



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9
The 9th STOU National Research Conference

การยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ATCC 19433 และสายพันธุ์
ที่มีและไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงที่แยกได้จากการรักษาลงรากฟันล้มเหลว

Cell Adherence and Internalization of *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 and
Hemolytic/Non-hemolytic Isolated from Failed Root Canal Treated Teeth

อุมาพร พรหมแก้ว (Umaporn Phromkaew)¹ เกวลิณ ธรรมสิทธิ์บุรณ์ (Kewalin Thammasitboon)²

รวี เถียรไพศาล (Rawee Teanpaisan)³

บทคัดย่อ

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) เป็นเชื้อที่พบบ่อยในการรักษาลงรากฟันที่ล้มเหลว โดยการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้ออาจเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญในการก่อโรคต่างๆ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* ระหว่างสายพันธุ์ ATCC 19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิก และสายพันธุ์ที่มีและไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งศึกษาโดยเพาะเลี้ยง *E. faecalis* ATCC 19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิก และนำมาทดสอบการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ด้วยวิธี Microplated-based cell invasion assay ผลการศึกษาพบว่า *E. faecalis* ATCC 19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกสามารถยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและ *E. faecalis* กลุ่ม hemolytic สามารถเข้าสู่เซลล์และเกาะติดเซลล์โดยรวมได้สูงกว่ากลุ่ม non-hemolytic (69.70 ± 0.13 และ 29.05 ± 0.57 , 83.19 ± 0.62 และ 75.24 ± 0.48 ตามลำดับ) ($p < .001$) ในขณะที่พบว่าเชื้อกลุ่ม hemolytic สามารถเกาะติดเซลล์ภายนอกได้น้อยกว่ากลุ่ม non-hemolytic (13.49 ± 0.51 และ 46.19 ± 0.87 ตามลำดับ) ($p < .001$) อาจเป็นไปได้ว่าการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* ที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงอาจมีความสำคัญในการก่อโรคซึ่งอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ เอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส เซลล์เคอราติโนไซต์ การยึดเกาะ การเข้าสู่เซลล์ การสลายเม็ดเลือดแดง

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ Baby_k_hwan@hotmail.com

² ผศ.ดร. เกวลิณ ธรรมสิทธิ์บุรณ์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ Kewalin.t@psu.ac.th

³ ศ.ดร. รวี เถียรไพศาล ภาควิชาโสตศอนาสิก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ Rawee.t@psu.ac.th



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

Abstract

Enterococcus faecalis is one of the predominant bacteria in persistent endodontic infections. Cell adherence and internalization by microorganisms has been reported to play a role in evasion from host defense, leading to persistence of infection. This study aimed to compare the ability in cell adherence and internalization between *E. faecalis* ATCC 19433 and clinical strains and between hemolytic and non-hemolytic clinical strains. *E. faecalis* ATCC 19433 and clinical strains were cultured with keratinocyte cells. Cell adherence and internalization were examined by using microplated-based cell invasion assay. The results showed that cell adherence and internalization of *E. faecalis* ATCC 19433 and clinical strains was not significantly different. Hemolytic strains produced significantly higher cell internalization and total cell adhesion (69.70 ± 0.13 and 29.05 ± 0.57 , 83.19 ± 0.62 and 75.24 ± 0.48 , respectively) ($p < .001$) compared with non-hemolytic strains. However hemolytic strains showed lower cell externalization (13.49 ± 0.51 and 46.19 ± 0.87 , respectively) ($p < .001$) than non-hemolytic strains. In summary, ability in cell adhesion and internalization of hemolytic and non-hemolytic *E. faecalis* strains were different which might be associated with their pathogenicity. Further study is needed.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Keratinocyte cells, Adherence, Cell internalization, Hemolytic



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

บทนำ

จากหลักฐานงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสาเหตุหลักของความล้มเหลวในการรักษาคอลงรากฟัน คือ เชื้อจุลชีพ ซึ่งจุลชีพเหล่านี้สามารถพบได้ทั้งในคอลงรากฟันหลักและส่วนอื่นๆของระบบคอลงรากฟันที่มีความซับซ้อน โดยตำแหน่งของเชื้อที่เข้าถึงได้ยากและการที่เชื้อสามารถสร้างคราบจุลินทรีย์ในรูปแบบของ biofilm อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยป้องกันเชื้อเหล่านี้จากเครื่องมือทำความสะอาดคอลงรากฟัน ยาปฏิชีวนะ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำยาที่ใช้ในการรักษาคอลงรากฟัน หรืออาจเกิดจากเชื้อนั้นๆมีศักยภาพในการก่อโรค (virulence) และมีเยื่อหุ้มที่มีความสามารถต้านต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกรณีการรักษาคอลงรากฟันล้มเหลว (Pinheiro et al., 2003; Sundqvist, Figdor, Persson, & Sjögren, 1998) โดยสามารถตรวจพบได้ร้อยละ 24 - 70 จากวิธีการศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและร้อยละ 77 จากวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006) เมื่อพิจารณาจากข้อมูลพบว่า คุณสมบัติเฉพาะตัวหลายประการของ *E. faecalis* เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ *E. faecalis* มีชีวิตรอดจากกระบวนการรักษาคอลงรากฟันและสภาวะที่เปลี่ยนแปลงของคอลงรากฟันภายหลังการรักษา ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ความสามารถในการตั้งถิ่นฐานในรูปแบบของ biofilm (Distel, Hatton, & Gillespie, 2002), ความสามารถในการแทรกซึมเข้าไปในเนื้อฟัน (Love, 2001), ความทนต่อสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เช่น ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (Evans, Davies, Sundqvist, & Figdor, 2002) หรือในสภาวะขาดอาหาร, ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ใหม่เมื่อได้รับอาหารและมีสภาวะเหมาะสม (Figdor, Davies, & Sundqvist, 2003; Sedgley, Lennan, & Appelbe, 2005) และความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่เดี่ยวๆโดยไม่ต้องอาศัยปัจจัยส่งเสริมจากเชื้อชนิดอื่นๆ

เชื้อ *E. faecalis* มีปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ที่มีความรุนแรงที่สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันได้ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปัจจัยก่อโรคของ *E. faecalis* มีความสัมพันธ์กับยีนต่างๆ ได้แก่ ยีนที่ส่งเสริมการเกาะติดกับเซลล์โฮสต์ เช่น *esp* (protein surface), *ace* (collagen binding protein) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่ม เช่น *asa/asa373* (aggregation substances) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน เช่น *cylA* (hemolysin activator) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์แล้วมีผลทำให้เกิดการติดเชื้อได้ดีขึ้น เช่น *gelE* (gelatinase) และยีนที่เกี่ยวข้องกับ adherence factor เช่น *efaA* (antigen endocarditis) รวมถึงความสามารถในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรค โดยการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับเซลล์เจ้าบ้าน นับว่าเป็นกระบวนการเริ่มแรกในการเกิดพยาธิสภาพของการติดเชื้อต่างๆ รวมถึงการรุกรานของแบคทีเรีย (internalization) เข้าสู่ non phagocytes cells จัดเป็นกลไกก่อให้เกิดโรคที่สำคัญ เนื่องจากเมื่อมีการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์จะพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนและย่อยสลาย host cells หรือในทางกลับกัน เชื้อสามารถหยุดการเจริญเติบโตชั่วคราวได้ใน cytoplasm กรณีที่มีการคงอยู่ของเชื้อแบคทีเรียซึ่งหลบซ่อนอยู่ในเซลล์อาจทำให้เกิดการกำเริบของโรคขึ้นมาได้ในภายหลัง

ปัจจัยก่อโรค Hemolysin หรือ Cytolysin จัดเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรคที่สำคัญที่ทำให้เชื้อสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและทำลายเซลล์เจ้าบ้านได้ และยังเป็นพิษต่อเซลล์บางชนิด โดยสามารถตรวจพบปัจจัยก่อโรค Hemolysin ได้ใน *E. faecalis* บางสายพันธุ์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Huycke, Spiegel, & Gilmore (1991) แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ *E. faecalis* กลุ่มที่มีความสามารถ Cytolysin ได้ร้อยละ 45 จาก *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก 190 สายพันธุ์และจาก



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

การศึกษาของ Ike, Hashimoto, & Clewell (1987) สามารถตรวจพบ *E. faecalis* กลุ่มที่มีความสามารถ Cytolysin ได้ร้อยละ 60 จาก *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก 97 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยก่อโรค Hemolysin สามารถทำให้เชื่อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้มากขึ้น การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ที่สลายเม็ดเลือดแดงได้จะมีความรุนแรงในการก่อโรคมกกว่าสายพันธุ์ที่ไม่สลายเม็ดเลือดแดง (Van Tyne, Martin, & Gilmore, 2013; Zhu, Wang, Zhang, Cheung, & Shen, 2010) โดยจากการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง (Jett, Jensen, Nordquist, & Gilmore, 1992; Miyazaki et al., 1993) และการศึกษาทางคลินิก (Huycke et al., 1991; Ike et al., 1987) พบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงกับการเพิ่มขึ้นของการเป็นพิษและความรุนแรงในการอักเสบ จากการศึกษาของ Lu et al. (2015) เมื่อจำลองการติดเชื้อบริเวณปลายรากฟันในหนูทดลอง พบว่า cytolytic *E. faecalis* จะมีความสามารถในการสร้าง IL-1 β และ MMP-8 ได้มากกว่า non-cytolytic *E. faecalis*

จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าเชื้อ *E. faecalis* มีความสามารถในการยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์ได้ เช่น renal cells, enterocytes, epithelial cell from colon โดยลักษณะดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อสามารถหลบหลีกเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและยาปฏิชีวนะได้ อีกทั้งยังช่วยให้การก่อโรคเกิดได้ง่ายขึ้น จากความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์อาจเป็นไปได้ว่ามีส่วนสำคัญช่วยทำให้เชื้อ *E. faecalis* ที่พบภายในคลองรากฟันใช้กลไกเหล่านี้ในการก่อโรคและสร้างความล้มเหลวในการรักษาคคลองรากฟัน โดยการติดเชื้อภายในคลองรากฟันด้วยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยึดเกาะและการรุกรานเข้าสู่เซลล์นั้นอาจทำให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะและขั้นตอนการรักษาคคลองรากฟันที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการกำจัดเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังมีข้อมูลไม่มากนักในการศึกษาการยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* กับเซลล์ต่างๆภายในช่องปากของมนุษย์ รวมถึงเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *E. faecalis* ระหว่างสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงและสายพันธุ์ที่ไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงในการการยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติม และเนื่องจาก Human keratinocyte cell เป็นเซลล์เยื่อผิวป้องกันด่านแรกของระบบ innate immune ในช่องปาก ในการติดต่อกับสิ่งแปลกปลอมภายนอกกับภายในร่างกายที่เชื้อจะสามารถเข้าไปยึดเกาะได้และมีโอกาสที่จะเป็นจุดเริ่มต้นในการที่เชื้อจะเข้าไปยัง dental pulp cell และ periodontal ligament cell และทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อในและเกิดรอยโรครอบปลายรากฟันได้ ดังนั้นการทราบถึงความสามารถของ *E. faecalis* ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ต่างๆภายในช่องปากจะสร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสาเหตุ และบทบาทการติดเชื้อของ *E. faecalis* ในพื้นที่มีการรักษาคคลองรากฟันล้มเหลวและจะได้นำไปสู่การพัฒนากระบวนการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* ระหว่างสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line H357)
2. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* ระหว่างกลุ่ม hemolytic และ non-hemolytic ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line H357)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

1.1. นำเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) และ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิก (จำนวน 20 สายพันธุ์ จากผู้ป่วย 9 ราย แบ่งเชื้อเป็นกลุ่ม hemolytic และ non-hemolytic กลุ่มละ 10 สายพันธุ์) ออกจากตู้เก็บ -80 °C โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อต่อจากโครงการเรื่อง ความชุกของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟิคาลิสในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคอนโรกฟันที่มีรอยโรคปลายรากฟันด้วยวิธี real-time quantitative PCR (qPCR) และการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ EC6110-36-P-LR

โดยกลุ่มผู้ป่วยในโครงการดังกล่าวเป็นผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาคอนโรกฟันเข้าแบบ non-surgical โดยมารับการรักษา ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคลินิกหรือโรงพยาบาลใกล้เคียงในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเมษายน 2562 โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยดังนี้

1. เป็นฟันที่มีการสร้างรากฟันเสร็จสมบูรณ์
2. เป็นฟันที่ได้รับการรักษาคอนโรกฟันเสร็จเรียบร้อยแล้วไม่น้อยกว่าหนึ่งปี
3. ฟันที่ได้รับการรักษาคอนโรกฟันดังกล่าวมีรอยโรคบริเวณปลายรากฟัน โดยที่มีหรือไม่มีอาการทาง

คลินิก

4. เป็นฟันที่สามารถใส่แผ่นยางกันน้ำลายได้อย่างเหมาะสม
5. เป็นฟันที่ไม่มี periodontal pocket (pocket depth $\leq$ 4 mm)

เกณฑ์การคัดผู้ป่วยออกจากการศึกษา คือ ฟันที่ไม่มีการบูรณะในส่วนตัวฟัน

1.2. นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาปริมาณ 5 ไมโครลิตร มา dot ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Blood agar (BA) จากนั้น streak เชื้อเพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ทำการเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง

1.3. ใช้ loop ตตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-5 โคโลนี นำมาใส่ในหลอดเซนต์ปีร์กที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain heart infusion (BHI) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง

1.4. ปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน DMEM โดยเปรียบเทียบกับความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 จะได้เชื้อ ปริมาณเท่ากับ 10^8 CFU/ml

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ keratinocyte cell line H357

2.1. เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ Keratinocyte H357 ซึ่งมาจากเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากของคน (oral squamous cell carcinoma) เลี้ยงด้วยอาหารสำหรับเคอราติโนไซต์ (keratinocyte growth medium; KGM) ประกอบด้วยอาหารหลัก 3 ต่อ 1 ของ DMEM และ Ham's F-12 เสริมด้วย epidermal growth factor (10 ng/ml) hydrocortisone (0.5 ug/ml) และ fetal bovine serum 10% ทำการบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C มีความชื้น และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเมื่อเซลล์มีปริมาณ 80-90% ของภาชนะ



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

2.2. ทำการถ่ายเซลล์ keratinocyte cell line H357 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมแบบกันแบน จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 วัน ในบรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์ 95% คาร์บอนไดออกไซด์ 5% หรือจนกว่าเซลล์จะมีปริมาณร้อยละ 90-95 ของภาชนะ

3. ทดสอบความสามารถในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกต่อ keratinocyte cell line H357

(การศึกษามีการทดลอง 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งการทดลอง ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

3.1 การทดสอบหาปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ตั้งต้น

3.1.1 ทำการนับโคโลนีเริ่มต้นของเชื้อที่ทำทดสอบ โดยดูดสารละลายเชื้อ *E. faecalis* ที่ปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน DMEM โดยเปรียบเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร มาทำ ten-fold serial dilution ด้วย PBS ปริมาณ 180 ไมโครลิตร

3.1.2 นำแต่ละความเข้มข้นที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร มาเพาะเลี้ยงบน Blood agar (BA) ด้วยวิธี dot plate นำเพลทเข้าบ่มในสภาวะ anaerobic incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* และจดบันทึกผลเป็นค่า A_0

3.2 การทดสอบการเกาะติดเซลล์โดยรวม (total adhesion)

3.2.1 เติมเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกที่เตรียมไว้แล้วในขั้นตอนปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมที่มีเซลล์ที่ต้องการทดสอบ (โดยในขั้นตอนนี้จะเตรียมเชื้อที่บ่มร่วมกับเซลล์เหมือนกัน 2 ชุด) จากนั้นทำการบ่มเซลล์และเชื้อทั้ง 2 ชุด เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C

3.2.2 เมื่อครบเวลานำเซลล์ทั้ง 2 ชุด มาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เพื่อล้างเชื้อที่ไม่เกาะเซลล์ออก จากนั้นแบ่งเซลล์ 1 ชุด มาทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่สามารถเกาะติดเซลล์ โดยการเติม PBS ร่วมกับ 0.05% trypsin-EDTA 1 มิลลิลิตรทุกหลุม เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นของหลุมเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียในเซลล์ โดยทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย PBS ปริมาณ 180 ไมโครลิตร นำแต่ละความเข้มข้นที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร มาทำการเพาะเลี้ยงบน Blood agar (BA) ด้วยวิธี dot plate นำเพลทเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 24 ชั่วโมง

3.2.3 นับจำนวนโคโลนีและจดบันทึกผลเป็นค่า A_1 เพื่อนำมาคำนวณค่า total adhesion ของเชื้อตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Total adhesion} = (\log A_1 / \log A_0) \times 100$$

3.3 การทดสอบการเข้าสู่เซลล์ (internalization)

3.3.1 นำเซลล์ชุดที่ 2 หลังจากล้างเซลล์ตามขั้นตอน มาทำการเติมยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ ที่ละลายด้วย DMEM ในแต่ละหลุม หลุมละ 1 มิลลิลิตร เพื่อฆ่าเชื้อที่เกาะอยู่บริเวณรอบๆผิวเซลล์ บ่มเซลล์ต่อในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C

3.3.2 จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วจึงเติม PBS ร่วมกับ 0.05% trypsin-EDTA 1 มิลลิลิตรทุกหลุม และนำมาเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ด้วย PBS ปริมาณ 180 ไมโครลิตร นำแต่ละความเข้มข้นที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร มาเพาะเลี้ยงบน Blood agar (BA) ด้วยวิธี dot plate นำเพลทเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 24 ชั่วโมง



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

3.3.3 นับจำนวนโคโลนีและจดบันทึกผลเป็นค่า A_2 เพื่อนำมาคำนวณค่า internalization ของเชื้อตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Internalization} = (\log A_2 / \log A_0) \times 100$$

3.4 การทดสอบการเกาะติดเซลล์ภายนอก (externalization)

ค่าการเกาะติดเซลล์ภายนอกสามารถคำนวณได้จาก

$$\% \text{ Externalization} = \% \text{ Total adhesion} - \% \text{ Internalization}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ : เปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* ระหว่างสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิก และเปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกระหว่างกลุ่ม hemolytic และ non-hemolytic ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

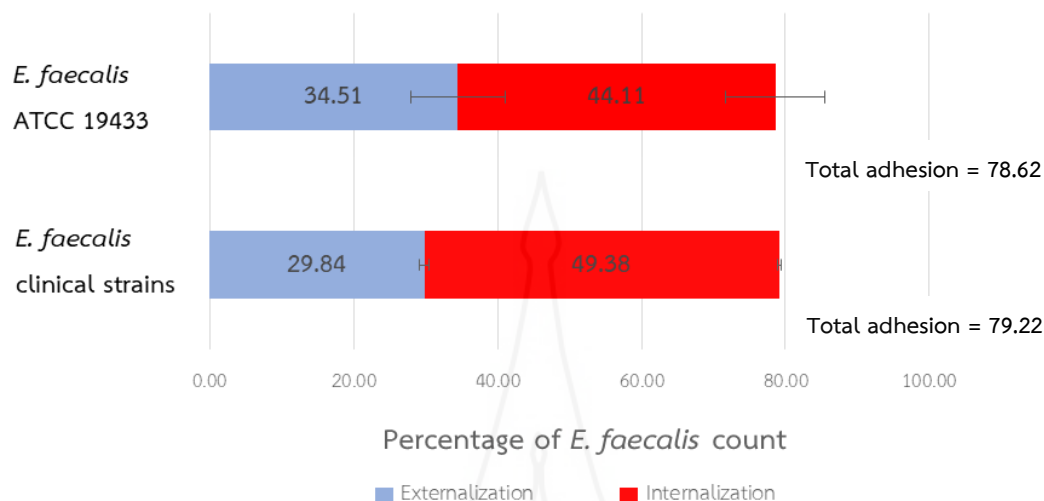
การศึกษาความสามารถของ *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line; H357)

จากผลการทดลองพบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC19433) และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิก (20 สายพันธุ์) มีความสามารถในการเกาะติดและการเข้าสู่เซลล์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC19433) และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกสามารถเกาะติดเซลล์ได้โดยรวม (total adhesion) เป็นร้อยละ 78.62 ± 0.71 และ 79.22 ± 0.38 ตามลำดับ ($p = .089$) และเมื่อพิจารณาความสามารถในการเกาะติดเซลล์ภายนอก (externalization) พบว่ามีค่าร้อยละ 34.51 ± 6.61 และ 29.84 ± 0.61 ตามลำดับ ($p = .817$) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ (internalization) มีค่าร้อยละ 44.11 ± 6.92 และ 49.38 ± 0.26 ตามลำดับ ($p = .950$) (ภาพที่ 1)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference



ภาพที่ 1 ความสามารถของ *E. faecalis* ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line; H357)

ตารางที่ 1 คำนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* ระหว่างสายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC19433) และสายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกในการเกาะติดเซลล์โดยรวม (total adhesion) การเกาะติดเซลล์ภายนอก (externalization) และการเข้าสู่เซลล์ (internalization)

Type of <i>E. faecalis</i>	Total adhesion	Externalization	Internalization
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	78.62±0.71 %	34.51±6.61 %	44.11±6.92 %
<i>E. faecalis</i> Clinical strains	79.22±0.38 %	29.84±0.61 %	49.38±0.26 %
Mann-Whitney U test: P-value	.089	.817	.950

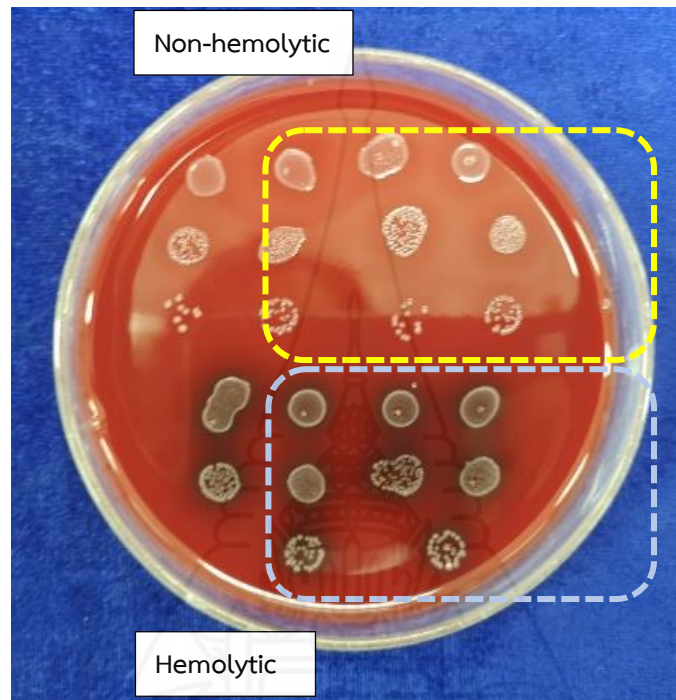
การศึกษาความสามารถของ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกระหว่างกลุ่ม non-hemolytic และกลุ่ม hemolytic ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line; H357)

เมื่อเปรียบเทียบ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกระหว่างกลุ่ม non-hemolytic (10 สายพันธุ์) และกลุ่ม hemolytic (10 สายพันธุ์) (รูปที่ 2) พบว่าความสามารถในการเกาะติดและการเข้าสู่เซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยพบว่าเชื้อ *E. faecalis* กลุ่ม non-hemolytic และกลุ่ม hemolytic สามารถเกาะติดเซลล์ได้โดยรวม (total adhesion) ร้อยละ 75.24±0.48 และร้อยละ 83.19±0.62 ตามลำดับ ($p < .001$) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ (internalization) พบว่ามีค่าร้อยละ 29.05±0.57 และร้อยละ 69.70±0.13 ตามลำดับ ($p < .001$) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาความสามารถในการเกาะติดเซลล์ภายนอก (externalization) พบว่ามีค่าร้อยละ 46.19±0.87 และร้อยละ 13.49±0.51 ตามลำดับ ($p < .001$) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *E. faecalis* กลุ่มที่มีความสามารถในการสลายเม็็ดเลือดแดงจะมีความสามารถในการเกาะติดเซลล์โดยรวม (total adhesion) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (internalization)

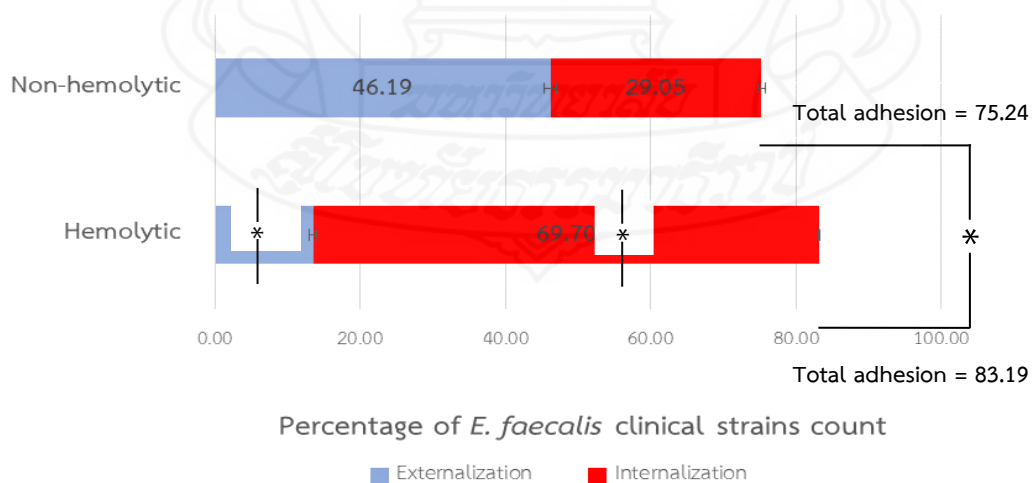


การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9
The 9th STOU National Research Conference

ได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ในขณะที่พบว่าเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงจะสามารถเกาะติดเซลล์ภายนอก (externalization) ได้น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิก: non-hemolytic และ hemolytic



* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .001$)

ภาพที่ 3 ความสามารถของ *E. faecalis* กลุ่ม non-hemolytic และ hemolytic ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line; H357)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

ตารางที่ 2 คำนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกระหว่างกลุ่ม hemolytic และ non-hemolytic ในการเกาะติดเซลล์โดยรวม (total adhesion) การเกาะติดเซลล์ภายนอก (externalization) และการเข้าสู่เซลล์ (internalization)

Type of <i>E. faecalis</i>	Total adhesion	Externalization	Internalization
Hemolytic <i>E. faecalis</i> (n=10)	83.19±0.62	13.49±0.51	69.70±0.13
Non-hemolytic <i>E. faecalis</i> (n=10)	75.24±0.48	46.19±0.87	29.05±0.57
Mann-Whitney U test: P-value	.000	.000	.000

อภิปรายผลการวิจัย

สาเหตุสำคัญของการอักเสบของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันรวมถึงสาเหตุของความล้มเหลวในการรักษาลงรากฟันคือ เชื้อแบคทีเรีย โดยผลของกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรานั้นๆ จะส่งผลให้เกิดการอักเสบที่เรื้อรังที่ทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อในและกระดูกรอบปลายรากฟัน จากการศึกษาพบว่า *E. faecalis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกรณีการรักษาลงรากฟันล้มเหลวซึ่งสามารถตรวจพบได้ร้อยละ 24 - 77 (Pinheiro et al., 2003; Stuart et al., 2006; Sundqvist et al., 1998) โดยเชื้อ *E. faecalis* มีปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ที่หลากหลายซึ่งมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันได้

ความสามารถในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อที่มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพและโรคต่างๆ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน (ATCC 19433) และ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกจากฟันที่มีการรักษาลงรากฟันล้มเหลวมีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์โดยรวม (total adhesion) ความสามารถเกาะติดภายนอกเซลล์ (externalization) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell line H357) (internalization) ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *E. faecalis* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีปัจจัยที่ใช้ในการยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์คล้ายคลึงกันจึงทำให้ไม่พบความแตกต่างในการทดลองซึ่งอาจต้องยืนยันในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป จากการศึกษาของ Kreft, Marre, Schramm, & Wirth (1992) ซึ่งทำการศึกษาศักยภาพในการยึดเกาะของ *E. faecalis* ต่อ renal tubular cell โดยแบ่งกลุ่มเชื้อ *E. faecalis* ศึกษาตามลักษณะ phenotype ของยีน AS (aggregation substances) ด้วยวิธี ELISA-based adherence studies และ microscopic studies ผลการศึกษาพบว่า *E. faecalis* ที่มีลักษณะการแสดงออกในความสามารถของยีน AS ที่แตกต่างกันจะทำให้มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ได้แตกต่างกันด้วย โดย *E. faecalis* ที่มีระดับการแสดงออกในความสามารถของยีน AS ที่สูง จะสามารถยึดเกาะเซลล์ได้ดีกว่า *E. faecalis* ที่มีระดับการแสดงออกในความสามารถของยีน AS ที่ต่ำลงมากหรือ *E. faecalis* ที่ไม่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวเลย ดังนั้นยีน AS จึงอาจช่วยส่งเสริมความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ enterococcal กับ renal cells ซึ่งความสามารถในการยึดเกาะเซลล์นี้อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อต่อไปได้ การศึกษาดังกล่าวใช้วิธีศึกษาที่แตกต่างจากงานวิจัยครั้งนี้โดยที่งานวิจัยนี้ใช้วิธี microplated-based cell invasion assay และใช้ *E. faecalis* คนละสาย



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

พันธุกรรมในการศึกษา และจากการศึกษาของ Wells et al. (2000) พบว่าการที่เชื้อ *E. faecalis* มียีน AS ก็จะช่วยส่งเสริมให้เชื้อสามารถยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์ enterocytes ได้ โดยลักษณะดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เชื้อสามารถหลบหลีก host immune cells และยาปฏิชีวนะได้

Hemolysin หรือ cytotoxin เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญชนิดหนึ่งของ *E. faecalis* โดยการที่ *E. faecalis* มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้นั้น อาจทำให้ *E. faecalis* สามารถย่อยสลายเซลล์นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจได้ ซึ่งถือเป็นการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกทางหนึ่ง (Miyazaki et al., 1993) จากการศึกษาของ N.P.A, Dewiyan, & Ashari (2013) พบว่าสามารถตรวจพบยีน hemolysin ของเชื้อ *E. faecalis* จากตัวอย่างภายในคลองรากฟันได้ร้อยละ 56.7 และในน้ำลายได้ร้อยละ 63.3 จากการศึกษาของ Endo et al. (2015) พบว่าในกรณีการรักษาคลองรากฟันล้มเหลวสามารถตรวจพบยีน hemolysin ของเชื้อ *E. faecalis* ได้ร้อยละ 16.6 และการศึกษาของ Sedgley et al. (2005) พบยีน hemolysin ได้ร้อยละ 18 รวมถึงการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรงพยาบาลในประเทศญี่ปุ่นพบว่าร้อยละ 60 ของ *E. faecalis* ที่ตรวจพบมีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Ike et al., 1987)

จากการศึกษาของ Zhu et al. (2010) พบว่าในกรณี persistent endodontic infection สามารถตรวจพบ *E. faecalis* กลุ่มที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง และนอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมา ก็ตรวจพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *E. faecalis* กับความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรงขึ้นของเชื้อ (Van Tyne et al., 2013) โดยจากการศึกษาของ Huycke et al. (1991) พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ cytolytic *E. faecalis* จะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ non-cytolytic *E. faecalis* ประมาณ 5 เท่า รวมถึงการศึกษาของ Chow et al. (1993) ซึ่งศึกษาใน rabbit endocarditis พบว่าการติดเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มียีน cytotoxin ร่วมกับ aggregation จะมีโอกาสตายถึงร้อยละ 55 ในทางกลับกันกลุ่มที่มีการติดเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มียีน aggregation เพียงอย่างเดียวพบว่ามีโอกาสตายร้อยละ 15 โดยผลจากการศึกษาวิจัยนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกได้ทางคลินิกระหว่างกลุ่มที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic) และกลุ่มที่ไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolytic) ในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์พบว่ากลุ่ม hemolytic มีความสามารถในการเกาะติดเซลล์โดยรวม (total adhesion) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ (internalization) ได้ดีกว่ากลุ่ม non-hemolytic อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อพิจารณาการยึดเกาะภายนอกเซลล์ (externalization) พบว่าเชื้อกลุ่ม hemolytic สามารถเกาะติดเซลล์ได้น้อยกว่ากลุ่ม non-hemolytic อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อในกลุ่ม hemolytic เมื่อยึดเกาะเซลล์แล้วจะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า จึงพบปริมาณเชื้อที่หลุดเกาะอยู่ภายนอกเซลล์ลดลง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการกล่าวถึงกลไกในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อว่าส่วนของ integrins อาจจะเป็นตำแหน่งสำคัญที่ช่วยในการยึดเกาะของ eukaryotic cell กับเชื้อแบคทีเรีย (Kreft et al., 1992) โดยจากการศึกษาพบว่า *E. faecalis* สามารถยึดเกาะกับ macrophages ผ่านการทำงานร่วมกันระหว่าง AS และ $\beta 2$ -integrins (Rakita et al., 1999; Schlievert et al., 1998; Süssmuth et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าโมเลกุลของ fibronectin ก็มีส่วนช่วยส่งเสริมในการยึดเกาะของเชื้อกับ epithelial cells (Hynes, 1982) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kintarak, Whawell, Speight, Packer, & Nair (2004) ซึ่งศึกษาเชื้อ *S. aureus* กับเซลล์เคอราติโนไซต์พบว่ากระบวนการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ของ *S. aureus* จะเกิดผ่านการทำงานร่วมกันระหว่าง fibronectin-binding protein ของแบคทีเรียและ integrins



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

$\alpha 5\beta 1$ ของเซลล์เจ้าบ้าน โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้มีจุดสังเกตที่น่าสนใจคือ เชื้อ *E. faecalis* กลุ่มที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงจะมีความสามารถในการเกาะติดเซลล์โดยรวม (total adhesion) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เคอราติโนไซต์ (internalization) ได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Goldmann, Tuschscherr, Rohde, & Medina (2016) ซึ่งพบว่าเชื้อ *S. aureus* ที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (α -hemolysin) จะมีความสามารถมากขึ้นในการยึดเกาะ การเข้าสู่เซลล์และการอยู่รอดใน mast cell โดยจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงจะมีการแสดงออกที่มากขึ้นของ fibronectin-binding protein และ $\beta 1$ -integrins และพบว่าความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงจะกระตุ้นให้มีการตอบสนองผ่านทาง ADAM10 receptor ซึ่งการส่งสัญญาณผ่านตัวรับดังกล่าวจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ chemokine-induced signaling, adhesion, cytoskeletal rearrangement และ integrin up-regulation และส่งผลในท้ายที่สุดทำให้เชื้อสามารถยึดเกาะและเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น จากผลการศึกษาดังกล่าวอาจจะเป็นการแสดงให้เห็นว่าการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* ที่มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงอาจมีความสำคัญในการก่อโรค โดยอาจส่งผลให้เชื้อมีศักยภาพในการก่อโรค (virulence factor) ที่รุนแรงขึ้น และอาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาลงรากฟันซึ่งอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาวิจัยนี้ การทราบและเข้าใจความสามารถในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *E. faecalis* จะเป็นประโยชน์ต่อการเข้าใจกลไกการเกิดพยาธิสภาพ และการดำเนินของรอยโรคปลายรากฟันได้ใกล้เคียงความเป็นจริงมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการรักษาลงรากฟันและการเลือกใช้ยาหรือสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้นในอนาคต เพื่อจะได้กำจัดเชื้อที่มีความรุนแรงและมีความสามารถในการก่อโรคที่สูงได้ขึ้นและลดโอกาสที่จะเกิดความล้มเหลวในการรักษาลงรากฟัน

ข้อเสนอแนะ

จากข้อจำกัดในการศึกษาวิจัยนี้อาจทำให้การศึกษาต่อไปมีการศึกษาโดยเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างของ *E. faecalis* clinical strains ให้มากขึ้น และศึกษาเพิ่มเติมในการนำเชื้อ *E. faecalis* clinical strains ทั้งกลุ่ม hemolytic และ non-hemolytic มาตรวจสอบยีน hemolysin รวมถึงยีนอื่นๆ ที่เป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ *E. faecalis* clinical strains ทั้ง 2 กลุ่ม มีความสามารถในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ได้แตกต่างกัน

รวมถึงอาจศึกษาโดยนำความสามารถในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* ไปเชื่อมโยงกับระดับความรุนแรงในการอักเสบบริเวณปลายรากฟัน เช่น ขนาดของรอยโรคปลายราก การมีรูเปิดตุ่มหนอง ระดับอาการปวด และการติดตามการหายของรอยโรครอบปลายรากฟัน เป็นต้น นอกจากนี้อาจนำเชื้อมาศึกษาเพิ่มเติมในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์กับเซลล์อื่นๆ ด้วย เช่น human periodontal ligament cells และ human dental pulp cells และศึกษาเชิงลึกต่อไปในการทำความเข้าใจกระบวนการกลไกของเชื้อในการยึดเกาะและการเข้าสู่เซลล์



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

เอกสารอ้างอิง

- Chow, J. W., Thal, L. A., Perri, M. B., Vazquez, J. A., Donabedian, S. M., Clewell, D. B., & Zervos, M. J. (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(11), 2474–2477. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.11.2474>
- Distel, J. W., Hatton, J. F., & Gillespie, M. J. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of Endodontics*, 28(10), 689–693. <https://doi.org/10.1097/00004770-200210000-00003>
- Endo, M. S., Signoretti, F. G. C., Kitayama, V. S., Marinho, A. C. S., Martinho, F. C., & Gomes, B. B. P. F. de A. (2015). Investigation in vivo of *Enterococcus faecalis* in endodontic retreatment by phenotypic and genotypic methods. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 37(1), 95. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v37i1.24348>
- Evans, M., Davies, J. K., Sundqvist, G., & Figdor, D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 35(3), 221–228.
- Figdor, D., Davies, J. K., & Sundqvist, G. (2003). Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(4), 234–239.
- Goldmann, O., Tuchscher, L., Rohde, M., & Medina, E. (2016). α -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin: Role of Hla in *S. aureus* -mast cells interactions. *Cellular Microbiology*, 18(6), 807–819. <https://doi.org/10.1111/cmi.12550>
- Huycke, M. M., Spiegel, C. A., & Gilmore, M. S. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(8), 1626–1634. <https://doi.org/10.1128/aac.35.8.1626>
- Hynes, R. O. (1982). Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 95(2), 369–377. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.2.369>
- Ike, Y., Hashimoto, H., & Clewell, D. B. (1987). High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(8), 1524–1528.
- Jett, B. D., Jensen, H. G., Nordquist, R. E., & Gilmore, M. S. (1992). Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infection and Immunity*, 60(6), 2445–2452.
- Kintarak, S., Whawell, S. A., Speight, P. M., Packer, S., & Nair, S. P. (2004). Internalization of *Staphylococcus aureus* by Human Keratinocytes. *Infection and Immunity*, 72(10), 5668–5675. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5668-5675.2004>



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

- Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., & Wirth, R. (1992). Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infection and Immunity*, 60(1), 25–30.
- Love, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis*—A mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal*, 34(5), 399–405.
- Lu, B., Zhang, J., Huang, X., Xiao, S., Zhang, M., & Cai, Z. (2015). Expression of Interleukin-1 β and Matrix Metalloproteinase-8 in Cytolytic and Noncytolytic *Enterococcus faecalis*-induced Persistent Apical Periodontitis: A Comparative Study in the Rat. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1288–1293. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.019>
- Miyazaki, S., Ohno, A., Kobayashi, I., Uji, T., Yamaguchi, K., & Goto, S. (1993). Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiology and Immunology*, 37(4), 265–270.
- N.P.A, D. A., Dewiyani, S., & Ashari, D. S. (2013). Hemolysin activities as virulence factor of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and periapical abscess (gene detection by PCR). *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 46(1), 45. <https://doi.org/10.20473/j.djmk.v46.i1.p45-49>
- Pinheiro, E. T., Gomes, B. P. F. A., Ferraz, C. C. R., Sousa, E. L. R., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2003). Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 36(1), 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x>
- Rakita, R. M., Vanek, N. N., Jacques-Palaz, K., Mee, M., Mariscalco, M. M., Dunny, G. M., ... Simon, S. I. (1999). *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infection and Immunity*, 67(11), 6067–6075.
- Schlievert, P. M., Gahr, P. J., Assimacopoulos, A. P., Dinges, M. M., Stoeher, J. A., Harmala, J. W., ... Dunny, G. M. (1998). Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infection and Immunity*, 66(1), 218–223.
- Sedgley, C. M., Lennan, S. L., & Appelbe, O. K. (2005). Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *International Endodontic Journal*, 38(10), 735–742. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.01009.x>
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., & Sjögren, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 85(1), 86–93.



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 9

The 9th STOU National Research Conference

- Süssmuth, S. D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R., & Rozdzinski, E. (2000). Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infection and Immunity*, 68(9), 4900–4906. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.4900-4906.2000>
- Van Tyne, D., Martin, M. J., & Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5(5), 895–911. <https://doi.org/10.3390/toxins5050895>
- Wells, C. L., Moore, E. A., Hoag, J. A., Hirt, H., Dunny, G. M., & Erlandsen, S. L. (2000). Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infection and Immunity*, 68(12), 7190–7194.
- Zhu, X., Wang, Q., Zhang, C., Cheung, G. S. P., & Shen, Y. (2010). Prevalence, Phenotype, and Genotype of *Enterococcus faecalis* Isolated from Saliva and Root Canals in Patients with Persistent Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, 36(12), 1950–1955. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.053>

