ว ทันต จุฬาฯ 2558;38:177-184
CU Dent J. 2015;38:177-184

บทวิทยาการ
Original Article

ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ ที่จัดเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์ในการแยกเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ในน้ำลายมนุษย์

บรรเจิด ยะพงศ์ วท.ม.
ศิษฎา ตันนุกิจ ปร.ด. (Craniofacial Biology), U. of Southern California, U.S.A.
สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์ ปร.ด. (Craniofacial Biology), U. of Southern California, U.S.A.

ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ ที่เตรียมเก็บไว้นาน 1, 3 และ 4 สัปดาห์

วัสดุและวิธีการ เก็บน้ำลายโดยใช้พาราฟินเป็นตัวกระตุ้นจากอาสาสมัคร 20 คน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ และ ไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ ที่เตรียมเก็บไว้นาน 1, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยวิธีสเปรดเพลท

ผลการศึกษา จำนวนมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 4 สัปดาห์ มีจำนวนเชื้อและลักษณะโคโลนีไม่แตกต่างกัน และไม่พบการเจริญของเชื้อสปีชีส์อื่น เชื้อที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแบซิทราซินมีจำนวนสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบซิทราซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุป อาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติของการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค

(ว ทันต จุฬาฯ 2558;38:177-184)

คำสำคัญ: *มิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค; ไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์; สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์*

ผู้รับผิดชอบบทความ บรรเจิด ยะพงศ์ bunjird.y@psu.ac.th

บทนำ

สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ *(Streptococcus mutans)* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกอยู่ในกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค (mutans streptococci) ที่มีบทบาทสำคัญในการเริ่มเกิดฟันผุ (Hamada and Slade, 1980) มีคุณสมบัติในการผลิตกรดได้มากและยังมีความสามารถในการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์นอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) จากการสลายน้ำตาลซูโครส สารนี้มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว มีทั้งแบบละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ สารที่ไม่ละลายน้ำจะทำหน้าที่คล้ายกาวยึดตัวมันเองและจุลินทรีย์ตัวอื่น ๆ ให้ติดกับผิวเคลือบฟัน มีผลให้จุลินทรีย์เหล่านี้รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (bacterial colonization) ซึ่งทำให้ผิวเคลือบฟันมีจุลินทรีย์มากขึ้น หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นแบคทีเรียตัวสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคฟันผุ (Tanzer et al., 2001; Emilson and Krasse, 1985; Loesche, 1986; Corby et al., 2005) และการนับจำนวนสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ประกอบการประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุของผู้ป่วยได้ (Kohler and Bratthall, 1979; Kohler et al., 1981; Beighton et al., 1991; Granath et al., 1993)

อาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ (Mitis salivarius agar; MS agar) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่ใช้แยกเชื้อ สเตร็ปโตคอคคัส สปีชีส์ การเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 และยาปฏิชีวนะแบซิทราซิน (bacitracin) 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ลงไปในไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ (Mitis salivarius bacitracin agar; MSB agar) การเติมแบซิทราซินจะไปยับยั้งการเจริญของสเตร็ปโตคอคไคตัวอื่น ๆ ในช่องปาก ยกเว้นเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค จึงใช้อาหารชนิดนี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะในการแยกเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคบางสายพันธุ์ เช่น สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัส *(Streptococcus sobrinus)* โดยเชื้อ 2 ชนิดนี้ สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ แต่จะได้โคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันคือ โคโลนีของสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์จะทึบ ผิวขรุขระ ไม่เรียบ ส่วนโคโลนีสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัสมักมีรูปร่างเป็นแฉก และมีวงขาวขุ่นล้อมรอบแต่เป็นลักษณะที่ไม่แน่นอน (Gold et al., 1973; Teanpaisan, 2009)

แต่อย่างไรก็ตาม บางครั้งก็ยากที่จะแยกโคโลนีได้ชัดเจน จึงมีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อตัวใหม่ขึ้นมา การศึกษาของ Wan และคณะในปี 2002 (Wan et al., 2002) ได้เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด รวมถึงไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ในการแยกเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทริปโตน ยีสต์ แอ็กแทร์ค ซิสติน อะการ์ ที่นำมาเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 และเติมแบซิทราซิน 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (TYCSB) ใช้แยกเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ดีกว่าไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อตัวอื่น ๆ (Wan et al., 2002)

ในปี 2005 Takada และ Hirasawa (Takada and Hirasawa, 2005) ได้ดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์โดยเติมซูโครสร้อยละ 10 แบซิทราซิน วาลิโนไมซิน (valinomycin) และซัลไฟซอกซาโซล (sulfisoxazole) (ได้เป็น MS-MUTV) เขาสรุปว่าจะสามารถใช้คัดแยกเชื้อเฉพาะสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์เท่านั้น

นอกจากนี้การศึกษาของ Saravia และคณะ ในปี 2011 (Saravia et al., 2011) ได้ค้นพบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซูโครส แบซิทราซิน (SB-20) แล้วดูความแตกต่างจากลักษณะโคโลนี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะได้โคโลนีของสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์มีผิวขรุขระ แวววเป็นประกาย ในขณะที่โคโลนีของสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัส มีลักษณะกลม ทึบแสง มีวงสีขาว ขุ่นล้อมรอบ ทำให้แยกโคโลนี ของเชื้อทั้ง 2 ออกจากกันได้ชัดเจน

อย่างไรก็ตามถึงแม้มีการคิดค้นอาหารเลี้ยงเชื้อมาหลายชนิด แต่บางชนิดเตรียมยาก ต้องผสมสารหลายอย่าง บางชนิดมีราคาแพง ทำให้ไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่ผสมซูโครสยังคงใช้กันอยู่ในงานประจำวัน เพราะยังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะสูงในการแยกเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค โดยเฉพาะสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์จะเจริญได้ดีในอาหารชนิดนี้ (Gold et al., 1973; Teanpaisan, 2009; Rosan et al. editors, 1998)

ปัจจุบันภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์รับผิดชอบการตรวจตัวอย่างน้ำลายจากคลินิกรวมโรงพยาบาลทันตกรรมโดยการตรวจหาค่าต่าง ๆ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรค

ฟันผุของผู้ป่วย เช่น การหาค่าอัตราการไหลของน้ำลาย (flow rate) การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) หาค่าการสะเทินกรดเบส (buffer capacity) รวมถึงการหาปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ ด้วย

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผลการทดลองที่ได้ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น เนื่องจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบ่อย ๆ ทำให้เสียเวลาและไม่สะดวก ทางห้องปฏิบัติการของภาควิชาฯ จะเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ใช้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วพร้อมใช้ไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส แต่จากการศึกษาของ Kohler และ Bratthall ในปี 1979 (Kohler and Bratthall, 1979) พบว่าการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ อาจทำให้ยาปฏิชีวนะแบซิทราซินที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเสื่อมสภาพ (degrade) เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้ออาจมีการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคชนิดอื่นที่ไม่ใช่มิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไคเกิดขึ้นได้ ทำให้ทางห้องปฏิบัติการไม่มั่นใจว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจะยังคงมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อได้ดีอยู่อีกหรือไม่

การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเชื้อในคลินิกที่ทำอยู่ในปัจจุบันใช้วิธีสปาตุลา (spatula method) (Kohler and Bratthall, 1979) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและทำได้ง่ายแต่ข้อเสียของวิธีนี้คือโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากและมีขนาดเล็ก การกระจายของเชื้อไม่ดีพอเนื่องจากไม่มีการเจือจางตัวอย่างน้ำลาย ถ้าหากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่มีประสิทธิภาพและเกิดการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคชนิดอื่นจะสังเกตได้ยากทำให้เกิดปัญหาการนับเชื้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้

การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเชื้อวิธีสเปรด เพลท (spread plate method) (Bratthall and Ericsson, 1994) เป็นวิธีที่ยุ่งยากกว่าวิธีสปาตุลา เนื่องจากต้องใช้สารเคมีและอุปกรณ์หลายชนิดแต่วิธีสเปรด เพลท ทำโดยการเจือจางตัวอย่างน้ำลายและทำในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดใหญ่กว่า ทำให้การกระจายของโคโลนีของเชื้อกระจายได้ดีกว่าและนับเชื้อได้ง่ายกว่า ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้วิธีสเปรด เพลท เพื่อดูประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ สำหรับแยกเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคในน้ำลาย หลังการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้นาน 3 และ 4 สัปดาห์ว่ายังคงมีประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อและคัดแยกเชื้อได้อย่างจำเพาะหรือไม่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ เพื่อจะได้วางแผนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำไปใช้ได้อย่างถูกต้อง ประหยัดเวลาในการเตรียมและให้ผลการนับเชื้อที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างน้ำลาย

การขอเก็บตัวอย่างน้ำลายจากผู้ป่วยคลินิกทันตกรรมพร้อมมูล (comprehensive clinic) และบุคคลทั่วไป ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยจะเก็บน้ำลายจากผู้ป่วยที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยให้ผู้ป่วยอมและเคี้ยวชิ้นพาราฟิน (paraffin wax) เป็นตัวกระตุ้นการหลั่งน้ำลาย เคี้ยวชิ้นพาราฟิน ติดต่อกันประมาณ 3 นาที ระหว่างนี้ให้บ้วนน้ำลายลงในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว การเก็บตัวอย่างน้ำลายต้องใช้วิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique)

การหาปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ ตัวอย่างน้ำลายที่เจือจางแล้วนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ (MSB : MS agar, Difco USA; bacitracin, Sigma USA; sucrose, Merck Germany) ที่เตรียมเก็บไว้นาน 1, 3 และ 4 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สัปดาห์ ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะแบซิทราซิน (MS agar) การเลี้ยงเชื้อจะใช้วิธีสเปรด เพลท (Bratthall and Ericsson, 1994) แต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นจะอบในตู้เลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบันทึกผลเป็นโคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิต ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) โดยเลือกนับเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้และมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี เปรียบเทียบจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเก็บไว้นานต่างกัน และดูว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคตัวอื่นหรือไม่ โดยการสังเกตจากลักษณะของโคโลนีและการทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมี

ใช้เข็มเขี่ยโคโลนีที่ต้องการทดสอบจุ่มลงไปตรงส่วนกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อซิสตีน ทริปติค อะการ์ (cystine tryptic agar) ผสม แมนนิทอล (manitol) ร้อยละ 1 จำนวน 1 หลอด และอาหารเลี้ยงเชื้อซิสตีน ทริปติค อะการ์ ผสม ซอร์บิทอล (sorbitol) ร้อยละ 1 อีก 1 หลอด นำเข้าตู้เลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากเชื้อมีการใช้น้ำตาลที่ทดสอบในแมทบอลิซึมของเชื้อจะผลิตกรดออกมา โดยอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ฟีนอล เรด (phenol red) จะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง (Saravia et al., 2011)

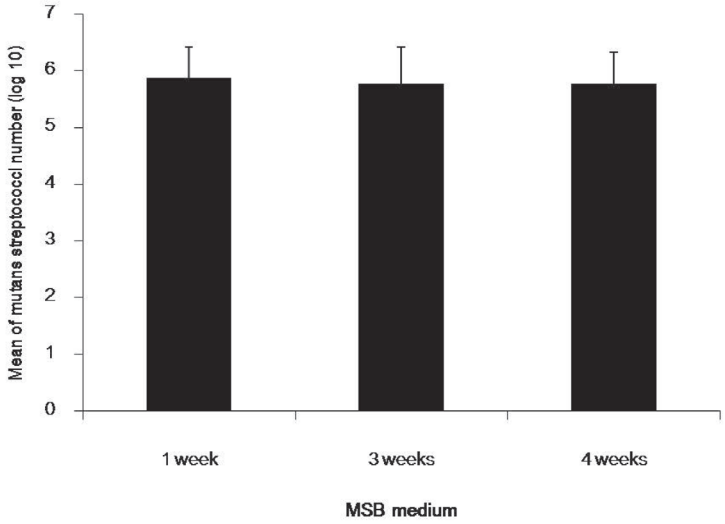
การทดสอบทางสถิติ

ทำการทดสอบการกระจายของข้อมูล โดยสถิติ Shapiro- Wilk ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นาน 1,3 และ 4 สัปดาห์ และใช้การทดสอบทีเทส (Independent-Samples T Test) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สัปดาห์ที่เติมแบซิทราซินกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สัปดาห์ที่ไม่เติมแบซิทราซิน โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญไว้ที่ $p<0.05$

ผลการศึกษา

เมื่อนำตัวอย่างน้ำลายที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้น 1:100 และ 1:1000 ด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 มาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นานเป็นเวลาแตกต่างกัน พบว่าค่าเฉลี่ยลอกการิซึมฐาน 10 ของจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้นาน 1, 3 และ 4 สัปดาห์ เป็น 5.87 ± 0.55, 5.77 ± 0.64 และ 5.76 ± 0.56 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ช่วงเวลามาวิเคราะห์ความแตกต่าง โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ช่วงเวลา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 1)

จากผลการทดลองพบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นานเป็นเวลา 1, 3 และ 4 สัปดาห์ จะมีลักษณะโคโลนีที่เหมือนกันเพียงชนิดเดียว คือ โคโลนีมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร โคโลนีมีผิวขรุขระคล้ายกระจกฝ้า เมื่อทำการทดสอบทางชีวเคมีพบว่า โคโลนีดังกล่าวสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลและซอร์บิทอล เนื่องจากพบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (Saravia et al., 2011; Rosan et al. editors, 1998)



รูปที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค (ลอกการิซึม ฐาน 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นาน 1, 3 และ 4 สัปดาห์

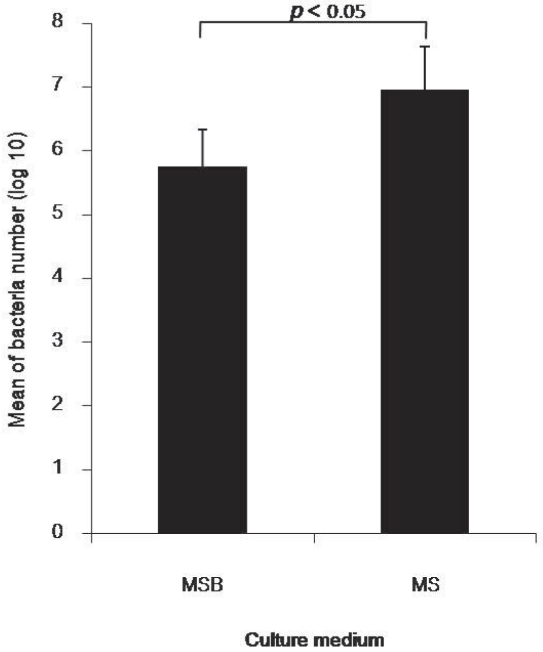
Fig. 1 Comparison of the mean ± SD of mutans streptococci number (log 10) on Mitis salivarius bacitracin agar that were stored for 1, 3 and 4 weeks.

ส่วนเชื้ออื่นในกลุ่มสเตร็ปโตคอคไคในช่องปาก เช่น สเตร็ปโตคอคคัส ซาลิวาเรียส *(Streptococcus salivarius)* สเตร็ปโตคอคคัส ไมติส *(Streptococcus mitis)* สเตร็ปโตคอคคัส แซนกวินิส *(Streptococcus sanguinis)* จะให้ผลเป็นลบ คือ ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอลและซอร์บิทอล ส่วนเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัส จะให้ผลบวก (เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ) กับน้ำตาลแมนนิทอล แต่จะให้ผลบวกกับซอร์บิทอลหรือไม่ก็ได้ขึ้นกับสายพันธุ์ (Saravia et al., 2011; Rosan et al. editors, 1998)

ค่าเฉลี่ยลอกการิธึมฐาน 10 ของจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแบซิทราซิน (MS agar) ที่เตรียมเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์ เป็น 5.76 ± 0.56 และ 6.96 ± 0.67 ตามลำดับ การทดสอบโดยใช้ทีเทส พบว่าจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 2) โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแบซิทราซินจะมีการเจริญของแบคทีเรีย มากกว่า 1 ชนิดและมีจำนวนเชื้อมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแบซิทราซิน เนื่องจากมีการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคตัวอื่นร่วมด้วย ซึ่งจะพบโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ลักษณะนูนโค้ง เป็นยางเหนียว เยิ้ม และบางโคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ผิวขรุขระ ลักษณะแห้ง ติดผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งโคโลนีพวกนี้ เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีจะไม่ใช้น้ำตาลแมนนิทอลและซอร์บิทอล

วิจารณ์

จากผลการทดลอง พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นาน 1, 3 และ 4 สัปดาห์ จะพบเชื้อเพียงชนิดเดียว โคโลนีที่พบมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร โคโลนีมีผิวขรุขระคล้ายกระจกฝ้า จากการดูลักษณะรูปร่างโคโลนีและทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเป็นคุณสมบัติของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์จำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เวลา 1, 3 และ 4 สัปดาห์ จะมีจำนวนเชื้อใกล้เคียงกัน เมื่อนำค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ (log 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ช่วงเวลา มาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อในอาหารทั้ง 3 ช่วงเวลาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ ที่



รูปที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนแบคทีเรีย (ลอกการิธึมฐาน 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์กับไมติส ซาลิวาเรียล อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์

Fig. 2 Comparison of the mean ± SD of bacteria number (log 10) on MSB and MS agar that were stored for 4 weeks.

เก็บนาน 3 และ 4 สัปดาห์ ยังคงมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อดีอยู่ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส อะการ์ที่ไม่เติมแบซิทราซิน และเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์จะมีการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคหลายสปีชีส์และมีจำนวนมากกว่า พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งโคโลนีเหล่านี้เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีจะไม่ใช้น้ำตาลแมนนิทอล และซอร์บิทอล จำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแบซิทราซินและเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์ จะมีจำนวนเชื้อที่แตกต่างกัน เมื่อนำค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ (log 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ทีเทส พบว่า จำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแบซิทราซินจะมีจำนวนมากกว่า เนื่องจากมีการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคหลายสปีชีส์

การทดลองครั้งนี้ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Kohler และ Bratthall ในปี 1979 (Kohler and Bratthall, 1979) ซึ่งแนะนำว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เก็บไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้ออาจมีการปนเปื้อนของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคตัวอื่นที่ไม่ใช่กลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค เนื่องจากมีการเสื่อมสภาพ (degrade) ของยาปฏิชีวนะแบซิทราซินทำให้ต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบ่อย ๆ โดยปกติแล้ว สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัสเป็นเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ แต่ไม่พบมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคตัวอื่น ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์จะไปกดการเจริญเติบโตของสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัสมากกว่าสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (Gold et al., 1973; Takada and Hirasawa, 2005; Rosan et al. editors, 1998)

เหตุผลอีกอย่างที่ไม่พบเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัสจากการทดลองครั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเจือจางตัวอย่างน้ำลายก่อนนำมาสเปรดเพลททำให้จำนวนเชื้อน้อยลงประกอบกับการเจริญได้ไม่ดีเท่าสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจึงทำให้ไม่พบเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัส หากทดลองกับน้ำลายที่ไม่ได้เจือจาง อาจพบเชื้อมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคตัวอื่นด้วยก็ได้

การศึกษาของ Svanberg และ Krasse ในปี 1990 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ และทริปโตน ยีสต์ แอ็กแทร็ค ซิสติน อะการ์จะมีความไวและความจำเพาะในการคัดแยกเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ดี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Svanberg and Krasse, 1990; Schaeken et al., 1986)

การศึกษาของ Saravia และคณะในปี 2011 และ 2013 (Saravia et al., 2011; Saravia et al., 2013) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์และอาหารเลี้ยงเชื้อซูโครส แบซิทราซิน (SB-20) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์จะได้จำนวนเชื้อสเตร็ปคอคคัส มิวแทนส์ มากกว่า สเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัส ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อซูโครส แบซิทราซิน จะได้จำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัสมากกว่า และสามารถแยกลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ได้ชัดเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อซูโครส แบซิทราซิน การจำแนกชนิดของเชื้อโดยดูจากลักษณะรูปร่างของโคโลนี และดูผลการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์จะผลิตกรดจากการใช้น้ำตาลแมนนิทอล ซอร์บิทอล แลคโตส ทนต่อแบซิทราซิน และไม่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขณะที่สเตร็ปโตคอคคัส ซอบรินัสจะผลิตกรดจากน้ำตาลแมนนิทอล แลคโตสอาจใช้หรือไม่ใช้น้ำตาลซอร์บิทอลขึ้นกับสายพันธุ์ และผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Saravia et al., 2011; Saravia et al., 2013)

อย่างไรก็ตามไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ก็ยังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อหลักที่ใช้ในการแยกเชื้อมิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไค และมีความจำเพาะสูงในการแยกเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เนื่องจากเป็นเชื้อที่ทนต่อแบซิทราซินได้สูง และสามารถเจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของซูโครสร้อยละ 20 ได้ดี (Gold et al., 1973; Rosan et al. editors, 1998) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นาน 3 และ 4 สัปดาห์ ยังคงมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อมิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะได้จำนวนเชื้อไม่แตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเก็บไว้ 1 สัปดาห์ จึงไม่จำเป็นต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกสัปดาห์ ทำให้ประหยัดเวลาในการทำงานมากขึ้น โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงเดือนละ 1 ครั้ง แต่ต้องเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียลเป็นอย่างดี เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของยาปฏิชีวนะแบซิทราซิน

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไมติสซาลิวาเรียส แบซิทราซิน อะการ์ที่เตรียมเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์ยังคงมีประสิทธิภาพในการแยกเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคในน้ำลายมนุษย์และยังสามารถแยกเชื้อได้อย่างจำเพาะโดยไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อสเตร็ปโตคอคไคตัวอื่น และให้ผลการนับเชื้อที่เชื่อถือได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณกองทุนเฉลิมพระเกียรติ 100 ปี สมเด็จย่า คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย และคุณไตรรัตน์ มีเดช ที่ให้คำปรึกษาทางด้านสถิติในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Beighton D, Hellyer PH, Lynch EJ, Health MR. Salivary levels of mutans streptococci, lactobacilli, yeasts and root caries prevalence in non-institutionalized elderly dental patients. Commun Dent Oral Epidemiol. 1991;19:302-7.

Bratthall D, Ericsson D. Tests for assessment of caries risk. In: Thylstrup A, Fejerskov O, editors. Textbook of clinical cariology. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard, 1994:341-4.

Corby PM, Lyons-Weifes J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial Risk Indicators of Early childhood Caries. J Clin Microbiol. 2005;43:5753-9.

Emilson CG, Krasse B. Support for and implications of the specific plaque hypothesis. Scand J Dent Res. 1985;93:96-104.

Gold OG, Jordan HV, van Houte JV. A selective medium for *Streptococcus mutans.* Arch Oral Biol.1973;18:1357-64.

Granath LP, Cleaton-Jones LP, Grossma ES. Prevalence of dental caries in 4 to 5 years old children partly explained by presence of salivary mutans streptococci. J Clin Microbiol. 1993;31:66-70.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans.* Microbial Rev. 1980;44:331-84.

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

Kohler B, Pettersson B, Bratthall D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. Scand J Dent Res. 1981;89:19-25.

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

Rosan B. The Streptococci. In: Nisengard RJ, Newman MG, editors. Oral microbiology and immunology. 2nd ed. W.B. Saunders Company, 1998:129-46.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LA, da Silva RA, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans and S. Sobrinus* on modified SB-20 culture medium. Microbiol Res. 2011;166:63-7.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RA, Rossi AD, Faria G, Silva LA, et al. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar medium. Arch Oral Biol. 2013;58:311-6.

Schaeken MJM, van der Hoeven JS, Franken HCM. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. J Dent Res. 1986;65:906-8.

Svanberg M, Krasse B. Comparative recovery of mutans streptococci on two selective media. Caries Res. 1990;24:36-8.

Takada K, Hirasawa M. A novel selective medium for isolation of *Streptococcus mutans.* J of Microbiol Methods. 2005;60:189-93.

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

Teanpaisan R. Aerobic gram positive bacteria. In : Bacteria and common infectious diseases in the oral cavity. IQ media Songkhla, 2009:58-68.

Wan AKL, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans.* Australian Dental Journal. 2002;47:21-6.

Efficiency of Mitis salivarius bacitracin agar stored for 4 weeks for isolation of mutans streptococci from human saliva.

Bunjird Yapong M.Sc.
Sissada Tunnukit Ph.D. (Craniofacial Biology), U. of Southern California, U.S.A.
Suwanna Jitpukdeebodintra Ph.D. (Craniofacial Biology), U. of Southern California, U.S.A.

Department of Oral Biology and Occlusion, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University

Abstract

Objective The aim of this study was to compare the efficiency of Mitis salivarius bacitracin agar that were stored for 1,3 and 4 weeks

Materials and methods The paraffin stimulated saliva samples were collected from 20 individuals. The samples were plated onto MSA and MSB media that were stored at 4°C for 1, 3 and 4 weeks by spread plate method.

Results The viable count of mutans streptococci on Mitis salivarius bacitracin agar medium that were stored at 4°C for 1, 3 and 4 weeks were not significantly different. Mutans streptococci grown on these media displayed typical colony morphology and there was no outgrowth of other species. The viable count of bacteria was significantly higher in Mitis salivarius agar media without bacitracin than those with bacitracin media ($p<0.05$).

Conclusion Mitis salivarius bacitracin agar medium containing high sucrose (20%) can be stored at 4°C for as long as 4 weeks without losing selectivity for mutans streptococci groups.

(CU Dent J. 2015;38:177-184)

Key words: *Mitis-salivarius-bacitracin agar; mutans streptococci; Streptococcus mutans*

Correspondence to Bunjird Yapong, bunjird.y@psu.ac.th