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตาราง 2 โดยรายละเอียดการเข้าร่วมงานวิจัยในระยะต่าง ๆ แต่ละกลุ่มการศึกษา (consort diagram) แสดงในภาพ 1

ตาราง 2 แสดงข้อมูลพื้นฐาน (demographic data) แบ่งตามกลุ่มศึกษาที่เวลาเริ่มต้น (T0)

Table 2 General characteristics between control and probiotic group at baseline (T0)

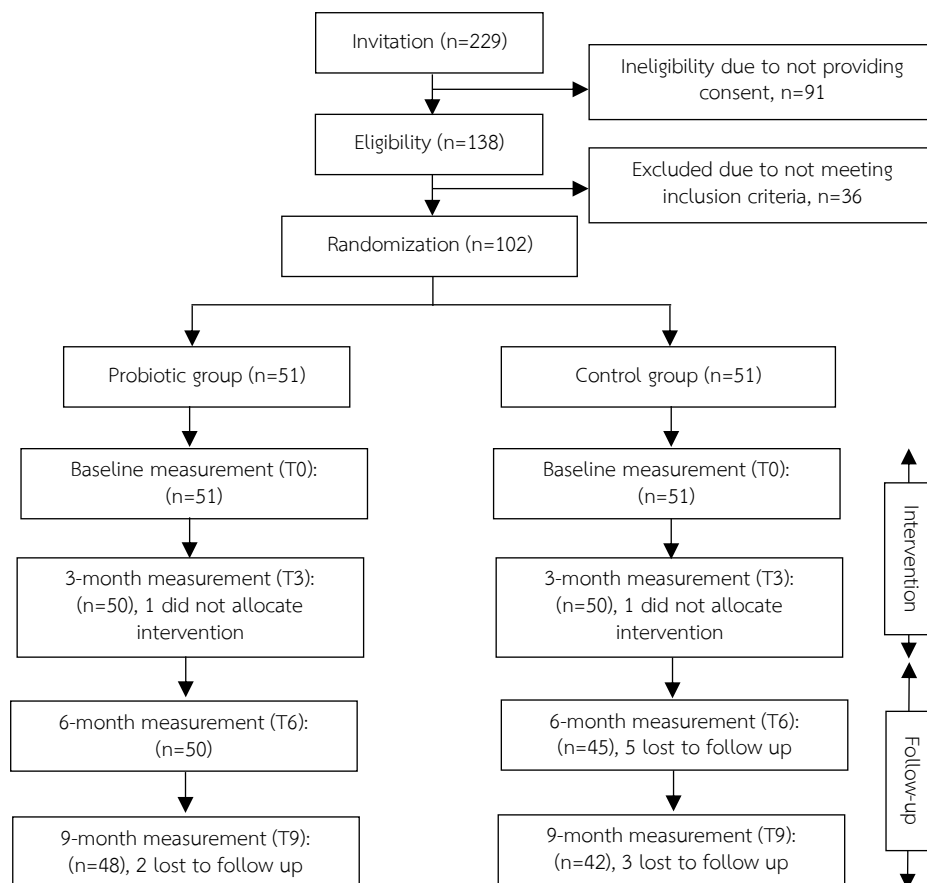
	N = 102			N = 90 (exclude withdrawal cases)		
	probiotic (n = 51)	control (n = 51)	p-value	probiotic (n = 48)	control (n = 42)	p-value
gender^a n (%)						
- male	23 (45.1)	20 (39.2)	0.55	22 (45.8)	12 (28.6)	0.09
- female	28 (54.9)	31 (60.8)		26 (54.2)	30 (71.4)	
age^b (years $\pm$ SD)	13.4 $\pm$ 1.04	13.2 $\pm$ 1.05	0.39	13.4 $\pm$ 1.04	13.2 $\pm$ 1.10	0.36
bacteria at T0^c (mean log ₁₀ CFU/ml $\pm$ SD)						
- Mutans streptococci	3.2 $\pm$ 1.87	3.0 $\pm$ 1.96	0.69	3.1 $\pm$ 1.90	2.7 $\pm$ 2.02	0.38
- Lactobacilli	7.0 $\pm$ 0.60	7.1 $\pm$ 0.80	0.61	7.0 $\pm$ 0.56	7.1 $\pm$ 0.76	0.87
cavitated caries^c (mean $\pm$ SD)						
- surfaces	1.6 $\pm$ 2.15	1.7 $\pm$ 1.93	0.38	1.4 $\pm$ 2.04	1.8 $\pm$ 2.06	0.26
- teeth	1.0 $\pm$ 1.57	1.3 $\pm$ 1.48	0.22	0.9 $\pm$ 1.44	1.3 $\pm$ 1.56	0.24

the significant differences were tested using ^aChi-square test, ^bIndependent sample t-test and ^cMann-Whitney U test.

p<0.05: Significance

ภาพ 1 แผนภาพ CONSORT

Figure 1 CONSORT Flow Diagram



เมื่อเปรียบเทียบระดับของเชื้อมิวแทนส์ สเตริบโทคอคไค ระหว่างกลุ่มที่ได้รับโฟรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซิส เอสดี 11 และกลุ่มควบคุม ที่เวลาเริ่มต้น เวลา 3 เดือน 6 เดือน และ 9 เดือน โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางเมื่อมีการวัดซ้ำ (ตาราง 3) พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปรเรื่องเวลา และตัวแปรเรื่องกลุ่ม (Time Group Interaction) ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีขนาดอิทธิพล (effect size) อยู่ในระดับปานกลาง ($F=7.67$, $p<0.01$, $\eta^2=0.08$) ด้วยเหตุนี้จึงวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มในแต่ละช่วงเวลา โดยการใช้การเปรียบเทียบภายหลังการทดสอบ โดยควบคุมความผิดพลาดทั้งกลุ่มด้วยวิธีของบอนเฟอร์โรนีพบว่า ก่อนได้รับโยเกิร์ตกลุ่มโฟรไบโอติกและกลุ่มควบคุมมีระดับเชื้อมิวแทนส์ สเตริบโทคอคไคในน้ำลาย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกลุ่มโฟรไบโอติกและกลุ่มควบคุมได้รับโยเกิร์ตเป็นเวลา 3 เดือน พบว่ากลุ่มโฟรไบโอติกมีปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตริบโทคอคไคน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่เวลา 3 เดือน อย่างไรก็ตามในระยะติดตามผลที่เวลา 6 เดือน และ 9 เดือน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตริบโทคอคไคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม

เมื่อเปรียบเทียบระดับของเชื้อแลคโตบาซิลลัส ระหว่างกลุ่มโฟรไบโอติกและกลุ่มควบคุม ที่เวลาต่าง ๆ (ตาราง 3) พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มและเวลาถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยมีขนาดอิทธิพล (effect size) อยู่ในระดับปานกลาง ($F=7.56$, $p<0.01$, $\eta^2=0.08$) กลุ่มโฟรไบโอติกมีปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส

มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 3 เดือน ($p<0.01$) และไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อระหว่าง 2 กลุ่ม ที่เวลา 6 เดือน และ 9 เดือน

จากการตรวจฟัน ที่เวลาเริ่มต้น (T0) พบว่ากลุ่มโฟรไบโอติกมีด้านฟันส่วนใหญ่ร้อยละ 88.7 เป็นผิวฟันปกติ (sound tooth) โดยมีฟันผุในระยะเริ่มต้น (non-cavitated caries) ร้อยละ 3.5 และมีฟันผุเป็นรู (cavitated caries) ร้อยละ 1.2 ของด้านฟันทั้งหมด ส่วนกลุ่มควบคุมพบว่าส่วนใหญ่ร้อยละ 89.1 ของด้านฟันทั้งหมดเป็นผิวฟันปกติ มีฟันผุในระยะเริ่มต้นร้อยละ 4.4 ของด้านฟันทั้งหมด และมีฟันผุเป็นรูร้อยละ 1.3 ของด้านฟันทั้งหมด

ความน่าจะเป็นของการเปลี่ยนแปลงสถานะฟันผุ (transitional probability) จากเวลาเริ่มต้น (T0) ถึงที่เวลา 9 เดือน (T9) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโฟรไบโอติกและกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.46$) (ตาราง 4) โดยพบว่าด้านฟันส่วนใหญ่มีการคงที่ของสถานะฟันผุ (stable) ทั้ง 2 กลุ่ม (ร้อยละ 97.1 ในกลุ่มโฟรไบโอติกและร้อยละ 97.4 ในกลุ่มควบคุม) พบความน่าจะเป็นของการลุกลามของรอยโรคฟันผุ (progression) ในกลุ่มโฟรไบโอติกร้อยละ 0.8 กลุ่มควบคุมร้อยละ 0.9 รูปแบบการลุกลามส่วนใหญ่คือการเปลี่ยนแปลงจากผิวฟันปกติเปลี่ยนไปเป็นฟันผุระยะเริ่มต้น และพบการคืนกลับของรอยโรคฟันผุ (regression) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม (ร้อยละ 0.2 ในกลุ่มโฟรไบโอติกและร้อยละ 0.1 ในกลุ่มควบคุม) และตลอดการศึกษาไม่พบอาสาสมัครที่มีอาการข้างเคียงจากการรับประทานโยเกิร์ตทั้งกลุ่มโฟรไบโอติกและกลุ่มควบคุม

ตาราง 3 ปริมาณมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค และแลคโตบาซิลไลในน้ำลาย ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมที่เวลาเริ่มต้น 3 เดือน 6 เดือน และ 9 เดือน ทดสอบด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางเมื่อมีการวัดซ้ำ

Table 3 Salivary mutans streptococci and lactobacilli count (log₁₀CFU/ml) between probiotic group and control group at baseline, 3, 6 and 9 months of study, analyzed with a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measure

	probiotic (n=48)	control (n=42)		ANOVA		
	median (95% CI)	median (95% CI)	<i>P</i>	variable & effect	F	<i>ES</i> (η^2)
Mutans streptococci						
(log ₁₀ CFU/ml)						
T0	3.78 (3.54, 4.18)	3.70 (3.30, 4.04)	0.35	G	1.27	0.01
T3	1.35 (0, 3.48)	3.81 (3.30, 4.18)	0.02*	T	5.17*	0.06
T6	3.00 (0, 3.70)	3.85 (3.18, 4.16)	0.05	T x G	7.67**	0.08
T9	3.18 (2.30, 4.00)	3.81 (3.18, 4.19)	0.62			
Lactobacilli						
(log ₁₀ CFU/ml)						
T0	6.81 (6.70, 7.06)	7.00 (6.78, 7.18)	0.62	G	1.99	0.02
T3	7.37 (7.16, 7.60)	7.00 (6.74, 7.16)	<0.01**	T	3.58*	0.04
T6	6.98 (6.78, 7.20)	6.93 (6.78, 7.06)	0.23	T x G	7.56**	0.08
T9	6.90 (6.70, 7.16)	6.95 (6.78, 7.02)	0.98			

Main Effects: Time (T): T0, T3, T6, T9 (within-subjects factor), Group (G): Probiotic/Control (between-subjects factor), Interaction: Time x Group (TxG)

ES, Effect size (η^2), interaction of Time x Group; η^2 = 0.01 (small), η^2 = 0.06 (medium), η^2 = 0.14 (large)

Post-hoc comparison (P) with Bonferroni correction: Probiotic compared to control group within particular time

* p<0.05, ** p<0.01: Significance

ตาราง 4 ความน่าจะเป็นของการเปลี่ยนแปลงสถานะฟันผุของด้านฟัน ที่เปลี่ยนแปลงจากเวลาเริ่มต้น (T0) ถึงที่เวลา 9 เดือน (T9) ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุม

Table 4 Caries status transitional probability (%) of tooth surfaces from baseline to 9 months follow up period between probiotic group and control group

transitional status	probiotic (N persons=48)		control (N persons=42)	
	surface (n=5,996)	transitional probability (%)	surface (n=5,487)	transitional probability (%)
progress	47	0.8	48	0.9
stable	5,820	97.1	5,344	97.4
regress	10	0.2	5	0.1

The significant differences were tested using chi-square test (p=0.46)

p<0.05: Significance

วิจารณ์

จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและวิเคราะห์อภิธานที่ผ่านมาของ Shi และคณะ ใน ค.ศ. 2022¹⁷ ถึงผลของโพรไบโอติกต่อโรคฟันผุในเด็ก ผลการศึกษาบ่งชี้อย่างชัดเจนว่าโพรไบโอติกสามารถลดจำนวนเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคในน้ำลายและคราบจุลินทรีย์ และสามารถควบคุมการเกิดฟันผุได้ โดยโพรไบโอติกส่วนใหญ่ที่ใช้คือเชื้อกลุ่มแลคโตบาซิลลัส และไบฟิโดแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกก็มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อและสายพันธุ์ที่นำมาใช้¹⁸

แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่มีการนำมาเป็นโพรไบโอติกเพื่อลดเชื้อก่อโรคฟันผุ และลดการเกิดฟันผุในเด็ก การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการนำแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี หรืออีกชื่อหนึ่งคือ เอสพี1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์โพรไบโอติกที่มีที่มาจากช่องท้องและถูกนำไปใช้ในการค้า พบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกันไป หลายการศึกษาพบว่าการใช้แลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส จีจี ในเด็กสามารถลดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคในน้ำลาย¹⁹⁻²⁰ สามารถลดอัตราการเกิดฟันผุ^{19,21-22} เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเริ่มต้น อย่างไรก็ตามในบางการศึกษาให้ผลที่ต่างออกไปคือไม่พบนัยสำคัญทางสถิติในการลดเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค หรือการลดฟันผุ²³⁻²⁴

การนำแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 มาเป็นโพรไบโอติก ในการศึกษาก่อนหน้านี้¹⁵ ทำการศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครอายุ 21-23 ปี ในระยะสั้น 4 สัปดาห์ เป็นการศึกษาในมนุษย์เป็นครั้งแรก จากขั้นตอนของการวิจัยทางคลินิกการประเมินโพรไบโอติกเพื่อใช้เป็นอาหารของ FAO/WHO²⁵ จัดว่าเป็นการศึกษาเชื้อโพรไบโอติกในระยะที่ 1 พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค และปลอดภัยในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี นำมาสู่การศึกษานี้เป็นการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิผลต่อการเกิดโรคฟันผุ และผลข้างเคียงในกลุ่มเด็กโต โดยใช้โยเกิร์ตแลคโตบาซิลลัส

แรมโนซัส เอสดี 11 ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีการลดลงของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคในน้ำลาย ต่ำกว่าก่อนการทดลองและต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษาในกลุ่มควบคุมได้รับโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส ไม่พบการลดลงของปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Petti²⁶ รายงานว่าโยเกิร์ตที่ประกอบด้วยแลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส มีประสิทธิผลในการลดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาของเชื้อโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ที่มีผลต่อการลดเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค อาจเนื่องมาจากกลไกการทำงานของโพรไบโอติกที่สามารถแข่งขันในการแย่งพื้นที่และอาหารในการดำรงอยู่ในร่างกายทำให้แบคทีเรียก่อโรคมียุทธศาสตร์อยู่รอดน้อยลง และสามารถสร้างสารแบคทีริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่องปากได้²⁷ สามารถยึดติดกับเนื้อเยื่อช่องปากและมีความสามารถในการเกาะกลุ่มระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้สูง¹³ และอีกคุณสมบัติหนึ่งที่จำเป็นสำหรับการเป็นโพรไบโอติกคือมีความสามารถในการอยู่รอดและเติบโตได้ภายใต้สภาวะในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ในกรณีนี้ก็คือภายในช่องปากซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะ เช่น ความเป็นกรดต่าง การมีเอนไซม์ หรือมีสารประกอบต่าง ๆ²⁸ เพื่อให้สายพันธุ์โพรไบโอติกสามารถคงอยู่และส่งผลต่อโฮสต์ได้ในระยะยาว

ในการศึกษานี้พบการลดลงของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคเฉพาะที่เวลา 3 เดือนขณะที่ได้รับโพรไบโอติก และเมื่อติดตามหลังหยุดรับประทานที่ระยะเวลา 6 เดือน และ 9 เดือน พบว่าระดับเชื้อกลับขึ้นไปใกล้เคียงกับก่อนการทดลอง และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากการศึกษาของ Rungsri และคณะในปี 2017¹⁵ ซึ่งศึกษาระยะสั้นในอาสาสมัครอายุ 21-23 ปี ที่มีสุขภาพดี พบว่าเมื่อได้รับโยเกิร์ตโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 วันละครั้งเป็นเวลา 4

สัปดาห์ สามารถลดจำนวนเชื้อมีวแทนส์ สเตรีปโตคอคไคในน้ำลายลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งที่เวลา 4 สัปดาห์ และหลังหยุดรับประทานเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทั้ง 2 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรโมนัส เอสดี 11 สามารถลดปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตรีปโตคอคไคได้ในขณะที่ได้รับโพรไบโอติกนี้ อย่างไรก็ตามเมื่อหยุดรับประทานประสิทธิผลในการลดเชื้อนั้นจะลดลงตามระยะเวลา อาจเป็นเพราะเชื้อโพรไบโอติกนี้สามารถคงอยู่ในช่องปากได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นหลังหยุดรับประทาน แต่ไม่ได้คงอยู่อย่างถาวร ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจแลคโตบาซิลลัสในน้ำลายในการศึกษานี้ที่พบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในกลุ่มโพรไบโอติกและเพิ่มมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 3 เดือน และพบว่าปริมาณเชื้อลดลงจนไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อระหว่าง 2 กลุ่ม ที่เวลา 3 เดือนและ 6 เดือน หลังจากหยุดรับประทาน แม้ว่าจากการศึกษาระยะสั้น¹⁵ สามารถตรวจพบเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรโมนัส เอสดี 11 ในช่องปากได้ถึงร้อยละ 81.0 หลังหยุดรับประทานโพรไบโอติกนี้ไป 4 สัปดาห์ แต่โพรไบโอติกสายพันธุ์นี้อาจไม่สามารถตั้งถิ่นฐานอย่างถาวรได้ในระยะยาว เช่นเดียวกับที่พบในโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นในอีกหลาย ๆ การศึกษา^{26,29-30} ซึ่งจนถึงปัจจุบันยังไม่พบโพรไบโอติกที่สามารถคงอยู่ ตั้งถิ่นฐาน (colonization) ช่องปากอย่างถาวร³¹ ดังนั้นเมื่อเด็กหยุดใช้จะไม่ส่งต่อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคที่เสถียรต่อไป ซึ่งจำเป็นต้องจัดหาโพรไบโอติก ในระยะยาว

การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างการเปลี่ยนแปลงของฟันผุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มอาสาสมัครอายุ 12-15 ปี เมื่อติดตามผลหลังหยุดการได้รับโพรไบโอติกไป 6 เดือน อาจเกิดเนื่องจาก อัตราการเปลี่ยนแปลงของการเกิดฟันผุค่อนข้างต่ำคือ ในช่วง 9 เดือนของการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงทั้งการลุกลามและการคืนกลับของรอยโรคฟันผุ ไม่ถึงร้อยละ 1.0 ในทั้ง 2 กลุ่ม และระยะเวลาการให้โพรไบโอติกและระยะเวลาในการ

ติดตามอาจสั้นเกินไปสำหรับการวัดผลการผุของฟัน โดยเฉพาะในชุดฟันถาวร การเลือกอาสาสมัครเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ควรพิจารณาในการดำเนินการวิจัยในลักษณะนี้ เนื่องจากการใช้โพรไบโอติกเป็นไปในการป้องกันฟันผุ หรือหยุดฟันผุในระยะเริ่มแรก³² อาจมีข้อจำกัดในกรณีมีฟันผุที่มีการลุกลามจนเป็นรู (cavitated caries) จำนวนมาก อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกในเด็กมีรายงานการให้ผลดีในผู้ที่มีความเสี่ยงในการเกิดฟันผุสูง¹² เช่นกลุ่มที่มีเชื้อก่อโรคฟันผุสูง จึงอาจใช้เกณฑ์นี้เป็นหนึ่งในเกณฑ์คัดเลือกอาสาสมัครได้

ปัญหาหนึ่งที่เกิดในการศึกษานี้ คือการมีอาสาสมัครไม่มาติดตามผลจนครบตามกำหนด (loss to follow up) โดยการศึกษาพบร้อยละ 5.9 (3 คนจาก 51 คน) ในกลุ่มโพรไบโอติก และร้อยละ 17.6 (9 คนจาก 51 คน) ในกลุ่มควบคุม เหตุผลส่วนใหญ่คือเด็กขาดเรียนในวันที่เก็บน้ำลายและหรือตรวจฟัน ส่งผลให้ข้อมูลจากการวิจัยได้มาไม่สมบูรณ์ พบว่าอาสาสมัครที่หายไปส่วนใหญ่เป็นเด็กชาย แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ยังคงอยู่ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมพบว่าทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามขนาดตัวอย่างลดลง ส่งผลกระทบให้ผลที่ได้มีอำนาจการทดสอบน้อยลง มีการกล่าวถึงผลจากการสูญหายของอาสาสมัครจากการติดตาม โดยการสูญเสียน้อยกว่าร้อยละ 5 ทำให้เกิดอคติเล็กน้อย ในขณะที่มากกว่าร้อยละ 20 อาจก่อให้เกิดผลเสียร้ายแรงต่อความถูกต้อง อย่างไรก็ตามการสูญเสียการติดตามผลน้อยกว่าร้อยละ 20 ก็อาจเป็นปัญหาได้³³ การนำผลการศึกษาไปใช้จึงควรคำนึงถึงข้อจำกัดข้อนี้ด้วย

การศึกษานี้มีข้อดีคือการใช้เกณฑ์การตรวจดัดแปลงมาจาก ICDAS II ซึ่งสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของรอยโรคฟันผุตั้งแต่ผิวฟันปกติ รอยผุระยะเริ่มที่ไม่มีรอยแตกของผิวเคลือบฟัน ไปจนถึงฟันผุจนเป็นรู และยังเป็นเกณฑ์ตรวจที่สามารถตรวจรอยโรคฟันผุที่ผุแบบลุกลาม และที่ไม่ลุกลาม ทำให้สามารถพบการเปลี่ยนแปลงชนิดที่มีการคืนกลับของรอยโรคฟันผุได้

การศึกษานี้พบมีการคืนกลับของรอยโรคฟันผุในกลุ่มโพโรไบโอติกมากกว่ากลุ่มควบคุม แม้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มในลักษณะเดียวกับการศึกษาการใช้โพโรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส พาราคาเชอี เอสดี 1 ในเด็กก่อนวัยเรียนเพื่อป้องกันฟันผุ³⁴ โดยส่วนใหญ่เป็นการคืนกลับของรอยผุในชั้นเคลือบฟัน ซึ่งการคืนกลับของรอยโรคฟันผุอาจมีปัจจัยหนึ่งมาจากการควบคุมและลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคของโพโรไบโอติกที่ได้รับ⁸ อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการเกิดฟันผุ เช่น อาหาร พฤติกรรมการกิน การทำความสะอาด โดยเฉพาะจากการได้รับฟลูออไรด์ทั้งจากยาสีฟัน และจากที่ได้รับจากทันตบุคลากร จึงควรมีการควบคุมปัจจัยเหล่านี้ อาจโดยการกำหนดยาสีฟันที่ใช้ หรือบันทึกและนำข้อมูลของปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องมาร่วมในการวิเคราะห์ผล

โพโรไบโอติกที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่ในร่างกายของมนุษย์อยู่แล้ว ก่อนนำมาใช้ได้มีการทดสอบความปลอดภัยก่อนนำมาใช้กับมนุษย์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบผลข้างเคียงจากการใช้โพโรไบโอติกได้ แต่พบน้อยมาก ซึ่งการติดเชื้ออาจเกิดได้ในผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวที่ส่งผลให้ภูมิคุ้มกันต่ำ³⁵ ส่วนคนที่มีสุขภาพแข็งแรงก็ยังไม่มียารายงานถึงผลข้างเคียง จากการศึกษา³⁶ ไม่พบผลข้างเคียงและภาวะแทรกซ้อนจากการใช้โพโรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ตลอดระยะเวลาดำเนินการศึกษา แสดงถึงโพโรไบโอติกสายพันธุ์นี้ มีความปลอดภัยสำหรับการใช้ในกลุ่มเด็กอายุ 12-15 ปี

สรุป

การได้รับโพรไบโอติกที่มีเชื้อโพโรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ติดต่อกันทุกวันเป็นระยะเวลา 3 เดือนในกลุ่มอาสาสมัครอายุ 12-15 ปี มีความปลอดภัย พบการเพิ่มจำนวนเชื้อแลคโตบาซิลโล มีการลดลงของปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตรีปโตคอคโค ใน 3 เดือนของการใช้ อย่างไรก็ตามไม่พบผลต่อการป้องกันการลุกลามของฟันผุ

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะเชิงวิชาการ

ในการศึกษาครั้งต่อไปของเชื้อโพโรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส เอสดี 11 ควรเพิ่มระยะเวลาการให้โพโรไบโอติกและเพิ่มระยะเวลาในการติดตามนานขึ้น เพื่อสามารถเห็นผลการเปลี่ยนแปลงสภาวะฟันผุในฟันแท้ได้ชัดเจนมากขึ้น และควรมีการศึกษาว่าถ้าจำเป็นต้องได้รับโพโรไบโอติกต่อเนื่อง ความถี่ของการได้รับที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถคงประสิทธิผลการป้องกันฟันผุไว้ได้ควรเป็นเท่าไร

ข้อเสนอแนะเชิงปฏิบัติการ

การเตรียมโพโรไบโอติกมีได้ในหลายรูปแบบผลิตภัณฑ์ ในการศึกษา³⁷นี้เลือกใช้การเตรียมโพโรไบโอติกในรูปแบบโยเกิร์ตพร้อมดื่ม ซึ่งพบว่าเป็นที่ยอมรับง่ายสำหรับเด็กในประเทศไทยมากกว่าแบบเป็นครีมข้น และเตรียมได้ง่ายกว่าแบบนมผงโพโรไบโอติก อย่างไรก็ตามรูปแบบนี้จำเป็นต้องมีระบบการจัดส่งและจัดเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสม ดังนั้นนอกจากการศึกษาประสิทธิผลของโพโรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ แล้ว จึงควรมีการศึกษาทั้งในเรื่องต้นทุน และการบริหารจัดการความยากง่ายในการใช้ร่วมด้วย

ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย

การใช้โพโรไบโอติกในการป้องกันฟันผุและควบคุมเชื้อก่อโรคฟันผุในช่องปาก เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ และเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อสุขภาพสำหรับการป้องกันโรคฟันผุในเด็กนักเรียน ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขอบเขตบริการสุขภาพช่องปากของเด็กในประเทศไทย อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในการหาต้นแบบของผลิตภัณฑ์โพโรไบโอติกที่เหมาะสมร่วมกับแนวทางการใช้ที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ และสามารถนำไปใช้ได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนวิจัยเพื่อการศึกษาหลังปริญญาคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และขอขอบพระคุณ อาสาสมัครนักเรียนและคุณครูโรงเรียนจะนะชนูปถัมภ์ อ.จะนะ จ.สงขลา ที่ให้ความร่วมมือในการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Petersen PE, Ogawa H. Prevention of dental caries through the use of fluoride- the WHO approach. Community Dent Health 2016; 33(2): 66-8.
2. Bureau of Dental Health. The 8th national oral health survey 2017 of Thailand. Bangkok: Samcharoen-panit Co.; 2018. (in Thai)
3. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. Microbiol Spectr 2019; 7(1): 1-26. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
4. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006.
5. Twetman S, Stecksén-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. Int J Paediatr Dent 2008; 18(1): 3-10. doi:10.1111/j.1365-263X.2007.00885.x.
6. Pramanik S, Venkatraman S, Karthik P, Vaidyanathan VK. A systematic review on selection characterization and implementation of probiotics in human health. Food Sci Biotechnol 2023; 32(4): 423-40. doi:10.1007/s10068-022-01210-z.
7. Homayouni Rad A, Pourjafar H, Mirzakhani E. A comprehensive review of the application of probiotics and postbiotics in oral health. Front Cell Infect Microbiol 2023; 13: 1-19. doi:10.3389/fcimb.2023.1120995.
8. Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. A review of the role of probiotic supplementation in dental caries. Probiotics Antimicrob Proteins 2020; 12(4): 1300-9. doi:10.1007/s12602-020-09652-9.
9. Bermudez- Brito M, Plaza- Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez- Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. Ann Nutr Metab 2012; 61(2): 160-74. doi:10.1159/000342079.
10. Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmontree A, Dahlén G. *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. Mol Oral Microbiol 2010; 25(2): 157-64. doi:10.1111/j.2041-1014.2009.00556.x.
11. Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus paracasei* SD1, a novel probiotic, reduces mutans streptococci in human volunteers: A randomized placebo-controlled trial. Clin Oral Investig 2014; 18(3): 857-62. doi:10.1007/s00784-013-1057-5.

12. Teanpaisan R, Piwat S, Tianviwat S, Sophatha B, Kampoo T. Effect of long-term consumption of *Lactobacillus paracasei* SD1 on reducing mutans streptococci and caries risk: a randomized placebo-controlled trial. *Dent J* 2015; 3(2): 43-54. doi:10.3390/dj3020043.
13. Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. *Lett Appl Microbiol* 2015; 61(1): 98-105. doi:10.1111/lam.12434.
14. Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol* 2011; 53(4): 452-9. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x.
15. Rungsri P, Akkarachaneeyakorn N, Wongsuwanlert M, Piwat S, Nantarakchaikul P, Teanpaisan R. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: a randomized clinical trial. *J Dairy Sci* 2017; 100(10): 7780-7. doi:10.3168/jds.2017-12961.
16. Kadam P, Bhalerao S. Sample size calculation. *Int J Ayurveda Res* 2010; 1(1): 55-7. doi:10.4103/0974-7788.59946.
17. Shi J, Wang Q, Ruan G, Chen Y, Zhao M, Shi D, et al. Efficacy of probiotics against dental caries in children: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022; 1: 1-18. doi:10.1080/10408398.2022.2077693.
18. McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Front Med* 2018; 5: 1-14. doi:10.3389/fmed.2018.00124.
19. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 2001; 35(6): 412-20. doi:10.1159/000047484.
20. Glavina D, Gorseta K, Skrinjarić I, Vranić DN, Mehulić K, Kozul K. Effect of LGG yoghurt on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in children. *Coll Antropol* 2012; 36(1): 129-32.
21. Rodríguez G, Ruiz B, Faleiros S, Vistoso A, Marró ML, Sánchez J, et al. Probiotic compared with standard milk for high-caries children: a cluster randomized trial. *J Dent Res* 2016; 95(4): 402-7. doi:10.1177/0022034515623935.
22. Sandoval F, Faleiros S, Cabello R, Díaz-Dosque M, Rodríguez G, Escobar A. The consumption of milk supplemented with probiotics decreases the occurrence of caries and the salivary concentration of hβD-3 in children. *Clin Oral Investig* 2021; 25(6): 3823-30. doi:10.1007/s00784-020-03712-8.
23. Angarita-Díaz MP, Forero-Escobar D, Cerón-Bastidas XA, Cisneros-Hidalgo CA, Dávila-Narvaez F, Bedoya-Correa CM, et al. Effects of a functional food supplemented with probiotics on biological factors related to dental caries in children: a pilot study. *Eur Arch Paediatr Dent* 2020; 21(1): 161-9. doi:10.1007/s40368-019-00468-y.

24. Villavicencio J, Villegas LM, Arango MC, Arias S, Triana F. Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial. J Appl Oral Sci Rev 2018; 26: 1-9. doi:10.1590/1678-7757-2017-0318.
25. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [online] 1 May 2002 [cited 2019 Jun 19] ; Available form: URL: <http://fanus.com.ar/posgrado/10-09-25/fao%20probiotics.pdf>
26. Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. Arch Oral Biol 2001; 46(8): 705-12. doi: 10.1016/s0003-9969(01)00033-4.
27. Wannun P, Piwat S, Teanpaisan R. Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. Appl Biochem Biotechnol 2016; 179(4): 572-82. doi:10.1007/s12010-016-2014-y.
28. Saetang P, Teanpaisan R, Piwat S. In vitro the impact of surface components and environmental factors on the adhesion and aggregation ability of oral *Lactobacillus fermentum*. J Dent Assoc Thai 2021; 71(3): 176-83. doi:10.14456/jdat.2021.19.
29. Caglar E, Topcuoglu N, Cildir SK, Sandalli N, Kulekci G. Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. Int J Paediatr Dent 2009; 19(5): 377-81. doi: 10.1111/j.1365-263X.2009.00989.x.
30. Ravn I, Dige I, Meyer RL, Nyvad B. Colonization of the oral cavity by probiotic bacteria. Caries Res 2012; 46(2): 107-12. doi:10.1159/000336960.
31. Janczarek M, Bachanek T, Mazur E, Chałas R. The role of probiotics in prevention of oral diseases. Postepy Hig Med Dosw 2016; 70: 850-7. doi:10.5604/17322693.1214381.
32. Piwat S, Teanpaisan R, Manmontri C, Wattanarat O, Pahumunto N, Makeudom A, et al. Efficacy of probiotic milk for caries regression in preschool children: a multicenter randomized controlled trial. Caries Res 2020; 54(5-6): 491-501. doi:10.1159/000509926.
33. Dettori JR. Loss to follow-up. Evid Based Spine Care J 2011; 2(1): 7-10. doi:10.1055/s-0030-1267080.
34. Pahumunto N, Piwat S, Chankanka O, Akkarachaneeyakorn N, Rangsitsathian K, Teanpaisan R. Reducing mutans streptococci and caries development by *Lactobacillus paracasei* SD1 in preschool children: a randomized placebo-controlled trial. Acta Odontol Scand 2018; 76(5): 331-7. doi:10.1080/00016357.2018.1453083.
35. Liong MT. Safety of probiotics: translocation and infection. Nutr Rev 2008; 66(4): 192-202. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00024.x.