ข้อเสนอแนวความคิดวิธีการเพื่อพัฒนางาน หรือปรับปรุงงานให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เรื่อง ปฏิบัติการชีววิทยาช่องปากและวิทยาการโรคฟันผุ

นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ

(ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ)

คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงานของ นางเพาพงา โกกิลกนิษฐ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จัดทำขึ้นเพื่อให้มีความครอบคลุมภาระงานในส่วนที่รับผิดชอบ ทันสมัย และเหมาะสมกับความเปลี่ยนแปลงของขอบข่ายงานที่ได้รับมอบหมาย

การปรับปรุงหลักๆ ได้แก่ การปรับภาระงานที่เพิ่มขึ้นตามประสบการณ์ทำงาน การปรับขั้นตอนที่การปฏิบัติงานให้เป็นปัจจุบันตามความเปลี่ยนแปลงของประกาศ ข้อกำหนดของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เช่น การจัดทำคู่มือปฏิบัติการรายวิชา คู่มือห้องปฏิบัติการวิจัย เพื่อให้คณาจารย์และนักศึกษาทันตแพทยศาสตร์ ได้ปฏิบัติการทดลองเรียนรู้ได้สะดวก รวดเร็ว พร้อมทั้งจัดทำวิดิโอประกอบการเรียนการสอนจะช่วยเสริมสร้างความเข้าใจมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังทำให้การปฏิบัติการทดลองสำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ของรายวิชาและเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

นางเพาพงา โกกิลกนิษฐ
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	
สารบัญ	
1. หลักการและเหตุผล	1
2. เป้าหมายและวัตถุประสงค์	1
3. กระบวนการและขั้นตอนการดำเนินงาน	1
4. ประโยชน์ที่ได้รับและการนำไปประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆ	35
5. สรุปจุดที่เป็นวิธีปฏิบัติที่เป็นแบบอย่างที่ดี	35
6. ภาคผนวก	36

1. หลักการและเหตุผล

โรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ในช่องปากและช่องปาก เช่น โรคฟันผุ ซึ่งในทางการแพทย์เรียกว่าฟันผุเป็นรอยโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ทำให้ฟันได้รับความเสียหาย เมื่อเวลาผ่านไปรอยโรคอาจเติบโตผ่านชั้นเคลือบฟันด้านนอกจนติดเชื้อที่ชั้นเนื้อฟัน หรือแม้กระทั่งโพรงประสาทฟันชั้นในสุด หากไม่รักษาโรคฟันผุการติดเชื้ออาจกลายเป็นฝีหนองที่ลามไปยังเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกกว่าของฟันใกล้รากฟัน หรือเข้าสู่กระแสเลือดแม้จะมีน้ำลายและแรงทางกลจากการเคี้ยวและการกินทำให้เกิดการติดเชื้อซึ่งอาจแพร่กระจายไปนอกช่องปากและบางครั้งอาจแพร่กระจายไปทั่วร่างกายทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้

2. เป้าหมายและวัตถุประสงค์

คู่มือประกอบการเรียนการสอนรายวิชาชีววิทยาช่องปากและวิทยาการโรคฟันผุ จัดทำขึ้นพร้อมวิดิโอประกอบปฏิบัติการทดลองของนักศึกษาทันตแพทยศาสตร์ เป็นวิชาพื้นฐานที่สำคัญในการเรียนรู้และศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดโรค สาเหตุการเกิดโรคในช่องปาก การตรวจหาเชื้อก่อโรคได้อย่างถูกต้อง การป้องกันการเกิดโรคฟันผุ และโรคในช่องปาก เพื่อให้นักศึกษาทันตแพทย์เรียนรู้เป็นแนวทางในการศึกษาและเข้าใจในรายวิชามากยิ่งขึ้น สามารถถ่ายทอดความรู้แก่บุคคลทั่วไปได้ และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปศึกษาต่อในระดับที่สูงขึ้น ผลิตผลงานวิจัยใหม่ๆ ต่อไปได้

3. กระบวนการและขั้นตอน

รูปแบบปฏิบัติการ

- ฝึกปฏิบัติการ โดยทำการทดลองเป็นกลุ่ม
- เรียนรู้จากการสาธิตวิดิโอประกอบการเรียนการสอน

ตารางปฏิบัติการ

ปฏิบัติการที่	เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบ
1. การย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
2. การวัดคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำลาย	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. การแยกโปรตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
4. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่องปากโดยการย้อมสีแกรม gram-straining	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
5. การวัดความเข้มข้นฟลูออไรด์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
6. การตรวจหาจำนวนและวัดความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคฟันผุ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

ปฏิบัติการที่ 1 การย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน

<u>สื่อการเรียนการสอน</u> วิดิโอประกอบการเรียนการสอนพร้อมคู่มือปฏิบัติการทดลอง

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ชั้น 7 อาคารราชสุดา

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อให้นักศึกษามีทักษะในการย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันด้วยสารละลายอิริโธรซีน และทำการประเมินสภาวะอนามัยช่องปากอย่างง่ายได้
2. เพื่อให้นักศึกษาตระหนักถึงความสำคัญของคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน

<u>เจ้าหน้าที่ผู้คุมปฏิบัติการ</u>

นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

คำชี้แจง แบ่งนักศึกษาออกเป็นกลุ่มๆ ละ 10 คน นั่งประจำที่จัดไว้ให้

<u>การย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน</u>

การตรวจหาคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจเพื่อประเมินสภาวะอนามัยช่องปากของผู้ป่วย โดยใช้ประกอบการวางแผนการรักษาทางทันตกรรมและพิจารณาอุปกรณ์อนามัยช่องปากที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยก่อนการรักษาใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับข้อมูลเบื้องต้นเพื่อดูพัฒนาการของการดูแลอนามัยช่องปากของผู้ป่วยในระหว่างการรักษา และใช้เป็นข้อมูลเพื่อวิเคราะห์พฤติกรรมอนามัยช่องปากผู้ป่วย และให้คำแนะนาเพื่อให้ผู้ป่วยสามารถดูแลอนามัยช่องปากตนเองได้ดีต่อไป

ในปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ฝึกปฏิบัติย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันด้วยสารละลายอิริโธรซีน (erythrosine solution) และทำการประเมินสภาวะอนามัยช่องปากอย่างง่ายให้กับสมาชิกในกลุ่ม

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. สารละลายอิริโธรซีน (erythrosine solution) หรือสี GC Tri Plaque ID Gel ที่มีส่วนผสมน้ำตาลซูโคสและสีน้ำเงินกับแดง ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 GC Tri Plaque ID Gel

2. ก้านพลาสติกสำหรับทาเจลที่ฟัน

3. ถาดพลาสติกขนาดเล็กสำหรับใส่สีเจล

4. แปรงสีฟัน (นักศึกษานำมาเอง) ใช้ทำความสะอาด

วิธีการทดลอง

1. บีบสีเจลลงในถาดพลาสติกเล็กน้อย

2. ใช้ก้านพลาสติกจุ่มสีเจล แล้วทาทั่วบริเวณฟันซี่ที่ 13-23 หลังจากนั้น 2 นาที ให้บ้วนน้ำออกเบาๆ

3. ถ่ายภาพฟัน

4. รายงานผลการย้อมสีที่เกิดขึ้น

รูปที่ 2 ลักษณะสีที่ย้อมติดฟัน

รูปที่ 3 ลักษณะฟันที่ถูกย้อมสี

แบบบันทึกผลปฏิบัติการ
เรื่อง การย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน

ชื่อ.....เลขประจำตัว.....เลขที่.....

1. จงอธิบายหลักการคร่าวๆ ของการย้อมคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันด้วยสารละลายอิริโธรซีน

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. จงระบุสัดส่วนจำนวนซี่ฟันที่ตรวจพบคราบจุลินทรีย์ต่อจำนวนซี่ฟันทั้งหมดในช่องบาก

ก่อนแปรงฟัน.....

หลังแปรงฟัน.....

<u>สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

.....

.....

.....

.....

ปฏิบัติการที่ 2 เรื่อง การวัดคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของน้ำลาย

สื่อการเรียนการสอน วิดิโอประกอบการเรียนการสอนพร้อมคู่มือปฏิบัติการทดลอง

สถานที่ ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ชั้น 7 อาคารราชสุดา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจวิธีวัดคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของน้ำลาย
2. สามารถปฏิบัติการและรายงานผลการวัดอัตราการไหลของน้ำลาย วัดค่า **pH** และ **buffering capacity** ได้

การเตรียมตัวก่อนปฏิบัติการ

- แปรงฟันและบ้วนปากด้วยน้ำสะอาด 3 - 4 ครั้ง
- ไม่ควรดื่มกาแฟหรือน้ำอัดลมก่อนปฏิบัติการนี้
- เตรียมนาฬิกาสำหรับจับเวลามาด้วย

เจ้าหน้าที่ผู้คุมปฏิบัติการ

- นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

คำชี้แจง แบ่งนักศึกษาออกเป็น 10 กลุ่มๆ ละ 10-11 คน โดยให้แต่ละกลุ่มประจำโต๊ะปฏิบัติการที่เจ้าหน้าที่จัดไว้ให้

คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของน้ำลาย

น้ำลายเป็นของเหลวในช่องปากที่มีบทบาทสำคัญ ทั้งต่อเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็งในปาก โดยอันตรกิริยาระหว่างน้ำลายกับเยื่อเมือกช่องปาก (Oral mucosa) จะช่วยให้ความชุ่มชื้น รักษาสมดุลการสร้างและหลุดลอกของเยื่อบุในช่องปาก รวมทั้งปกป้องเยื่อบุดังกล่าวจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก นอกจากนั้นน้ำลายมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น สารช่วยปรับสมดุลกรด-เบส (Buffer capacity) สารต้านจุลชีพ (Anti-microbial activity) ตลอดจนมีแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่สะเทินความเป็นกรด และส่งเสริมกระบวนการคืนกลับแร่ธาตุ (Remineralization) โดยในสภาวะปกติ การละลายของแร่ธาตุและการคืนกลับแร่ธาตุจะเกิดขึ้นอย่างสมดุล ทำให้เคลือบฟันมีความคงตัว

ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของต่อมน้ำลายหรือกระบวนการหลั่งน้ำลาย เช่น ได้รับรังสีรักษาซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงทำลายต่อมน้ำลายเกิดภาวะปากแห้งน้ำลายน้อย จะมีคุณสมบัติทางกายภาพ

และเคมีของน้ำลายที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคในช่องปาก เช่น โรคฟันผุ โรคปริทันต์ การติดเชื้อรา และเยื่อบุช่องปากอักเสบ เป็นต้น

น้ำลายแบ่งเป็น น้ำลายในภาวะพัก (Unstimulated saliva) และน้ำลายในภาวะกระตุ้น (Stimulated saliva) ซึ่งน้ำลายในระยะกระตุ้นส่วนใหญ่จะหลั่งจากต่อมน้ำลายพาโรติด (Parotid gland) ซึ่งมีลักษณะใส (Serous) และมีสารบัฟเฟอร์พวกคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบ จึงส่งผลต่อคุณสมบัติของน้ำลาย

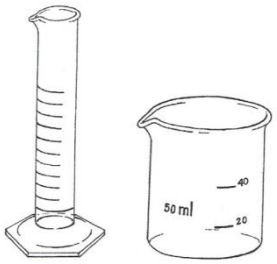
<u>การวัดคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำลาย</u>

การทดสอบที่ 1: น้ำลายในภาวะพัก (Unstimulated saliva)

1.1 วัดอัตราการไหลของน้ำลาย

วัสดุและอุปกรณ์

1. Measuring Cylinder ขนาด 10 มล.
2. Steriled beaker ขนาด 50 มล.
3. นาฬิกาจับเวลา



Measuring cylinder และ beaker

วิธีการทดสอบ

1. ให้นักศึกษานั่งตัวตรง แล้วบ้วนน้ำลายลงใน beaker เป็นเวลาติดต่อกัน 5 นาที
2. ทำการวัดปริมาณน้ำลายที่ได้จากการเคี้ยว โดยใช้ Measuring cylinder และคำนวณอัตราการไหลของน้ำลายเป็น มล./นาที ลงในใบบันทึกผลที่จัดให้

การแปลผล

อัตราการหลั่งน้ำลายปกติในผู้ใหญ่	0.3-0.4	มล./นาที
อัตราการหลั่งน้ำลายน้อยผิดปกติ	<0.1	มล./นาที

* ภาวะปากแห้งน้ำลายน้อย (Xerostomia) จะมี อัตราการหลั่งน้ำลายน้อยกว่าปกติ (Hyposalivation) มีอาการรู้สึกปากแห้ง ต้องจิบน้ำบ่อย และมีอาการแสดงในช่องปาก เช่นริมฝีปากแห้ง ลิ้นแตก และไม่มีน้ำลาย เป็นต้น

1.2 วัด Resting pH (ความเป็นกรด – เบสของน้ำลายในภาวะพัก)

Buffer capacity ของน้ำลาย คือความสามารถของน้ำลายในการปรับสภาพที่เป็นกรดในช่องปากให้คืนสู่ภาวะปกติ

วัสดุและอุปกรณ์

1. น้ำลายจากการข้อ 1.1
2. forceps
3. pH indicator paper

pH indicator paper

วิธีการทดสอบ

การวัดค่า pH

1. ใช้ forceps จับ pH indicator paper จุ่มลงในน้ำลายในบีกเกอร์ที่ได้จากการทดลองแรก
2. อ่านค่า pH จากการเปลี่ยนสีของกระดาษลิตมัส และบันทึกผล

ตารางการแปลผล

	Resting pH
Acidic	< 6
Normal	6.0 – 7.0
Basic	> 7

ค่าความเป็นกรด - เบสของน้ำลายจะสัมพันธ์กับสมดุลแร่ธาตุบนผิวเคลือบฟัน โดยในภาวะที่ pH ต่ำกว่า 5.5 จะเกิดการละลายแร่ธาตุออกจากผิวเคลือบฟัน (Demineralization) มากกว่าการคืนกลับ (Demineralization) ซึ่งจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุ ในภาวะที่ pH เป็นเบส จะมีโอกาสเกิดตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตเกาะที่ผิวฟันหรือที่เรียกว่า หินน้ำลาย หรือ หินปูน (Calculus) มากขึ้น

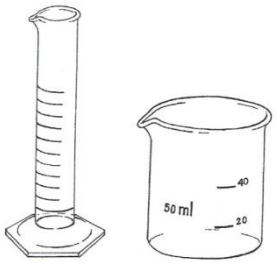
การทดสอบที่ 2: น้ำลายในภาวะกระตุ้น (Stimulated saliva)

2.1 วัดอัตราการไหลของน้ำลาย

ในการทดลองนี้เป็นการวัดอัตราการไหลของน้ำลายที่ถูกกระตุ้นด้วยการเคี้ยว

วัสดุและอุปกรณ์

1. Measuring Cylinder ขนาด 10 มล.
2. Steriled beaker ขนาด 50 มล.
3. Parafilm
4. นาฬิกาจับเวลา



Measuring cylinder และ beaker

วิธีการทดสอบ

1. ให้นักศึกษานั่งตัวตรง อมชิ้น Parafilm ไว้ในปากจนอ่อนตัวโดยยังไม่เริ่มเคี้ยว ทำการกลืนน้ำลายให้หมด จากนั้นเริ่มเคี้ยว Parafilm พร้อมกับจับเวลา โดยบ้วนน้ำลายลงใน beaker เป็นเวลาติดต่อกัน 5 นาที

2. ทำการวัดปริมาณน้ำลายที่ได้จากการเคี้ยว โดยใช้ Measuring cylinder และคำนวณอัตราการไหลของน้ำลายเป็น มล./นาที ลงในใบบันทึกผลที่จัดให้

การแปลผล

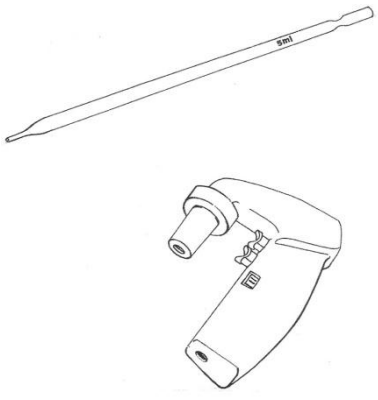
อัตราการหลั่งน้ำลายปกติในผู้ใหญ่	1-2	มล./นาที
อัตราการหลั่งของน้ำลายที่น้อยผิดปกติ	< 0.5	มล./นาที

ในภาวะที่ถูกกระตุ้น เช่น จากการบดเคี้ยว หรือการรับประทานอาหารบางชนิด เช่น ผลไม้รสเปรี้ยว ต่อมพาโรติดจะหลั่งน้ำลายเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น Stimulated saliva จึงมี Flow rate มากกว่า Unstimulated saliva

2.2 วัด Buffering capacity (ความสามารถของน้ำลายในการปรับสภาพที่เป็นกรดในช่องปากให้คืนสู่ภาวะปกติ)

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Beaker 50 มล.
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องผสมสาร (Vortex)
4. Pipette ขนาด 1 มล. และ 5 มล.
5. กรดไฮโดรคลอริก (0.005M HCl)
6. pH indicator paper
7. Parafilm



pipette และ pipette aid

การวัด Buffering capacity

1. ทำการดูดน้ำลาย 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้
2. ทำการเติมกรดไฮโดรคลอริก (0.005M HCl) ปริมาตร 3 มล. ลงในน้ำลาย ใช้ Parafilm ปิดปากหลอดทดลอง และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นให้นำ Parafilm ออก แล้ววางหลอดทดลองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
3. จากนั้นเทสารในหลอดทดลองใส่บีกเกอร์ และวัดค่า pH ด้วยกระดาษ pH indicator paper โดยใช้ forceps จับชิ้นกระดาษ จากนั้นนำค่า pH ที่วัดได้ ไปเปรียบเทียบกับตารางการแปลผล

ตารางการแปลผล

Buffering capacity	**Final pH**
High	> 6.50
Normal	5.75 – 6.50
Low	4.00 – 5.74
Very low	< 4.00

ความสามารถในการปรับสมดุล กรด – เบส นับว่ามีความสำคัญยิ่งต่อการรักษาสมดุลแร่ธาตุบริเวณผิวเคลือบฟัน น้ำลายที่มี Low หรือ Very low buffering capacity จะไม่สามารถปรับกรด-เบสได้ดี ในภาวะที่แบคทีเรียในช่องปากย่อยน้ำตาลและปล่อยกรดออกมา จะทำให้ pH ในน้ำลายลดต่ำลง ซึ่งระบบบัฟเฟอร์จะทำหน้าที่ปรับ pH ให้สูงขึ้น กลับสู่ภาวะปกติ แต่หากน้ำลายมี buffering capacity ต่ำไม่สามารถปรับ pH ได้ดี ค่า pH ในน้ำลาย จะลดต่ำลงเรื่อยๆ จนถึง 5.5 ก็จะเสียสมดุลและเกิดการละลายของผิวเคลือบฟันมากกว่าการคืนกลับของแร่ธาตุ

แบบบันทึกผลปฏิบัติการ
เรื่อง การวัดคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำลาย

ชื่อ.....เลขประจำตัว.....เลขที่.....

Flow rate

Unstimulated saliva อัตราการหลั่งน้ำลาย.....มล./นาที

Stimulated saliva อัตราการหลั่งน้ำลาย.....มล./นาที

Salivary pH (unstimulated)

ค่า pH .....

Buffer capacity (stimulated)

ค่า Final pH .....

ค่า Buffer capacity.....

<u>คำถามชวนคิด</u>

1. ในผู้ป่วยที่ต่อมน้ำลายพาโรติดถูกทำลายเนื่องจากการรับรังสีรักษา คุณสมบัติของน้ำลายน่าจะเปลี่ยนไปอย่างไร เพราะเหตุใด (Flow rate, pH, buffering capacity)

.....

.....

2. เหตุใดจึงไม่ควรดื่มกาแฟ หรือน้ำอัดลมก่อนการทดสอบคุณสมบัติน้ำลาย

.....

.....

.....

<u>สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

.....

.....

ปฏิบัติการที่ 3 เรื่อง การแยกโปรตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE

สื่อการเรียนการสอน วิดิโอประกอบการเรียนการสอนพร้อมคู่มือปฏิบัติการทดลอง

วันเวลา-สถานที่

สถานที่ ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ชั้น 7 อาคาราชสุดา

วัตถุประสงค์

1. นักศึกษาทราบหลักการแยกโปรตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE
2. นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการแยกโปรตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE พร้อมทั้งวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของน้ำลายได้

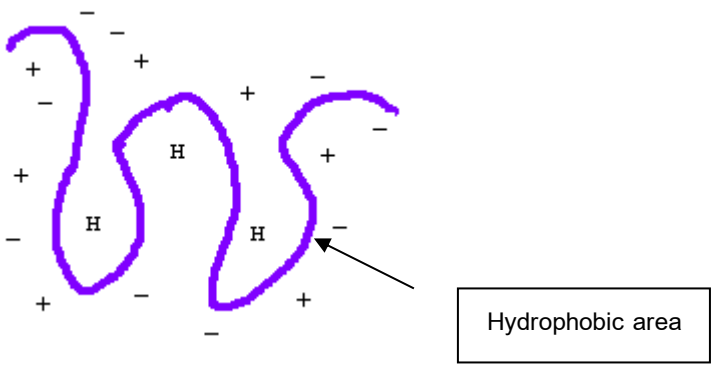
เจ้าหน้าที่ผู้คุมปฏิบัติการ

นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

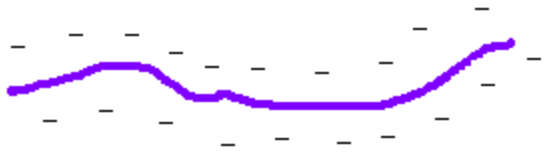
คำชี้แจง แบ่งนักศึกษาออกเป็น 10 กลุ่มๆ ละ 10-11 คน โดยให้แต่ละกลุ่มประจำโต๊ะปฏิบัติการที่เจ้าหน้าที่จัดไว้ให้

การแยกโปรตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE

SDS-PAGE (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate-**P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis) เป็นวิธีการแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันด้วยขนาดของโมเลกุลที่วิ่งผ่านเจลที่มีรูพรุนในสนามไฟฟ้า (electric field) โดย SDS เป็น detergent ที่ทำให้โมเลกุลส่วนที่เป็น hydrophobic ของโปรตีนถูกทำลายและจะเข้าไปเคลือบโมเลกุลของโปรตีนให้มีประจุเป็นลบโดยรอบ ดังรูปที่1



(A) โมเลกุลของโปรตีนก่อนทำการ denature ด้วยการต้ม



(B) โมเลกุลโปรตีนหลังจาก denature จะเกิดการคลายตัวเป็นเส้น (linear) และถูกเคลือบด้วยประจุลบของ SDS

รูปที่ 4 (A) โครงสร้างโปรตีนในสภาพปกติ (B) โครงสร้างโปรตีนเมื่อเกิด denature และทำปฏิกิริยากับ SDS

Polyacrylamide เป็น polymer ของ acrylamide monomers เมื่อเกิดการ polymerization จะได้เจลที่มีลักษณะเป็นรูให้โปรตีนวิ่งผ่านได้ โดยโปรตีนจะวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก โปรตีนที่มีขนาดเล็ก จะสามารถผ่านเจลไปได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงสามารถแยกโปรตีนที่มีขนาดต่างกันได้

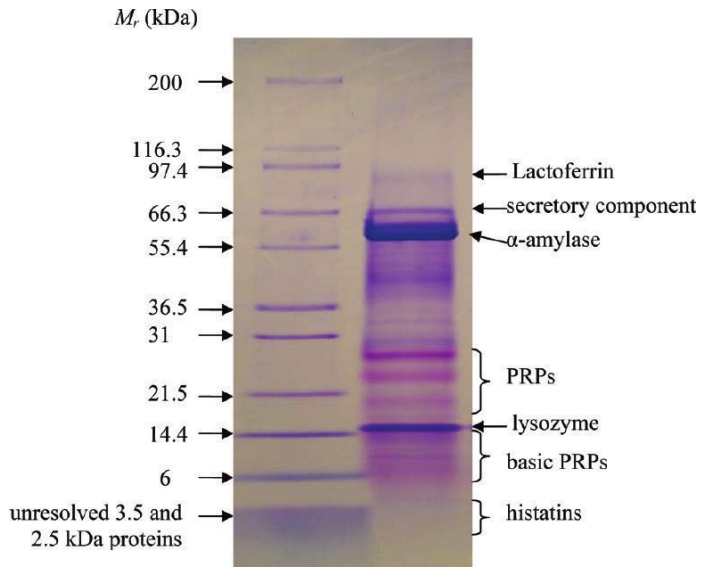
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Sterile beaker ขนาด 50 มล.
2. เครื่อง centrifuge
3. Precast gel และchamber ในการ electrophoresis
4. Loading buffer (dye)
5. SDS Loading buffer
6. Power supply
7. สีย้อม Coomassie Blue
8. Shaker
9. Destaining เจลด้วย 10% gracial acetic acid in 1:1 methanol/H_20
10. Pipette และ tip ขนาดต่างๆ
11. Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. ให้นักศึกษาบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดสามครั้งก่อนเก็บน้ำลายแบบ Unstimulated saliva เป็นเวลา 3 นาที
2. ใช้ปิเปตดูดน้ำลายปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 5,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที
3. ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ Eppendorf tube อันใหม่ นำไปปั่นอีกครั้งด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที
4. ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 24 ไมโครลิตรใส่ Eppendorf tube อันใหม่ เติม Loading buffer (Dye) ลงไป 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
5. นำ Eppendorf tube ไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge สั้นๆ เพื่อให้ของเหลวทั้งหมดตกลงมาอยู่ที่ก้นของ Tube
6. Load น้ำลายที่ได้จากข้อ 5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในเจลที่เตรียมไว้
7. Run gel โดยตั้งค่าเครื่อง Power supply ที่ 0.2 mA เป็นเวลา 15 นาที ต่อด้วย 0.4 mA เป็นเวลา 30 นาที
8. แกะเจลออก และนำไปย้อมด้วย Coomassie Blue เป็นเวลา 40 นาที
9. ล้างสีออกด้วย 10% Glacial acetic acid ใน1:1 methanol/H_20 จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

การแปลผล



รูปที่ 5 แสดงลำดับน้ำหนักของโปรตีนมาตรฐาน

แบบบันทึกผลปฏิบัติการ
เรื่อง การแยกโปนตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE

1. จงอธิบายหลักการคร่าวๆ ของการแยกโปรตีนในน้ำลายด้วยวิธี SDS-PAGE

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. จงระบุชื่อโปรตีนตามขนาดโมเลกุลจากภาพ SDS-PAGE Electrophoresis gel

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

<u>สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ปฏิบัติการที่ 4
การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่องปากโดยการย้อมสีแกรม gram-straining

<u>สื่อการเรียนการสอน</u> วิดิโอประกอบการเรียนการสอนพร้อมคู่มือปฏิบัติการทดลอง

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ชั้น 7 อาคารราชสุดา

<u>วัตถุประสงค์</u>

1.เพื่อให้นักศึกษาได้ศึกษาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

2.เพื่อให้นักศึกษาฝึกการใช้สีย้อมพื้นฐานในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน

นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

<u>กฎการใช้ห้องปฏิบัติการ</u>

1. เข้าห้องปฏิบัติการตรงเวลา
2. ใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการอย่างถูกวิธี และระมัดระวัง
3. ห้าม! คุยเสียงดัง
4. ห้าม! รับประทานอาหารในห้องปฏิบัติการ

<u>การศึกษารอยโรคฟันผุ</u>

โรคฟันผุ (Dental caries) หรือ ฟันผุ เป็นโรคติดเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า *Streptococcus mutans* เข้าร่วมในกระบวนการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง และน้ำตาลในอาหารที่ตกค้างบนฟัน หรือคราบจุลินทรีย์ (Dental plague) ให้เป็นกรด ที่สามารถสลายแร่ธาตุซึ่งเป็นโครงสร้างของฟัน ทำให้ฟันผุกร่อน การสลายแร่ธาตุของฟันทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (Demineralization) จากตัวฟัน ซึ่งเป็นกระบวนการเริ่มต้นของโรคฟันผุ

ฟันที่เริ่มผุจะซ่อมแซมเองได้ เพราะน้ำลายในช่องปากจะมีกระบวนการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุแคลเซียม (Calcium) และ ฟอสฟอรัส (Phosphorus) ระหว่างชั้นผิวเคลือบฟันกับแร่ธาตุที่มีอยู่ในน้ำลายตลอดเวลา โดยจะมีทั้งการสูญเสียแร่ธาตุจากฟัน (Demineralization) และการคืนกลับแร่ธาตุ (Remineralization) สู่ฟันอย่างสมดุล ในสภาวะที่สภาพน้ำลายในช่องปากค่อนข้างเป็นกลาง จะไม่มีการสูญเสียแร่ธาตุออกจากผิวฟัน แต่ในสภาวะที่จุลินทรีย์มีการย่อยสลายอาหารแป้งและน้ำตาล สภาพแวดล้อมของน้ำลายจะเป็นกรด เกิดการกัดกร่อนฟัน ทำให้สูญเสียแร่ธาตุแคลเซียม และฟอสฟอรัส ออกจากตัวฟันไปยังน้ำลายมากกว่าการได้รับกลับคืน ซึ่งถ้าเกิดขึ้นบ่อยจะทำให้ฟันผุเป็นโพรงได้

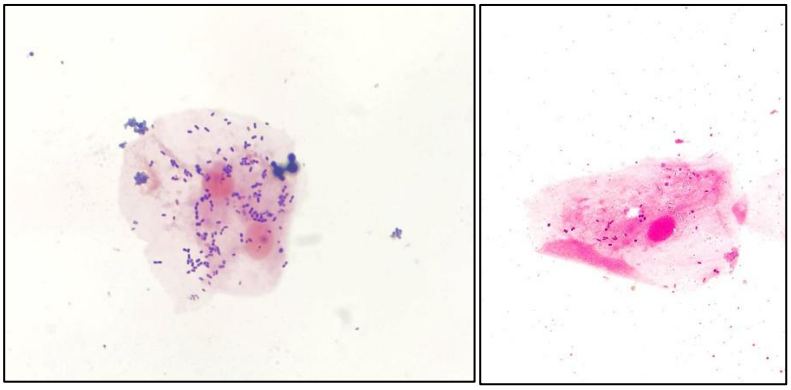
ในปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ฝึกปฏิบัติการตรวจหาเชื้อปบคทีเรียในช่องปาก การใช้สีย้อมแบคทีเรีย Gram-strain สำหรับแยกแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตลอดจนศึกษาดูลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว การติดสี

วัสดุและอุปกรณ์

1. สีย้อม Gram-strain
2. ไม้พันสำลีสเตอร์ไรด์
3. กระจกสไลด์แก้ว
4. ตะเกียงแอลกอฮอลล์ ไฟแช็ค
5. ถุงมือยาง แมสปิดจมูก
6. กล้อง light microscope พร้อม oil

วิธีการทดลอง

1. ใช้ไม้พันสำลีสเตอร์ไรด์ถูกฟันตามซอกฟันและกระพุ้งแก้วด้านข้าง โดยทำทั้ง 4 ด้านฟัน บนซ้าย-ขวา ล่างซ้าย-ขาวแล้วนำมาป้ายบนกระจกสไลด์ จะได้ 4 สไลด์
2. มาวาง Fix โดยผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้ง
3. หยดสี Crystal violet 2-3 หยดลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเบาๆ
4. หยด iodine 2-3 หยดลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเบาๆ
5. หยด decolorize หยดประมาณ 10 หยด เพื่อกำจัดสีส่วนเกินออก แล้วล้างน้ำเบาๆ
6. หยด Safanin dye 2-3 หยดลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเบาๆ
7. ซับด้วยกระดาทิชชูเบาๆให้แห้ง แล้วนำไปส่องกล้อง light microscope ด้วยกำลังขยาย 100x
8. รายงานบันทึกผล



รูปที่ 6 ลักษณะเชื้อแบคทีเรียและเยื่อบุกระพุ้งแก้ม

แบบบันทึกผลปฏิบัติการที่ 4

เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่องปากโดยการย้อมสีแกรม gram-straining

ชื่อ.....เลขประจำตัว.....เลขที่.....

1. จงอธิบายลักษณะรอยโรคและประเภทของฟันผุที่นักศึกษาได้นำมาศึกษาในปฏิบัติการนี้

.....

.....

.....

.....

.....

2. อธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและเหตุผลที่เลือกใช้เครื่องมือแบบต่าง ๆ ในปฏิบัติการนี้ในการตรวจรอยโรคฟันผุ

.....

.....

.....

.....

.....

<u>สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</u>

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ปฏิบัติการที่ 5 การวัดความเข้มข้นฟลูออไรด์

<u>สื่อการเรียนการสอน</u> วิดิโอประกอบการเรียนการสอนพร้อมคู่มือปฏิบัติการทดลอง

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ชั้น 7 อาคารราชสุดา

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติวิธีการวัดความเข้มข้นฟลูออไรด์ได้อย่างถูกต้อง
2. เพื่อให้นักศึกษารู้จักเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นฟลูออไรด์
3. เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจวิธีการแปลผลความเข้มข้นของฟลูออไรด์เพื่อการวางแผนทันตกรรมป้องกันฟันผุ

เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน

นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

ฟลูออไรด์เป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างความแข็งแรงแก่ฟัน และป้องกันฟันผุ เนื่องจากการได้รับฟลูออไรด์ทางระบบ (การกินหรือดื่มน้ำที่มีฟลูออไรด์) ในช่วงที่ฟันกำลังเจริญเติบโต จะช่วยให้เกิด **Fluoroapatite** ซึ่งสามารถทนต่อกรดได้ดีกว่า hydroxyapatite ทำให้ฟันมีโอกาสเกิดการสลายแร่ธาตุได้ยากกว่า นอกจากนั้นการมีฟลูออไรด์ในขณะที่มีการสูญเสียแร่ธาตุ จะสามารถ**กระตุ้นการคืนแร่ธาตุกลับ**ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า กล่าวได้ว่า ปริมาณฟลูออไรด์ที่ได้รับมีความสำคัญต่อปัจจัยด้านตัวฟัน (host) ในวงแหวนสาเหตุการเกิดฟันผุ ประสิทธิภาพของฟลูออไรด์ ในการป้องกันฟันผุได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง จาก Cochran review แสดงให้เห็นว่ายาสีฟันผสมฟลูออไรด์ และ fluoride gel สามารถป้องกันฟันผุได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ดี หากได้รับฟลูออไรด์มากเกินไปก็อาจเป็นผลเสีย เช่น เกิดภาวะ dental และ skeletal fluorosis โดยขึ้นกับปริมาณฟลูออไรด์ที่ได้รับ ระยะเวลาและช่วงเวลา

หลักการวัดฟลูออไรด์

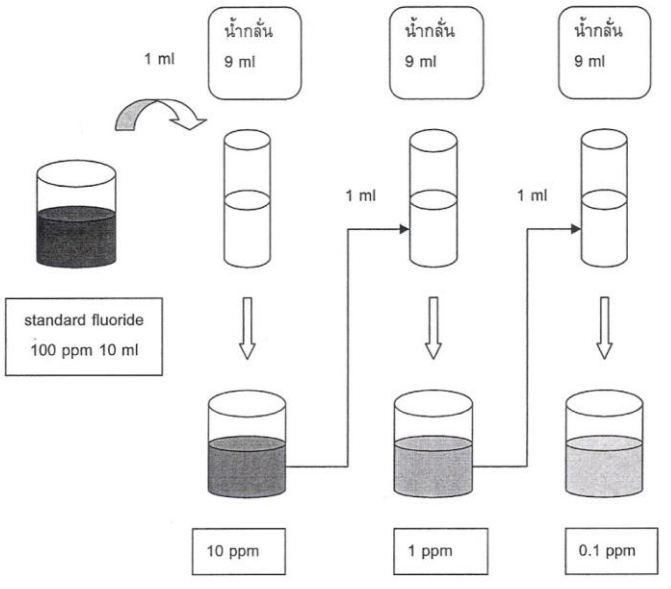
ในปฏิบัติการนี้ จะใช้ **Fluoride selective electrode** ซึ่งวัดออกมาเป็นค่าความต่างศักย์ และสามารถแปลผลเป็นความเข้มข้น หน่วย part per million (ppm) ได้ โดยอาศัย Regression equation จาก standard fluoride แม้ว่า Fluoride electrode จะจำเพาะต่อ fluoride แต่ก็อาจ sensitive ต่อ ion อื่น เช่น hydroxide ion ได้ ดังนั้นปริมาณของ hydroxide ion ซึ่งสะท้อนโดยค่า pH ที่สูงนั้น อาจรบกวนการวัดฟลูออไรด์ได้ เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว จึงมีการเติม Total ionic strength adjustment buffer II (TISAB II) เพื่อควบคุม pH และจับ ion อื่นที่อาจมารบกวนการวัด

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Autopiptette Pipette ขนาด 1 ml พร้อม Tip
2. หลอดสำหรับใส่ตัวอย่างที่ต้องการวัดขนาด 15 ml
3. เครื่องวัดปริมาณฟลูออไรด์ (Orion) พร้อมอิเลคโทรดฟลูออไรด์
4. Standard fluoride ความเข้มข้น 100 ppm
5. TISAB II (Total Ionic Strength Adjustment Buffer, 1.0 M acetate buffer, pH 5.0, containing 1.0 M sodium chloride (NaCL) and 0.4% cyclohexylenedinitrilotetraacetate (CDTA)
6. น้ำ Deionized water
7. ตัวอย่างยาสีฟัน หลายๆยี่ห้อ เช่น คอลเกต เซนโซดาย ดาร์กี้ โคโดโมะ
8. เครื่องปั่นตกตะกอน Centrifuge
9. เครื่องชั่งแบบละเอียดสำหรับชั่งยาสีฟัน
10. 1.0 M HaOH

การเตรียม standard fluoride solution

1. นำ standard fluoride ความเข้มข้น 100 ppm มา 1 ml เติมน้ำกลั่นอีก 9 ml เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml จะได้ standard fluoride ที่มีความเข้มข้น 10 ppm
2. นำ standard fluoride ความเข้มข้น 10 ppm มา 1 ml เติมน้ำกลั่นอีก 9 ml เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml จะได้ standard fluoride ที่มีความเข้มข้น 1 ppm
3. นำ standard fluoride ความเข้มข้น 1 ppm มา 1 ml เติมน้ำกลั่นอีก 9 ml เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml จะได้ standard fluoride ที่มีความเข้มข้น 0.1 ppm ดังรูปที่ 7



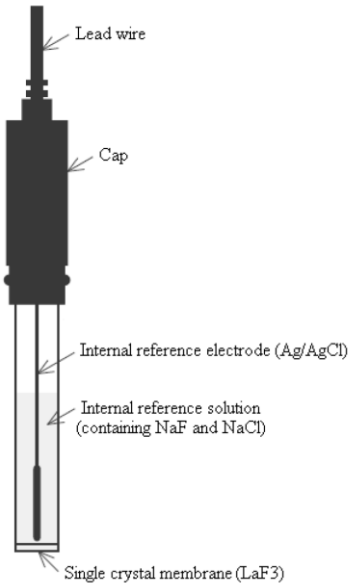
รูปที่ 7 การเตรียม standard fluoride

ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. ทำการ set standard fluoride ที่เตรียมไว้ทั้งสามความเข้มข้นมา 1 ml เติม TISAB II 1 ml (อัตราส่วน 1:1) เขย่าให้เข้ากัน นำไป calibrate เครื่องวัดฟลูออไรด์
2. นำตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณฟลูออไรด์มาเติม TISAB II ในอัตราส่วน TISAB II: ตัวอย่าง เท่ากับ 1:1 นำมาวัดด้วยเครื่องวัดฟลูออไรด์

หมายเหตุ: เจ้าหน้าที่จะเป็นผู้เตรียม standard fluoride solution และทำการ set standard fluoride ให้

รูปที่ 8 แสดงเครื่องวัดฟลูออไรด์ / พร้อมอิเล็คโทรด / TISABII / Standard Flioride



รูปที่ 9 โครงสร้างของ Fluoride ion selective electrode

วิธีการเตรียมตัวอย่างยาสีฟัน

1. ทำการชั่งน้ำหนักหลอด (15 ml) ก่อนใส่ยาสีฟัน
2. ชั่งยาสีฟัน 90-100 mg ในหลอดอันเดิมที่ได้ชั่งไว้แล้ว
3. เติมน้ำ deionized 10 ml ผสมปั่นให้เข้ากันโดยใช้ vortex จนยาสีฟันละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4. ทำการวัด TF (Total fluoride) โดยดูดออกมา 0.25 ml ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge
5. ทำการวัด TSF (Total soluble fluoride) นำหลอดที่ใส่ยาสีฟันที่เหลือไปปั่นตะกอน 3,000 g 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดส่วนใสออกมา 0.25 ml ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge
6. นำหลอด TF และ TSF ใส่ 2.0 HCL จำนวน 0.25 ml
7. นำไป heat ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม.
8. Neutalize โดยการเติม 1.0 M NaOH จำนวน 0.5 ml และเติม TISAB II จำนวน 1 ml
9. ทำการวัดฟลูออไรด์ (TF และ TSF) โดยทำการคำนวณความเข้มข้นของฟลูออไรด์หน่วย ppm (μgF/g of toothpaste)
10. คำนวณหาค่า Insoluble fluoride ion (InF) จากสูตร (InF = TF – TSF)
11. คำนวณ percentage of TSF หรือ InF ด้วยการหาร TSF หรือ InF ด้วย TF และคูณด้วย 100

Definition

F	:	Fluoride
IF	:	Floride ion
TSF	:	total soluble fluoride which is sum of IF and F as MFP ion
InF	:	Insoluble fluoride ion
TF	:	Total fluoride which is sum of TSF and InF

แบบบันทึกผลปฏิบัติการที่ 5
เรื่องการวัดความเข้มข้นฟลูออไรด์

ชื่อ……นามสกุล……

รหัสประจำตัว…..……

ผลการวัด Standard F-

---

1. Calibration curve

$[F^-]$ (ppm)	Log $[F^-]$	E (mV)

2. ผลการวัดความเข้มข้นฟลูออไรด์ในยาสีฟัน

	Commercial brand		
Fluoridated agent			
Fluoride expected			
Toothpaste weight (mg)			
E of TF solution (mV)			
E of TSF solution (mV)			
TF concentration (ppm)			

TF content (mg)			
TF concentration in toothpaste (ppm)			
TSF concentration (ppm)			
TSF content (mg)			
TF concentration in toothpaste (ppm)			
InF concentration (ppm)			
TSF content (%)			
InF content (%)			

อธิบายและสรุปผลการทดลอง

……

……..

……..

……..

……..

จงอภิปรายว่า การทราบความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในยาสีฟันมีประโยชน์อย่างไรและฟลูออไรด์ในยาสีฟันของเด็กและผู้ใหญ่มีความแตกต่างกันอย่างไร

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ปฏิบัติการที่ 6 เรื่อง การตรวจหาจำนวน และวัดความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคฟันผุ

<u>สื่อการเรียนการสอน</u> วิดีโอประกอบการเรียนการสอนพร้อมคู่มือปฏิบัติการทดลอง

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ ชั้น 7 อาคารราชสุดา

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการตรวจหา mutans streptococci โดยวิธี saliva / tongue blade method
2. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการตรวจหาและสามารถคำนวณหาจำนวน Lactobacilli ในน้ำลายได้อย่างถูกต้อง
3. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการวัดอัตราการสร้างกรดอันเนื่องจากแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์โดยใช้ Modified Snyder's test

เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน

นาง เพาพงา โกกิลกนิษฐ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการ

ปฏิบัติการที่ 6.1 : การตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคฟันผุ

1. การตรวจหาจำนวน mutans streptococci ในน้ำลาย

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อจุลินทรีย์เริ่มแรกที่ก่อให้เกิดฟันผุ (Initiator) ได้แก่ กลุ่ม mutans streptococci โดยเฉพาะ *S. mutans* รายงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของจำนวนเชื้อ *S. mutans* ในน้ำลายหรือคราบจุลินทรีย์กับการเกิดฟันผุ โดยปริมาณ *S. mutans* ที่สูง แสดงถึง High caries activity ปริมาณของ *S. mutans* จึงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยงในการเกิดฟันผุ

Mitis Salivarius agar (MS) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแรกที่พัฒนาขึ้นเป็น Selective medium สำหรับเพาะเลี้ยง streptococci species จากนั้นจึงนำมาใช้ในการจำแนก *S. mutans* จากลักษณะเฉพาะของ *S. mutans* colony ที่มีลักษณะคล้ายปากปล่องภูเขาไฟและมันวาวจาก extracellular mucopolysaccharide ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพาะเชื้อแบคทีเรียบน MS ต้องอาศัยการทำ serial dilutions หลายครั้ง เพื่อลดจำนวนเชื้อ streptococci ชนิดอื่น และ Enterococci ที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของ *S. mutans* มิฉะนั้นอาจเกิด false negative และได้ปริมาณเชื้อที่ต่ำกว่าความเป็นจริง ด้วยเหตุนี้ เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะมากขึ้นจึงได้มีการปรับปรุง MS โดยเติม 0.2 U bacitracin และ 20% sucrose ลงใน MS เรียกว่า Mitis Salivarius

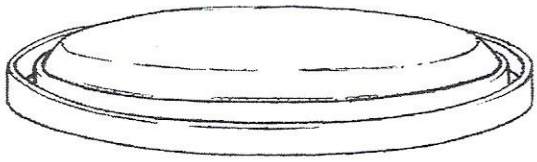
Bacitracin (MSB) agar ทำให้ media นี้ มีความจำเพาะกับ *S. mutans* ที่ดีขึ้น ทั้งนี้ mutans streptococci ทุกกลุ่ม ยกเว้น serotype A สามารถเจริญได้บน MSB หลังจากนั้นได้มีการคิดค้น selective media สำหรับ *S. mutans* อีกหลายชนิด เช่น mitis salivarius ที่ประกอบด้วย bacitracin และ kanamycin (MSKB) และ tryptone-yeast extract-cysteine with sucrose and bacitracin (TYCSB) จากรายงานการวิจัยถึงความไวและความจำเพาะต่อ *S. mutans* ของ selective media ชนิดต่างๆ พบว่า TYCSB เป็น selective media ที่ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการเตรียม TYCSB ค่อนข้างยุ่งยากและมีราคาที่แพงกว่า MSB การตรวจหาเชื้อ *S. mutans* ด้วย MSB จึงยังเป็นที่นิยมอยู่

ในปัจจุบัน นอกจากวิธีการเพาะเลี้ยง *S. mutans* ด้วย selective media แล้ว ยังได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ *S. mutans* ที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง อาทิเช่น การใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และการใช้ fluoresecence monoclonal antibody ที่จำเพาะกับ *S. mutans* แม้ว่าเทคนิคเหล่านี้จะสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *S. mutans* ได้อย่างแม่นยำ แต่ด้วยข้อเสียในเรื่องวิธีการที่ยุ่งยาก สิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่าย ทำให้วิธีการเหล่านี้ยังมีการใช้ในวงจำกัด และทำให้การเพาะเชื้อด้วย selective media ยังคงเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย

สำหรับปฏิบัติการนี้จะทำการตรวจหา mutans streptococci โดยวิธี saliva / tongue blade method ซึ่งเป็นการประมาณจำนวนของ mutans streptococci ที่ขึ้นใน MSB agar

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Parafilm
2. Steriled tongue blade
3. Disposable contact Petri dish containing MSB agar
4. Incubator

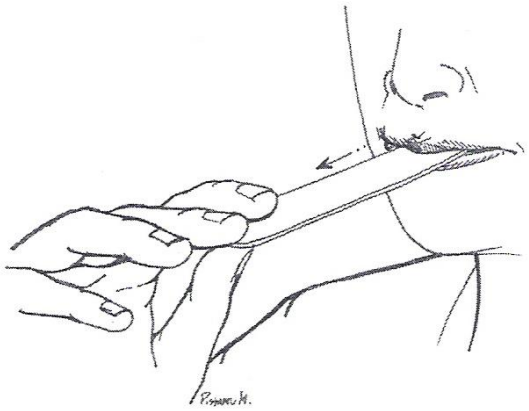


รูปที่ 10 contact Petri dish

วิธีทดลอง

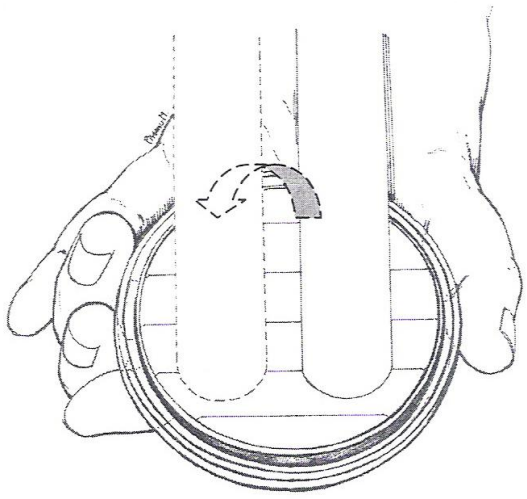
1. ให้นักศึกษาเคี้ยว parafilm นาน 1 นาที

2. นำ steriled tongue blade ป้ายที่ลิ้นโดยพลิกกลับไปกลับมาทั้งหมด 10 ครั้ง จากนั้นเม้มปากและรูดเอา tongue blade ออกมา เพื่อเป็นการกำจัดน้ำลายส่วนเกิน



รูปที่ 11 เม้มปากและรูด tongue blade ออกมา

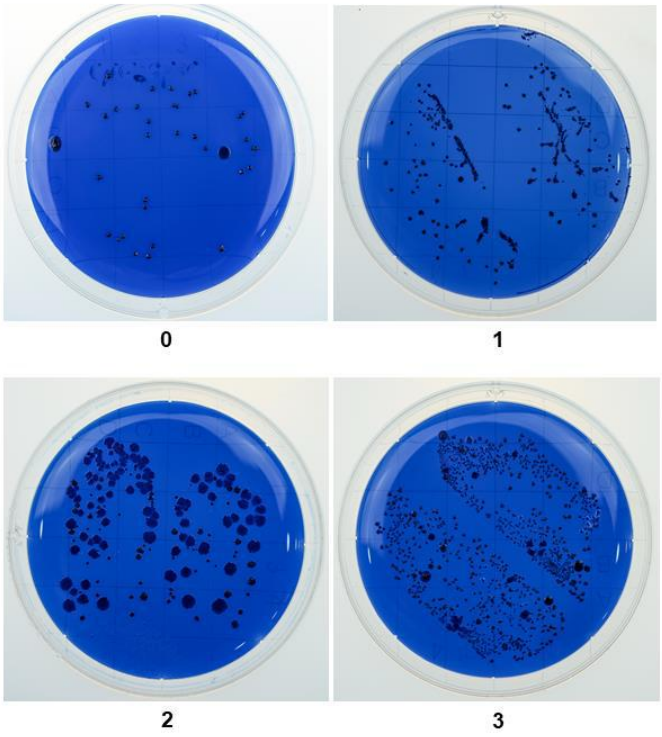
3. นำ tongue blade แต่ละด้านไปกดเบาๆ บน MSB agar โดยไม่ให้รอยกดซ้อนทับกัน
4. นำ contact Petri dish ไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 4 วันตรวจดูความหนาแน่นของโคโลนีแบคทีเรียบนรอยกด tongue blade ทั้ง 2 ด้าน
5. หาค่าเฉลี่ยและแปลผล



รูปที่ 12 กด tongue blade แต่ละด้าน บน contact agar

การแปลผล

ความหนาแน่น	Score	แปลผลว่า
น้อยกว่า 10%	0	ปริมาณเชื้อต่ำมากหรือแทบไม่มีในน้ำลาย
(10-50%)	1	ปริมาณเชื้อในน้ำลายต่ำ
(50-75%)	2	ปริมาณเชื้อในน้ำลายสูง
(มากกว่า 75%)	3	ปริมาณเชื้อในน้ำลายสูงมาก



รูปที่ 13 แสดงจำนวนเชื้อ *S. mutans* เจริญบนอาหาร MSA

6.2 การตรวจหาจำนวน Lactobacilli ในน้ำลาย

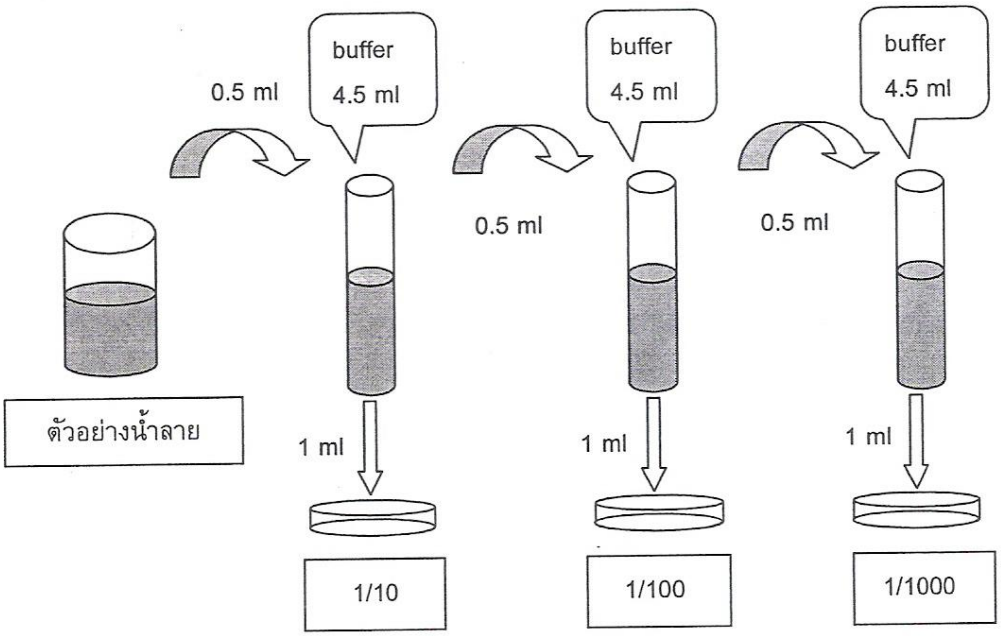
Lactobacilli spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรค ฟันผุ แม้ว่าจะพบเชื้อนี้ในคราบจุลินทรีย์น้อยกว่า 1% แต่กลับมีบทบาทมากต่อการลุกลามของฟันที่ผุและเป็นรูแล้ว (Cavity) สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับฟันผุคือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* โดยสามารถสร้างกรด (Acidogenic) และทนต่อกรด (Aciduric) ได้ และชอบอยู่ในที่ไร้ออกซิเจน ดังนั้นการเพาะเชื้อดังกล่าวจึงต้องอาศัยอาหารที่มีความเป็นกรดสูง เช่น Rogosa media ซึ่งมี acetic acid มาก และเลี้ยงเชื้อในสภาวะ anaerobic

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Parafilm และ Beaker สำหรับเก็บน้ำลาย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Rogosa SL agar
3. Sterile pipette, Sterile test tube และ Culture dish
4. Water bath, anaerobic box และ incubator

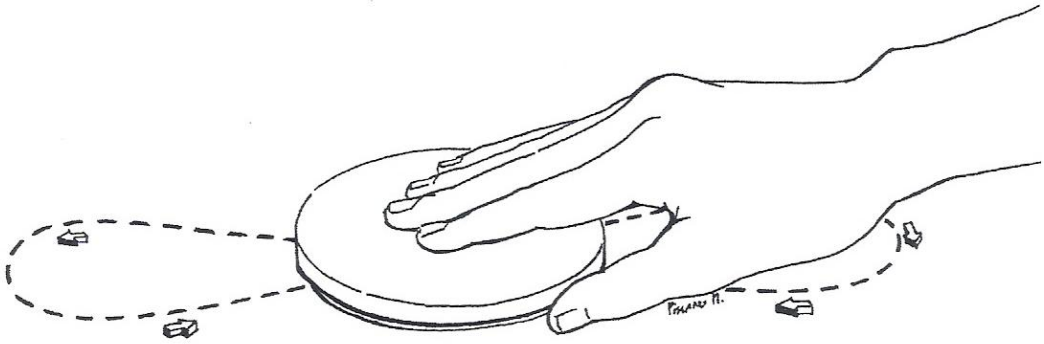
วิธีทดลอง

1. เก็บตัวอย่างน้ำลาย โดยให้อมชิ้น Parafilm ไว้ในปากจนอ่อนตัว กลืนน้ำลายให้หมด แล้วจึงเริ่มเคี้ยว ให้เคี้ยวเป็นเวลา 1 นาที ระหว่างนั้นให้บ้วนน้ำลายใส่ Beaker
2. ทำ ten fold serial dilution ดังรูปที่ 7 โดยใช้ pipette ดูดตัวอย่างน้ำลาย 0.5 ml ผสมกับ phosphate buffer pH 7.1 ปริมาณ 4.5 ml เขย่าให้เข้ากัน จะได้น้ำลายที่มีความเข้มข้น 1/10 ของน้ำลายตั้งต้น
3. ทำ dilution ซ้ำด้วยวิธีการเดิม จะได้น้ำลายที่มีความเข้มข้นเป็น 1/100 ของน้ำลายตั้งต้น และทำซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้น้ำลายที่มีความเข้มข้น 1/1000 ของน้ำลายตั้งต้น
4. ใช้ pipette ดูดตัวอย่างน้ำลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ 1 ml ใส่ลงใน culture dish



รูปที่ 14 การทำ ten fold serial dilution

5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ rogosa SL agar ที่ยังอยู่ในสภาพของเหลว ประมาณ 20 ml ลงในแต่ละ plate ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากับน้ำลายที่ใส่ไว้ โดยหมุน plate เป็นรูปเลข 8 ประมาณ 10 รอบ ดังรูปที่ 8



รูปที่ 15 การผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับน้ำลายโดยหมุนถาดเป็นรูปเลขแปด

6. ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วจึงนำไปใส่ใน Anaerobic box ที่มี Gas pak แล้วนำเข้าตู้เลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน
7. นับจำนวน colony ใน Plate เป็นค่า cfu/ml และต้องนำค่า Dilution มาคำนวณกลับด้วย โดยถาดเลี้ยงเชื้อที่เหมาะกับการนับจำนวนเชื้อควรมีจำนวน Colony ระหว่าง 30-300 Colony

หมายเหตุ *ถ้าเทคนิคปฏิบัติการไม่ปลอดเชื้อ อาจมีเชื้อราขึ้นได้ โดยจะสังเกตเห็นเป็น Colony สีขาวฟูๆ บนฝาของถาดเลี้ยงเชื้อ เวลานับโคโลนีจึงให้นับเฉพาะที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นโคโลนีของแลคโตแบซิลัสจริง ๆ*

เทคนิคการเลือกนับโคโลนี และคำนวณกลับ

1) ดูจากถาดที่ความเข้มข้นน้ำลาย 1/1000 ก่อน ถ้าจำนวนโคโลนี เกิน 300 หรือมีมาก จนนับไม่ได้ แสดงว่าปริมาณเชื้อมีมากกว่า 1 แสน cfu/ml ก็แปลว่า High risk
2) กรณีที่มีหลายถาดซึ่งนับโคโลนีได้ 30-300 ก็ให้เลือกถาดที่น้ำลายถูก dilute มากที่สุด ก็คือ ความเข้มข้นของน้ำลายน้อยที่สุด ที่ยังนับโคโลนีได้ เพราะจะได้ค่าที่ถูกต้องมากกว่า ตัวอย่างเช่น ถาดเข้มข้น 1/10 นับได้ 295 โคโลนี ในขณะที่ ถาดเข้มข้น 1/100 นับได้ 50 โคโลนี ถาด 1/1000 มีแค่ 5 โคโลนี ก็ให้ใช้ค่าจากถาด 1/100 คำนวณกลับ ดังนี้ 50 โคโลนี x dilution 100 = 5000 โคโลนี ซึ่งมาจากน้ำลายตั้งต้น 0.5 ml ดังนั้นต้องการคำนวณ cfu ต่อน้ำลาย1 ml ก็คือ 5000 x 2 = 10,000 โคโลนี ซึ่งถือว่า Slight caries risk ตามตาราง

การแปลผล

จำนวน Lactobacilli (cfu/ml)	Score	Caries activity
ปริมาณเชื้อ < 1,000	0	Light or none
1,000 < ปริมาณเชื้อ < 10,000	1	Slight
10,000 < ปริมาณเชื้อ < 100,000	2	Moderate
100,000 < ปริมาณเชื้อ < 1,000,000	3	High

รูปที่ 16 ลักษณะโคโรนีเจริญบนอาหาร Rogosa agar ที่เจือจางลง 10 เท่า 100 เท่า และ 1000 เท่า

ปฏิบัติการที่ 6.3 : การวัดอัตราการสร้างกรดอันเนื่องจากแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์

Snyder's Test เป็นการวัดอัตราการสร้างกรดของจุลินทรีย์ในช่องปากกลุ่มที่เป็น acidogenic microorganism เมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ indicator คือ bromcresol green ซึ่งผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากสีเขียว pH 4.7 – 5.0 ให้เปลี่ยนเป็นสีเหลือง pH 4.0

Modified Snyder's Test

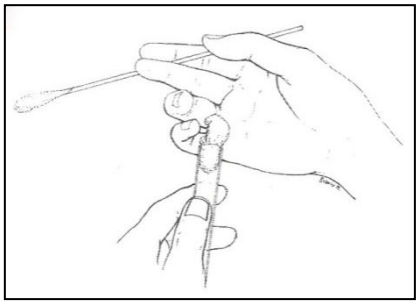
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ไม้พันสำลีฆ่าเชื้อแล้ว
2. หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Snyder's

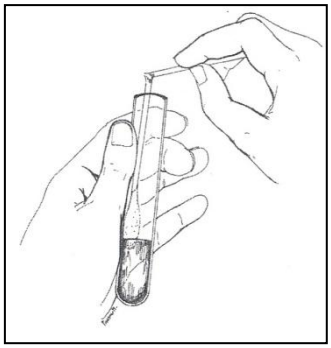
วิธีทดลอง

1. ใช้ไม้พันสำลีป้ายบริเวณด้าน buccal ของฟันทั้ง 4 quadrant เพื่อกวาดคราบ biofilm ที่เกาะอยู่ออกมา

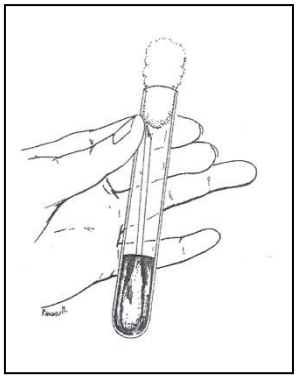
2. นำไม้พันสำลีใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Snyder's ซึ่งอยู่ในสภาพ semi fluid หมุนไม้พันสำลี 5 รอบ หักส่วนปลายของไม้ที่ใช้มือจับทิ้ง ปิดจุกหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้อย่างเดิม ดังภาพ



1) ถือไม้พันสำลีด้วยนิ้วโป้ง นิ้วชี้ และนิ้วกลางดังภาพ จากนั้นเอาจุกสำลีออก โดยใช้นิ้วก้อยเกี่ยวสำลีที่ปิดจุกหลอด



2) ใส่ไม้พันสำลีลงในหลอดแล้วหักปลายไม้ส่วนเกินทิ้ง



3) ปิดจุกสำลีไว้ดังเดิม สังเกตว่าส่วนของสำลีซึ่งมีคราบจุลินทรีย์จุ่มอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. นำเข้าตู้เลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 37 °C บันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน
4. บันทึกผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบันทึกระยะเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการสร้างกรด

การแปลผล

Caries Activity	**การเปลี่ยนแปลง**		
	24 ชั่วโมง	**48 ชั่วโมง**	**72 ชั่วโมง**
Marked	**เปลี่ยนสีสีเขียวเป็นสีเหลือง**		
Moderate	ไม่เปลี่ยน	**เปลี่ยนสีเขียวเป็นสีเหลือง**	
Slight	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	**เปลี่ยนสีเขียวเป็นสีเหลือง**
Negative	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน

แบบบันทึกผลปฏิบัติการที่ 6.1-6.3

ชื่อ.....เลขประจำตัว.....

Number of mutans streptococci

ความหนาแน่นของจำนวน mutans streptococci ……%

Score: _____ แปลผลว่า _____

Number of *Lactobacilli spp*

ความหนาแน่นของจำนวน Lactobacilli……cfu/ml

แปลผลว่า _____

Modified Snyder's Test

ชั่วโมง	สีของ Modified Snyder Media
24 ช.ม.	
48 ช.ม.	
72 ช.ม.	

แปลผลได้ว่า.....

จากผลการทดลอง จงอภิปรายว่า ท่านคิดว่า ท่านเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุมากน้อยเพียงใด และท่านคิดว่ามีปัจจัยอย่างอื่น ๆ อะไรบ้างที่จะช่วยประเมินความเสี่ยง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

เอกสารอ้างอิง

เกษร เทพแปง. ความปลอดภัยทางชีวภาพของการทำงานในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Biosafety). (แหล่งที่มา URL: http://www.oshthai.org/phocadownload/biosafety.pdf)

กรมควบคุมมลพิษ. แนวทางการจัดการของเสียจากห้องปฏิบัติการ.

กรมส่งเสริมความปลอดภัยและอนามัยในการทำงาน. ความปลอดภัยในอุตสาหกรรม.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คู่มือแนวปฏิบัติที่ดีด้านการจัดการสารเคมีและของเสียอันตราย.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ระบบการจัดการความปลอดภัยสารเคมีและของเสียอันตราย. (แหล่งที่มา URL: http://chemtreck.chula.ac.th)

ชลภัทร สุขเกษม และ สุชาดา โทผล. 2553. มาตรการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับนักวิจัย (ทางชีวการแพทย์). (แหล่งที่มา URL: http://www.tci-thaijo.org/index.php/sdust/article/view/5220)

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี. การจัดการอันตรายจากสารเคมี. ประกาศกระทรวงมหาดไทย. 2534. ความปลอดภัยในการทำงานเกี่ยวกับสารเคมีอันตราย. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 108 ตอนที่ 167 ลงวันที่ 24 กันยายน 2534.

มหาวิทยาลัยมหิดล. แนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ. (แหล่งที่มา URL: http://mahidol.ac.th/green/pdf/Biosafety.pdf)

วราภรณ์ กัลยาเลิศ. 2545. ป้ายกับสารเคมีอันตรายกับความหมาย. วารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม ปีที่ 25 ฉบับที่ 2.

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. คู่มือความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ.

Navazesh M and Kumar SKS. Measuring salivary flow rate: challenges and opportunities. JADA. 2008; 139 (suppl2): 35s-40s.

Wiener RC, Wu B, Crout R, Wiener M, Plassman B, Kao E, McNeil D. Hyposalivation and xerostomia in dentate older adults. J Am Dent Assoc. 2010 Mar;141(3):279-84.

http://sea.gcasiadental.com/Products/19/Prevention/GC-Tri-Plaque-ID-Gel

Kohler B, Bratthall D, Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* and levels in saliva. Journal of Clinical Microbiology. 9 (3):584-588, 1979.

Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for Streptococcus mutans and lactobacillus infection. Journal of Clinical Microbiology 7 (1):82-83, 1978.

Nemmurugommula N, Arun A, Mythri H. Caries activity tests. Research and Review: Journal of Dental Science 1 (3);50-55, 2013.

Sim W. The interpretation and use of Snyder tests and lactobacillus count. Journal of American Dental Association 60 (6):1315-1319, 1970.

Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for *Streptococcus mutans* and lactobacillus infection. Journal of Clinical Microbiology 7 (1):82-83, 1978.

Nemmurugommula N, Arun A, Mythri H. Caries activity tests. Research and Review: Journal of Dental Science 1 (3);50-55, 2013.

Sebastian, ST. and Siddanna, S Total and free fluoride concentration in various brands of toothpaste marketed in India. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 9(10):ZC09-Zc12, 2015.

4. ประโยชน์ที่ได้รับและการนำไปประยุกต์ใช้ในงานอื่น ๆ

1. เมื่อนักศึกษามีความรู้และเข้าใจในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก สามารถนำไปตรวจหาเชื้อและสาเหตุการเกิดโรคในช่องปากได้
2. นักศึกษาเข้าใจกลไกการเกิดโรคฟันผุ สามารถป้องกันการเกิดโรคได้อย่างถูกต้อง และสามารถนำไปเผยแพร่แก่ประชาชนได้
3. นักศึกษาทันตแพทย์เมื่อจบการศึกษาไปสามารถนำความรู้ไปต่อยอดการศึกษาในระดับที่สูงขึ้น ปริญญาโทและปริญญาเอกได้
4. นักศึกษาทันตแพทย์สามารถนำความรู้ผลิตผลงานวิจัยใหม่ๆให้ทันสมัยตลอดเวลา
5. นักศึกษาทันตแพทย์สามารถนำความรู้ที่ได้ไปศึกษาเฉพาะทางได้ เช่น โรคปริทันต์และการป้องกันโดยใช้สมุนไพร การใช้ทรัพยากรธรรมชาติยับยั้งเชื้อก่อโรคฟันผุ เป็นต้น

5. สรุปจุดที่เป็นวิธีปฏิบัติที่เป็นแบบอย่างที่ดี

1. คู่มือปฏิบัติการทดลองรายวิชาชีววิทยาช่องปากและวิทยาการโรคฟันผุ เป็นแนวทางให้นักศึกษาทันตแพทย์ปฏิบัติการทดลองได้อย่างถูกต้อง สอดคล้องกับเป้าหมายในรายวิชา
2. คู่มือปฏิบัติการทดลองนี้นักศึกษาทันตแพทย์สามารถอธิบายแก่ผู้ป่วยหรือประชาชนทั่วไปให้เข้าใจและมีความรู้เกี่ยวกับโรคในช่องปากและวิธีป้องกันโรคในช่องปากได้อย่างถูกต้อง เพื่อลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคด้วย
3. คู่มือปฏิบัติการทดลองนี้เป็นแนวทางความรู้เชิงปฏิบัติการและวิเคราะห์ให้นักศึกษาทันตแพทย์รุ่นต่อๆไปได้ศึกษา

ภาคผนวก

วิดิโอประกอบการเรียนการสอนปฏิบัติการชีววิทยาช่องปากและวิทยาการโรคฟันผุ

การตรวจหาเชื้อ Lactobacilli

การตรวจหาเชื้อสร้างกรด

การตรวจหาเชื้อ S.mutans

การวัดปริมาณฟลูออไรด์