



ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cyIA* กับฟีโนไทป์ของยีน *cyIA* ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส
สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายราก

The Association Between *cyIA* Gene and Its Phenotype in *Enterococcus faecalis* Isolated
from Failed Root Canal Treated Teeth with Periradicular Lesions

หทัยภัทร วงศ์หิรัญเดชา (Hataipath Wonghirandecha)¹ เกวลิณ ธรรมสิทธิบุรณ์ (Kewalin Thammasitboon)²

รวี เถียรไพศาล (Rawee Teanpaisan)³

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีน *cyIA* รวมถึงตรวจหาฟีโนไทป์ของยีนดังกล่าว และตรวจหาการแสดงออกของยีน *cyIA* นอกจากนี้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cyIA* กับฟีโนไทป์ของยีน *cyIA* ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส (*Enterococcus faecalis*) สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายรากจากผู้ป่วย 11 ราย จำนวน 49 สายพันธุ์ โดยตรวจหายีน *cyIA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ค่าการแสดงออกของยีน *cyIA* ตรวจสอบด้วยวิธี real-time quantitative PCR นอกจากนี้ฟีโนไทป์ของยีน *cyIA* ตรวจสอบจากการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดผสมเลือด ผลการศึกษาตรวจพบยีน *cyIA* 45 จาก 49 สายพันธุ์ (ร้อยละ 91.8) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติครัสคัลวอลิสพบว่า ค่าการแสดงออกของยีน *cyIA* ของเชื้อ *E. faecalis* ที่แสดงลักษณะ band เข้มจะมีค่ามากกว่ากลุ่มที่แสดงลักษณะ band อ่อนและกลุ่มไม่มียีน *cyIA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p=0.000$) สอดคล้องกับเชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cyIA* ที่แสดงลักษณะ band เข้มทั้ง 13 สายพันธุ์ (ร้อยละ 26.5) สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทั้งหมด ในขณะที่เชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cyIA* ที่แสดงลักษณะ band อ่อนและไม่มียีนดังกล่าว 36 สายพันธุ์ (ร้อยละ 73.5) จะไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติไคสแควร์พบว่า *E. faecalis* ที่มียีน *cyIA* ที่แสดงลักษณะ band เข้มจะมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p=0.000$) จึงมีความเป็นไปได้ว่า ยีน *cyIA* และฟีโนไทป์ของยีนชนิดนี้อาจมีความเกี่ยวข้องในการนำไปสู่การติดเชื้อภายในคลองรากฟัน แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องยีนและฟีโนไทป์ของยีนชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย เพื่อเป็นข้อมูลนำร่องที่จะช่วยให้เกิดความเข้าใจเบื้องต้นในกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *E. faecalis* มากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ยีน *cyIA* การย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคอนกรูเมนต์ที่มีรอยโรคปลายราก

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ hatai_w@hotmail.com

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ kewalin.t@psu.ac.th

³ ศาสตราจารย์ ดร. คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ rawee.t@psu.ac.th



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

Abstract

The aim of this study was to investigate the presence of *cylA* gene and its phenotype in *Enterococcus faecalis* isolated from failed root canal treated teeth with periradicular lesions, as well as to determine the mRNA expression of *cylA*. Moreover, the study aimed to evaluate the congruence between *cylA* and its phenotype. Forty-nine *E. faecalis* strains were included in this study. Presence of *cylA* has been analyzed by PCR. Real-time quantitative PCR has been used for determining expression of *cylA*. Furthermore, hemolysin activity was tested on blood agar. The results showed that *cylA* was detected in 45/49 strains (91.8%). The mRNA expression of *cylA* showing strong band characteristics was significantly higher than the *cylA* showing weak band characteristics and the absence of *cylA* ($p=0.000$, Kruskal-Wallis test). Beta-hemolysis was detected in 13/49 strains (26.5%) with the *cylA* showing strong band characteristics while non-hemolysis was detected in 36/49 strains (73.5%) with the *cylA* showing weak band characteristics and the absence of *cylA*. There was significant association between presence of *cylA* showing strong band features and beta-hemolysis ($p=0.000$, chi-square test). It is concluded that *cylA* and its phenotype in *E. faecalis* may also play a role in contribution to persistent root canal infections. However, further investigations are needed to examine other virulence genes and their phenotypes in *E. faecalis* for better understanding pathogenicity.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, *CylA* gene, Hemolysin activity, Failed root canal treated teeth with periradicular lesions



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

บทนำ

สาเหตุหลักของความล้มเหลวในการรักษาคคลองรากฟัน คือ การคงอยู่ของเชื้อในระบบคลองรากฟันและเนื้อเยื่อรอบรากฟัน (periradicular area) (Nair, Sjogren, Krey, Kahnberg, & Sundqvist, 1990) ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่คลองรากฟันภายหลังการรักษา (secondary infection) หรือการติดเชื้อยืดเยื้อ (persistent infection) ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่พบในฟันรักษารากแล้วเกิดความล้มเหลว มักพบเป็นเชื้อเดี่ยว (single species) ชนิดแกรมบวกที่ไม่ชอบออกซิเจน โดยเฉพาะเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) พบบ่อยที่สุด มีหลายการศึกษารายงานพบร้อยละ 24-77 (Fouad, Zerella, Barry, & Spangberg, 2005; Hancock, Sigurdsson, Trope, & Moiseiwitsch, 2001; Molander, Reit, Dahlen, & Kvist, 1998; Moller, 1966; Peculienė, Balciunienė, Eriksen, & Haapasalo, 2000; Pinheiro et al., 2003; Siqueira & Rocas, 2004; Sundqvist, Figdor, Persson, & Sjogren, 1998) เชื้อ *E. faecalis* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างหลากหลายแบบ เช่น รูปไข่ (ovoid), เดี่ยว (single), คู่ (pairs) และสายสั้น (short chains) สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยตนเอง และเพิ่มจำนวนในคลองรากฟันโดยไม่ต้องอาศัยแบคทีเรียชนิดอื่น (Moller, Fabricius, Dahlen, Sundqvist, & Happonen, 2004) ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนอาหารได้ สามารถแทรกซึมเข้าสู่ (invade) ท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) (Love, 2001) อีกทั้งยังสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นด่างสูง จึงต่อต้านแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) (Evans, Davies, Sundqvist, & Figdor, 2002) ดังนั้นการรักษาคคลองรากฟันด้วยวิธีทั่วไปจึงยากต่อการกำจัดแบคทีเรียชนิดนี้ (Molander et al., 1998)

การศึกษาก่อนหน้าได้ศึกษา ยีนของเชื้อ *E. faecalis* ที่พบบ่อยในคลองรากฟันที่ติดเชื้อ (infected root canals) ได้แก่ gelatinase gene (*gelE*), cytolysin activator gene (*cylA*), surface adhesins gene (*esp*), aggregation substance gene (*asa*) และ collagen binding antigen gene (*ace*) เป็นต้น (Kayaoğlu & Orstavik, 2004) ทั้งนี้ยีนทั้ง 5 ยีนล้วนมีฟีโนไทป์ที่สำคัญซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน และการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายราก หรืออาจมีผลเอื้อให้เชื้อ *E. faecalis* สามารถปรับตัวและดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานภายหลังการอุดคลองรากฟัน

สำหรับการศึกษาที่ผ่านมาได้ศึกษาเกี่ยวกับยีน *cylA* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารไฮโดไลซิน โดยมีบทบาทสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดผสมเลือด (blood agar) จึงจำแนกฟีโนไทป์ของเชื้อ *E. faecalis* เป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic strains) และสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (non-hemolytic strains) ซึ่งสารดังกล่าวช่วยให้เชื้อ *E. faecalis* สามารถปรับตัวมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไม่พึ่งออกซิเจน (anaerobe) รวมถึงเอื้อต่อการสร้างแผ่นคราบชีวภาพในคลองรากฟัน จึงอาจมีแนวโน้มที่จะเกิดการติดเชื้อเพิ่มขึ้น (Kayaoğlu & Orstavik, 2004) นอกจากนี้มีรายงานสนับสนุนว่า เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะต่อต้านยาปฏิชีวนะได้มากกว่าเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง อีกทั้งผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ถึง 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Huycke, Spiegel, & Gilmore, 1991)

อย่างไรก็ตาม การศึกษา ยีน *cylA* และฟีโนไทป์ของยีนดังกล่าวของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่แยกมาจากคลองรากฟันของฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายรากยังมีการศึกษาจำนวนน้อย รวมถึงผลการศึกษามีความแตกต่างกันและไม่ชัดเจนกล่าวคือ การศึกษาของ Barbosa-Ribeiro et al. (2016) ไม่พบยีน *cylA* ซึ่งตรงข้ามกับ



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

การศึกษาของ Zhu, Wang, Zhang, Cheung, and Shen (2010) พบยีน *cyfA* ถึงร้อยละ 100 บางการศึกษา Reynaud af Geijersstam et al. (2007) ศึกษาเฉพาะการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น ซึ่งพบเพียงร้อยละ 9 และบางการศึกษา Endo MS (2015) ตรวจพบยีน *cyfA* ร้อยละ 16.6 แต่ไม่ได้ศึกษาการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้มี การศึกษาของ Saffari, Dalfardi, Mansouri, and Ahmadrabji (2017) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cyfA* กับการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากตรวจพบ *cyfA* ร้อยละ 63.6 แต่กลับไม่พบการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งจะเห็นได้ว่า การศึกษายีน *cyfA* และฟิโนไทป์ของยีนดังกล่าวของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่แยกมาจากคลองรากฟันของฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายรากยังมีข้อมูลไม่เพียงพอ

ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเรื่องดังกล่าว โดยศึกษาทั้งการตรวจหายีน *cyfA* และการแสดงออกของยีนชนิดนี้ รวมถึงศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นฟิโนไทป์ของยีน *cyfA* นอกจากนี้ศึกษาว่า ยีน *cyfA* กับฟิโนไทป์ของยีนดังกล่าวของเชื้อ *E. faecalis* จะมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ เพื่อให้เกิดความเข้าใจเบื้องต้นในบทบาทของยีนก่อโรคและฟิโนไทป์ของยีนอย่างเป็นระบบมากขึ้น รวมถึงเข้าใจในกระบวนการก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นองค์ความรู้สำหรับการค้นคว้าวิธีการใหม่ และพัฒนาสารต้านจุลชีพที่สามารถกำจัดการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *E. faecalis* ได้อย่างตรงจุด รวมถึงสามารถวางแผนการรักษาที่เหมาะสมกับฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหายีน *cyfA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายราก
2. เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีน *cyfA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก
3. เพื่อตรวจหาฟิโนไทป์ของยีน *cyfA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cyfA* กับฟิโนไทป์ของยีนดังกล่าวของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก

ระเบียบวิธีวิจัย

1. คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ฟิโนไทป์ : ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ปรากฏให้เห็นได้โดยการควบคุมของยีน

2. การขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ EC6210-041 เมื่อวันที่ 8 ตุลาคม 2562

3. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายราก จำนวน 49 สายพันธุ์ ซึ่งโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้เรื่อง ความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายรากด้วยวิธี real-time quantitative PCR (qPCR) และเพาะเชื้อ ซึ่งเก็บตัวอย่างจากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวนทั้งหมด 49 สายพันธุ์ จากผู้ป่วย 11 ราย โดยนำแต่ละตัวอย่างที่แยกได้จาก



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

คลองรากฟันมาเพาะเลี้ยงบน Enterococcosel™ agar 1 ครั้ง ซึ่งเชื้อ *E. faecalis* ได้รับการวินิจฉัยโดยตรวจสอบลักษณะโคโลนี คุณสมบัติเฉพาะ และยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งกลุ่มผู้ป่วยในโครงการดังกล่าวจำเป็นต้องได้รับการรักษาคคลองรากฟันซ้ำ (nonsurgical root canal retreatment) เนื่องจากประเมินทางคลินิกและ/หรือภาพรังสีแล้วพบการรักษาคคลองรากฟันล้มเหลว

4. การตรวจหายีน *cytA* ด้วยเทคนิค PCR

นำเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่เก็บรักษาใน 10% skimmed milk ออกจากตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด (Blood agar base; BBL™, BD Biosciences, Franklin Lakes, France) ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Streak plate technique) บ่มเชื้อ (Incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะแอโรบิก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (PureDireX DNA extraction kit; Bio-HELIX, keelung City, Taiwan) ทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Ultraspec 2100 (Spectrophotometer; Biochrom, Cambridge, UK) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอตัวอย่างเท่ากับ 12.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) ก่อนเพิ่มจำนวนยีนก่อโรคด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

การตรวจหายีนด้วยเทคนิค PCR ในงานวิจัยนี้ใช้นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (nucleotide primers; Macrogen, New York, USA) ดังตารางที่ 1 เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cytA* ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น 2720 (DNA thermal cycler; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) โดยปฏิกิริยา PCR ใช้สารทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย MgCl₂ 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, 0.25U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 พิโกโมลาร์ forward primer และ reverse primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอแม่แบบ 12.5 นาโนกรัม, 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 14 ไมโครลิตร โดยใช้สารสกัดดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร จากเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 (*cytA*⁺) เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก การทำงานของ PCR ประกอบด้วย การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 36 รอบ การจับของไพรเมอร์ยีน *cytA* กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) สำหรับเชื้อ *E. faecalis* ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย (final step) ตรวจสอบ PCR product ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) โดยใช้ความเข้มข้น 1% อะกาโรสเจล ที่ 80 volts ในสารละลาย Tris-acetate-EDTA buffer ซึ่งจะย้อมเจลดังกล่าวด้วย 0.5 μg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ตารางที่ 1 แสดงนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการตรวจหายีน *cyIA*

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	คู่เบส (bp)	T _m (°C)	เอกสารอ้างอิง
<i>cyIAF</i>	5'-GGTTATGCATCAGATCTCTCAA-3'	81	58	(Gilmore et al., 1994)
<i>cyIAR</i>	5'-CTGTATATAATCTACTTTTTCAGA AGATAATTC-3'			

(*cyIAF*: forward primer ของ *cyIA*; *cyIAR*: reverse primer ของ *cyIA*; T_m: melting temperature)

5. การตรวจหาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *cyIA* ด้วยวิธี quantitative real-time PCR

นำเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกมาสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอ (PureLink® RNA mini kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอตัวอย่างด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Ultrospec 2100 (Spectrophotometer; Biochrom, Cambridge, UK) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของอาร์เอ็นเอเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เพื่อศึกษาค่า mRNA ของยีน *cyIA* ด้วยเครื่อง Real-Time PCR (CFX96 Touch System; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) โดยไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ตรวจสอบดังตารางที่ 1 และใช้เชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 (*cyIA*⁺) เป็นกลุ่มควบคุมบวก รวมถึงยีน 16S rRNA (forward primer: 5'-CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG-3' และ reverse primer: 5'-CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC-3') ใช้เป็นยีนอ้างอิง โดยปฏิกิริยา quantitative real-time PCR ใช้สารทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10 พิโกโมลาร์ forward primer และ reverse primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร, Reverse transcriptase enzyme ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร, อาร์เอ็นเอแม่แบบ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม, น้ำยา One-Step Real-time qPCR ปริมาตร 11.5 ไมโครลิตร, RNase-free water ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร การทำงานของ quantitative real-time PCR เป็นจำนวน 40 รอบ ประกอบด้วย hot start 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที การจับของไพรเมอร์ยีน *cyIA* กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) สำหรับเชื้อ *E. faecalis* ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 25 วินาที นำค่า threshold cycles (CT) มาวิเคราะห์ค่า mRNA ของยีน *cyIA* คำนวณได้จากสูตร $\Delta\Delta CT = (CT_{cyIA} - CT_{16S\ rRNA})_{Sample\ A} - (CT_{Control} - CT_{16S\ rRNA})_{Sample\ O}$ (Sample A: เชื้อ *E. faecalis* แต่ละสายพันธุ์ทางคลินิก; Sample O: เชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 (*cyIA*⁺)) (Livak & Schmittgen, 2001; Wang et al., 2011) ซึ่งค่าการแสดงออกของยีนจะออกมาเป็นจำนวนเท่า $2^{-\Delta\Delta CT}$

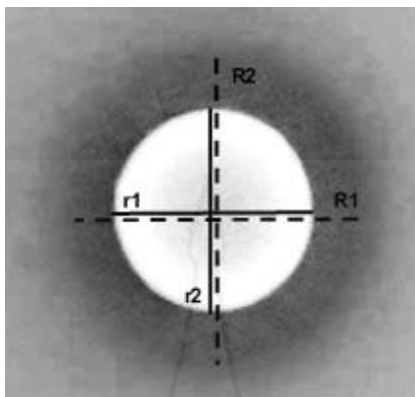
6. การทดสอบการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolysin activity)

นำเชื้อ *E. faecalis* ที่ปรับความเข้มข้นประมาณ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิกรัม (OD_{600nm} = 0.2) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด ความเข้มข้นสายพันธุ์ตัวอย่างละ 2 ข้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาชนะปิดที่จุดเทียนไข จากนั้นตรวจสอบการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง แปรผลด้วยการวัดวงใสรอบโคโลนี (clear halo) หน่วยเป็นมิลลิเมตร ดังภาพที่ 1 ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference



ภาพที่ 1 แบบจำลองการวัดขนาดวงใสรอบโคโลนี

สูตรคำนวณ ขนาดวงใสรอบโคโลนี = $\frac{(R1+R2)}{2} - \frac{(r1+r2)}{2}$

โดย R1 ---- คือ เส้นผ่านศูนย์กลางในแนวนอน

R2 ---- คือ เส้นผ่านศูนย์กลางในแนวตั้ง

r1 — คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวนอน

r2 — คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวตั้ง

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1. การตรวจหายีน *cyIA* และตรวจหาฟิโนไทป์ของยีน *cyIA* รายงานเป็นร้อยละของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่พบ

7.2. ขนาดวงใสรอบโคโลนีในการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง และค่า mRNA ของยีน *cyIA* เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ จึงรายงานเป็นค่ามัธยฐาน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุด

7.3. ความสัมพันธ์ระหว่างค่า mRNA ของยีน *cyIA* กับขนาดวงใสรอบโคโลนีในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้สถิติ Spearman's rho เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ และตัวแปรเป็นเชิงปริมาณ 2 ตัว

7.4. การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างยีน *cyIA* และค่า mRNA ของยีน *cyIA* เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ จึงใช้สถิติ Kruskal-Wallis test วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวแปรเชิงกลุ่มแบ่งย่อย 3 กลุ่ม คือ ไม่มียีน ยีนอ่อน และยีนเข้ม และตัวแปรเชิงปริมาณ คือ ค่า mRNA ของยีน *cyIA* ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 หากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มย่อยแต่ละคู่ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

7.5. ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cyIA* กับฟิโนไทป์ของยีน *cyIA* ใช้สถิติ chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เนื่องจากตัวแปรทั้ง 2 ตัว เป็นตัวแปรเชิงกลุ่ม



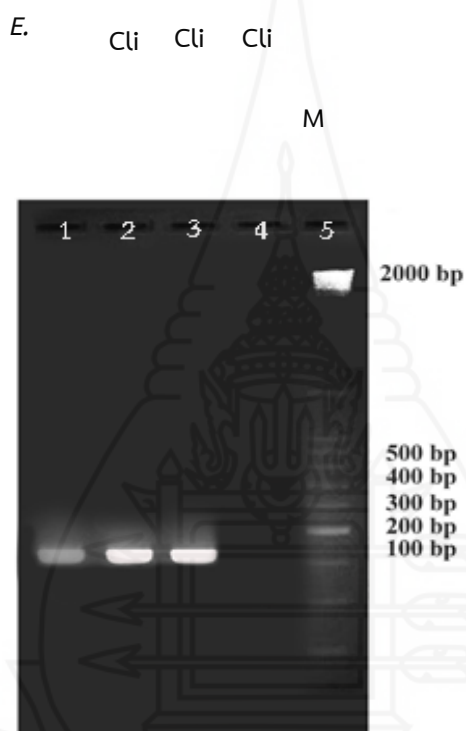
การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

ผลการวิจัย

1. การตรวจหายีน *cylA*

ผลการตรวจหายีน *cylA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก จำนวน 49 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR และอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบ *E. faecalis* ที่มียีน *cylA* 45 จาก 49 สายพันธุ์ (ร้อยละ 91.8) สังเกตด้วยตาเปล่าของผู้วิจัยพบว่า *E. faecalis* ที่มียีน *cylA* จะมีความเข้ม band ต่างกัน คือ band เข้ม และ band อ่อน ดังภาพที่ 2

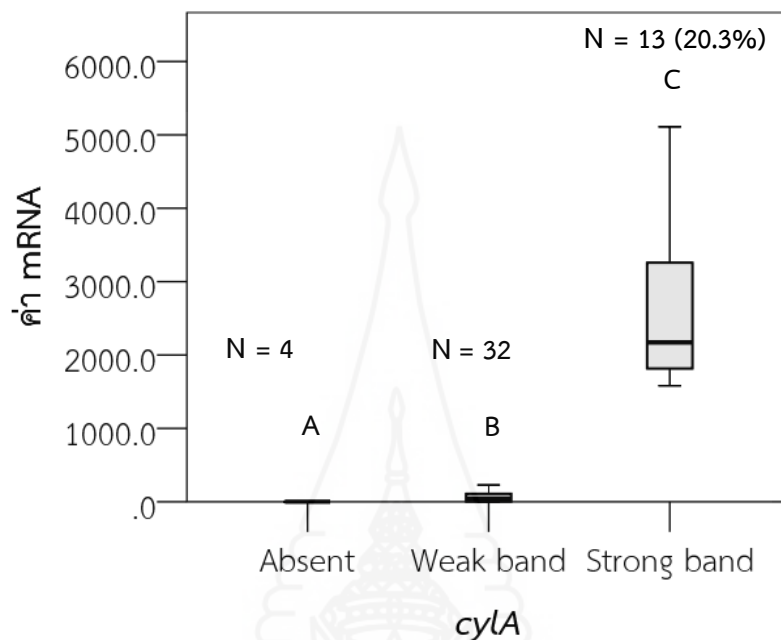


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะความเข้ม band ที่ต่างกันของยีน *cylA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกจากการทดสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ช่องที่ 1: band อ่อน; ช่องที่ 2 และ 3: band เข้ม; ช่องที่ 4: ไม่พบยีน *cylA*)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference



ภาพที่ 3 ค่า mRNA ของยีน *cylA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่มี (present: weak band; strong band) และไม่มียีน *cylA* (absent) และ $C > B > A$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (N: จำนวนเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสสายพันธุ์ทางคลินิกในแต่ละกลุ่ม)

2. การตรวจหาการแสดงออกของยีน *cylA* ของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก

E. faecalis สายพันธุ์ที่มียีน *cylA* แสดงลักษณะ band เข้มจะมีค่ามัธยฐานของการแสดงออกของยีน *cylA* 2169.9 (ค่าต่ำสุด 1579.4 – ค่าสูงสุด 5109.3) ในขณะที่ *E. faecalis* ที่มียีน *cylA* แสดงลักษณะ band อ่อนจะมีค่ามัธยฐานของการแสดงออกของยีน *cylA* 47.93 (ค่าต่ำสุด 0 – ค่าสูงสุด 228.6) และ *E. faecalis* ที่ไม่มียีน *cylA* จะไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าว เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test พบว่า *E. faecalis* ที่แสดงลักษณะ band *cylA* เข้มจะมีค่าการแสดงออกของยีน *cylA* มากกว่ากลุ่มที่แสดงลักษณะ band อ่อนและกลุ่มที่ไม่มียีน *cylA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p = 0.000$) ดังภาพที่ 3

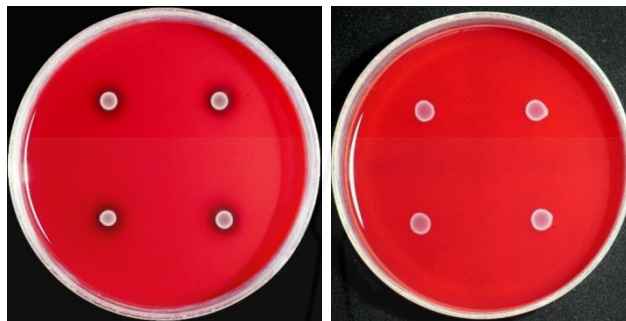
3. การย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง

พบ *E. faecalis* 13 สายพันธุ์ (ร้อยละ 26.5) มีความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (ภาพที่ 4) มีค่ามัธยฐาน (median) ของขนาดวงใสรอบโคโลนี 3.2 มิลลิเมตร (ค่าต่ำสุด 2.6 – ค่าสูงสุด 3.5) และอีก 36 สายพันธุ์ (ร้อยละ 73.5) ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (ภาพที่ 4)



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4 *E. faecalis* ที่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolytic) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด (ก) และชนิดไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (non-hemolytic) (ข)

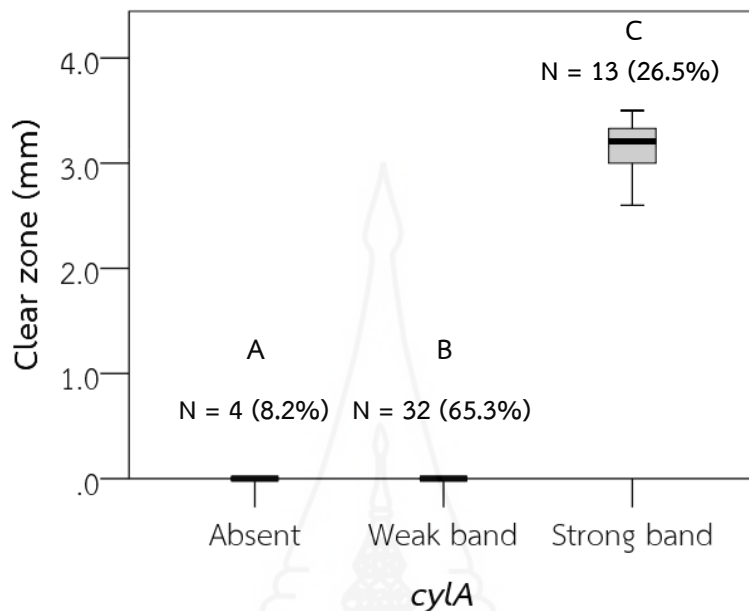
เชื้อ *E. faecalis* 45 สายพันธุ์ที่มียีน *cylA* ระดับความเข้ม band ต่างกัน (ภาพที่ 2) จะสอดคล้องกับความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง กล่าวคือ เชื้อ *E. faecalis* ที่ย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทั้ง 13 สายพันธุ์จะแสดงลักษณะ band เข้ม ในขณะที่อีก 32 สายพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแสดงลักษณะ band อ่อน นอกจากนี้ยังพบว่า ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งตรวจไม่พบยีน *cylA* ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เช่นกัน

เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test พบว่า เชื้อ *E. faecalis* ที่แสดงลักษณะ band *cylA* เข้มจะมีความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้มากกว่ากลุ่มที่แสดงลักษณะ band อ่อนและกลุ่มไม่มียีน *cylA* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p = 0.000$) ดังภาพที่ 5



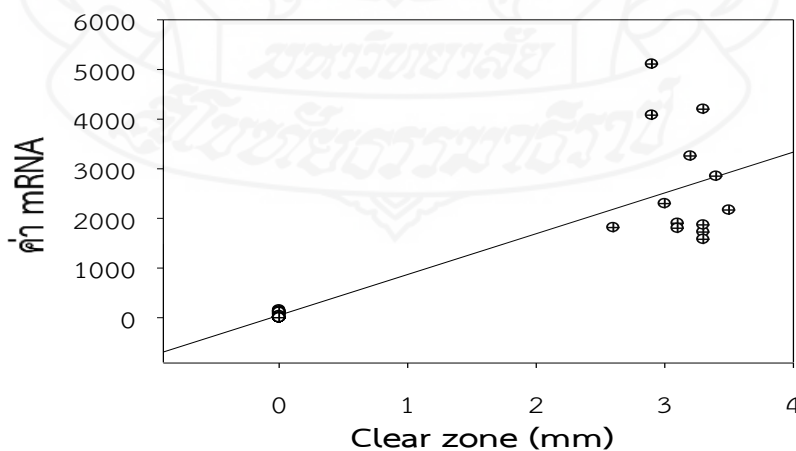
การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference



ภาพที่ 5 ขนาดวงใสรอบโคโลนีในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่มี (present: weak band; strong band) และไม่มียีน *cyLA* (absent) และ C>B>A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (N: จำนวนของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกในแต่ละกลุ่ม)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ Spearman's rho ยังพบความสัมพันธ์ระดับสูงในทิศทางเดียวกันระหว่างค่า mRNA ของยีน *cyLA* กับขนาดวงใสรอบโคโลนีในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($r_s=0.748$, $p=0.000$) ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mRNA ของยีน *cyLA* กับขนาดวงใสรอบโคโลนีในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิก จำนวน 49 สายพันธุ์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

4. ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cylA* กับการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง

เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติ chi-square พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cylA* กับความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง กล่าวคือ เชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cylA* ที่แสดงลักษณะ band เข้มจะมีความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทั้ง 13 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p=0.000$)

อภิปรายผลการวิจัย

หลายการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยายืนยันว่า *E. faecalis* เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยมากถึงร้อยละ 90 ในพื้นที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายราก (Foschi et al., 2005; Fouad et al., 2005; Gomes et al., 2008; Rôças, Jung, Lee, & Siqueira, 2004; Williams, Trope, Caplan, & Shugars, 2006) และมีโอกาสพบแบคทีเรียชนิดนี้ในพื้นที่รักษาคคลองรากแล้วมากกว่าพื้นที่ติดเชื้อปฐมภูมิถึง 9 เท่า (Rôças, Siqueira, & Santos, 2004) สันนิษฐานว่า เชื้อ *E. faecalis* ที่สามารถดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวนในพื้นที่ผ่านการรักษาคคลองรากฟันแล้ว ส่วนหนึ่งอาจมาจากปัจจัยของยีนก่อโรคซึ่งมีบทบาทช่วยให้เชื้อ *E. faecalis* ปรับตัวและคงอยู่ในคลองรากฟันได้ อีกทั้งยังช่วยให้สามารถถ่ายทอดยีนก่อโรคของตัวเองไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังนั้นเป็นไปได้ว่า ยีนก่อโรคจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อยึดเยื่อภายในคลองรากฟัน

ผลการศึกษาครั้งนี้พบ *E. faecalis* มียีน *cylA* 45 สายพันธุ์ (ร้อยละ 91.8) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu et al. (2010) ซึ่งพบ *E. faecalis* มียีน *cylA* ร้อยละ 100 แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าวศึกษาจาก *E. faecalis* สายพันธุ์ที่แยกมาจาก 2 แหล่ง คือ น้ำลายของผู้ป่วยที่ต้องรักษาคคลองรากฟันซ้ำและแยกมาจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวภายหลังการรักษา นอกจากนี้การศึกษาของ Barbosa-Ribeiro et al. (2016) ไม่พบยีน *cylA* ซึ่งการศึกษาดังกล่าวได้จำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ *E. faecalis* ที่แยกมาจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวด้วยวิธี Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) พบว่า แต่ละสายพันธุ์จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลการศึกษาแตกต่างกัน และมีการศึกษาของ Endo MS (2015) พบเพียงร้อยละ 16.6 ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ สันนิษฐานว่า อาจเกิดจากขนาดกลุ่มตัวอย่าง การสุ่มเลือกของกลุ่มตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนการทดลองในห้องปฏิบัติการ เป็นต้น สำหรับผลการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อ *E. faecalis* พบจำนวน 13 สายพันธุ์ (ร้อยละ 26.5) ที่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ซึ่งพบมากกว่าการศึกษาของ Reynaud af Geijersstam et al. (2007) พบเพียงร้อยละ 9 ทั้งนี้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยทางด้านลักษณะภูมิศาสตร์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser/Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) โดยวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเปปไทด์แต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ *E. faecalis* ที่มาจากเชื้อชาติต่างกันพบว่า รูปแบบ (profile) ทางพันธุกรรมจะมีความแตกต่างกัน อาจส่งผลให้ฟิโนไทป์ของยีนที่ปรากฏออกมาต่างกันได้ นอกจากนี้ผลการศึกษาไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu et al. (2010) และการศึกษาของ Saffari et al. (2017) ซึ่งไม่พบการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยมีรายงานว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ทางคลินิกที่แยกมาจากคลองรากฟันซึ่งสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้จะพบน้อยหรือแทบไม่พบ ซึ่งผลการศึกษาที่แตกต่างกันนั้นอาจมาจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์ เชื้อชาติ ปัจจัยด้านอาหารที่รับประทานซึ่งแตกต่างกันระหว่างกลุ่มประชากร และระยะของการติดเชื้อก็มีส่วนทำให้ฟิโนไทป์ของยีนแตกต่างกัน



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

นอกจากนี้พบว่า ยีน *cylA* ที่แสดงลักษณะ band เข้มทั้งหมดจะมีค่า mRNA ของยีน *cylA* สูงอย่างเด่นชัด และสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทั้งหมด จึงอาจสรุปได้ว่า เชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cylA* แสดงลักษณะ band เข้มจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ สอดคล้องกับข้อมูลจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อ *E. faecalis* ที่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงจะพบในกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการเคาะเจ็บ หรือมีรูเปิดทางหนองไหลทั้งหมด มีขนาดเฉลี่ยของรอยโรคปลายรากฟัน 6.2 มิลลิเมตร ซึ่งมีรายงานสนับสนุนว่า สารไซโตไลซินอาจมีความเกี่ยวข้องในการเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อที่รับบาดเจ็บหรือ phagocytic cells หลัง inflammatory mediators ได้แก่ TNF- α , IL-1 β , IL-8 เป็นต้น ออกมาจำนวนมาก จึงเป็นสาเหตุให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบที่เพิ่มขึ้น อีกทั้ง TNF- α , IL-1 β จะมีบทบาทในการกระตุ้นตัวรับความรู้สึก (nociceptors) ส่งผลให้มีอาการทางคลินิกตามมา เช่น ปวด เคาะเจ็บ (Cunha et al., 2005; Ferreira, Lorenzetti, Bristow, & Poole, 1988) รวมถึงอาจมีความเกี่ยวข้องในการเกิดโรคของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน (Sedgley, 2017) อีกทั้งสารไซโตไลซินสามารถย่อยสลาย neutrophil และ macrophage ได้ จึงน่าจะมีส่วนช่วยในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune evasion) (Miyazaki et al., 1993) แล้วส่งผลให้เกิดความสามารถในการรุกรานเข้าไปยังบริเวณเนื้อเยื่อได้ (Coburn & Gilmore, 2003) จึงอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อเกิดการสร้างสารไซโตไลซินเพิ่มขึ้นก็จะเหนี่ยวนำให้มีขนาดของรอยโรครอบปลายรากฟันใหญ่ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประเด็นดังกล่าว ในขณะที่เชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cylA* แสดงลักษณะ band อ่อนและไม่มียีน *cylA* จะไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ อีกทั้งข้อมูลจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงจะพบในกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการเคาะเจ็บ หรือมีรูเปิดทางหนองไหลเพียงร้อยละ 12.5 และมีขนาดเฉลี่ยของรอยโรคปลายรากฟัน 3.9 มิลลิเมตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Ike, Hashimoto, and Clewell (1984) พบว่า หนูที่ได้รับเชื้อเอนเทอโรคอคคัสพิคลิสสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง หนูยังคงมีชีวิตรอด ในขณะที่หนูที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ hemolytic จะตายภายใน 4-5 ชั่วโมง ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวจึงสนับสนุนว่า สารไซโตไลซินอาจเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรงต่อการเกิดโรค นอกจากนี้มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า สายพันธุ์ของเชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สร้างไซโตไลซินจะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณจอตา (retinal) น้อยหรือแทบไม่เกิด ในขณะที่เชื้อ *E. faecalis* ที่สร้างไซโตไลซินจะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อจอตาในระดับที่ลึก (deep layer) รวมถึงกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารชักนำการอักเสบ (inflammatory mediator) เป็นจำนวนมากจากเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บ และฟาโกไซติกเซลล์ (phagocytic cells) จึงเป็นสาเหตุให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบที่รุนแรงและเกิดการทำลายเนื้อเยื่อตามมา (Jett, Jensen, Nordquist, & Gilmore, 1992) ดังนั้นจึงสนับสนุนว่า สารไซโตไลซินอาจมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค

นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ที่มียีน *cylA* แสดงลักษณะ band อ่อนจะไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ที่เป็นเช่นนี้เป็นไปได้ว่า ยีน *cyLL*'' และ *cyLS*'' ที่อยู่ภายนอกเซลล์เมื่อมีการรวมตัวกันในรูปโปรตีนเชิงซ้อนจะไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ อีกทั้งปริมาณของ *cyLS*'' ที่ล่องลอยอยู่ภายนอกเซลล์จะมีน้อยกว่าระดับขีดกั้น (threshold) จึงไม่มีสัญญาณส่งไปยังโปรตีน *cyLR2* ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมประเภทยับยั้ง (repressor) ที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้ *cyLR2* ยังจับกับ P_L promoter และไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ *cyl* operon จึงอาจเป็นเหตุให้เกิดการแสดงออกของ *cyl* operon ในระดับต่ำ หรือทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนเลย และไม่สามารถสร้างสารไซโตไลซินได้ ส่งผลให้ *E. faecalis* ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (Van Tyne, Martin, & Gilmore, 2013) นอกจากนี้มีการศึกษาของ Saffari et al. (2017) สันนิษฐานว่า กระบวนการผลิตสารไซโตไลซินเพื่อให้เกิดการย่อย



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

สลายเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น มีความจำเป็นต่ออาศัยยีนที่เกี่ยวข้องทั้ง 5 ยีน ซึ่งอยู่ภายใน *cyl* operon ดังนี้ ยีน *cyLL* และ *cyLS* เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารไซโตไลซิน ยีน *cyLM* มีหน้าที่ดัดแปลงโปรตีนหลังจากการสังเคราะห์สารไซโตไลซิน (posttranslational modifications) ยีน *cyLB* มีบทบาทในการขนส่งสารไซโตไลซิน และ *cyLA* ทำหน้าที่ในการกระตุ้นไซโตไลซินให้เกิดการทำลายเซลล์เป้าหมาย ในที่นี้คือ การย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (Eaton & Gasson, 2001) ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่า เมื่อมี *cyl* operon ครบทั้ง 5 ยีน จะส่งผลให้เชื้อ *E. faecalis* สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (Hällgren et al., 2009; Poeta, Costa, Klibi, Rodrigues, & Torres, 2006; Semedo et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผู้วิจัยไม่ได้ศึกษา *cyl* operon ครบทุกยีนจึงเป็นเพียงการคาดการณ์เท่านั้น

สำหรับผลการศึกษานี้ที่พบเชื้อ *E. faecalis* จำนวน 4 สายพันธุ์ (ร้อยละ 8.2) ที่ไม่มียีน *cyLA* และไม่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าว รวมถึงไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้นั้นเป็นสิ่งที่อาจยืนยันได้ว่า ยีน *cyLA* ถือเป็นยีนที่สำคัญยีนหนึ่งซึ่งช่วยกระตุ้นให้สารตั้งต้นของไซโตไลซินอยู่ในรูปพร้อมทำงาน (*cyLL'*, *cyLS'*) และสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า สารไซโตไลซินอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการส่งเสริมให้เชื้อ *E. faecalis* มีความสามารถในการก่อโรคเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เนื่องจากการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

สำหรับรูปแบบการประเมินความสามารถในการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการศึกษานี้จะแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ โดยหลายการศึกษาตรวจสอบจากมิว่งใสรอบโคโลนีเกิดขึ้นหรือไม่ ซึ่งจัดเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ (Reynaud af Geijerstam et al., 2007; Saffari et al., 2017; Zhu et al., 2010; Zoletti et al., 2011) ในขณะที่การศึกษาของผู้วิจัยนั้นจะประเมินผลโดยการวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนี ซึ่งจัดเป็น semi-quantitative เพื่อสามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบ activity ของแต่ละสายพันธุ์ทางคลินิก และนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับปัจจัยอื่นๆ ได้ อีกทั้งยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบดังกล่าวมีข้อจำกัดคือ กรณีที่เชื้อ *E. faecalis* สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้น้อยจะไม่สามารถประเมินได้ด้วยตาเปล่า

ข้อเสนอแนะ

เพื่อเป็นข้อมูลนำร่องที่จะช่วยให้เกิดความเข้าใจเบื้องต้นในบทบาทของยีนก่อโรคและฟิโนไทป์ของยีน รวมถึงเข้าใจกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *E. faecalis* ในคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายรากมากยิ่งขึ้น จึงควรศึกษายีนก่อโรคชนิดอื่นเพิ่มเติม เช่น *gelE*, *esp*, *asa1* และ *ace* อีกทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของยีนทั้ง 4 ชนิดกับฟิโนไทป์ของยีนดังกล่าว เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนก่อโรคอย่างเป็นระบบมากขึ้น และสามารถอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งผู้วิจัยกำลังดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ต่อไป นอกจากนี้ถือเป็นองค์ความรู้สำหรับการค้นคว้าและพัฒนาสารต้านจุลชีพที่สามารถกำจัดการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *E. faecalis* ได้อย่างตรงจุดและมีประสิทธิภาพมากขึ้น นำไปสู่การวางแผนการรักษาที่เหมาะสมกับฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาคลองรากฟันที่มีรอยโรคปลายราก เพื่อให้การรักษาลองรากฟันซ้ำมีอัตราความสำเร็จที่สูงขึ้น



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

เอกสารอ้างอิง

- Barbosa-Ribeiro, M., De-Jesus-Soares, A., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., Almeida, J. F., & Gomes, B. P. (2016). Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod*, 42(7), 1022-1028.
- Coburn, P. S., & Gilmore, M. S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol*, 5(10), 661-669.
- Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5), 1755-1760.
- Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67(4), 1628-1635.
- Endo, M. S., Kitayama, V.S., Marinho, A.S., Martinho, F.C., Gomes, B. (2015). Investigation in vivo of *Enterococcus faecalis* in endodontic retreatment by phenotypic and genotypic methods. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 37(1), 95-103.
- Evans, M., Davies, J. K., Sundqvist, G., & Figdor, D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*, 35(3), 221-228.
- Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., Bristow, A. F., & Poole, S. (1988). Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334(6184), 698-700.
- Foschi, F., Cavrini, F., Montebugnoli, L., Stashenko, P., Sambri, V., & Prati, C. (2005). Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*, 20(5), 289-295.
- Fouad, A. F., Zerella, J., Barry, J., & Spangberg, L. S. (2005). Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99(1), 112-118.
- Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R., & Clewell, D. B. (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol*, 176(23), 7335-7344.
- Gomes, B. P., Pinheiro, E. T., Jacinto, R. C., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., & Souza-Filho, F. J. (2008). Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*, 34(5), 537-540.
- Hällgren, A., Claesson, C., Saeedi, B., Monstein, H. J., Hanberger, H., & Nilsson, L. E. (2009). Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

- adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol*, 299(5), 323-332.
- Hancock, H. H., 3rd, Sigurdsson, A., Trope, M., & Moiseiwitsch, J. (2001). Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 91(5), 579-586.
- Huycke, M. M., Spiegel, C. A., & Gilmore, M. S. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(8), 1626-1634.
- Ike, Y., Hashimoto, H., & Clewell, D. B. (1984). Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun*, 45(2), 528-530.
- 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. *Infect Immun*, 60(6), 2445-2452.
- Kayaoglu, G., & Orstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15(5), 308-320.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Love, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*, 34(5), 399-405.
- 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. *Microbiol Immunol*, 37(4), 265-270.
- Molander, A., Reit, C., Dahlen, G., & Kvist, T. (1998). Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, 31(1), 1-7.
- Moller, A. J. (1966). Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr*, 74(5), Suppl:1-380.
- Moller, A. J., Fabricius, L., Dahlen, G., Sundqvist, G., & Happonen, R. P. (2004). Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci*, 112(3), 207-215.
- Nair, P. N., Sjogren, U., Krey, G., Kahnberg, K. E., & Sundqvist, G. (1990). Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*, 16(12), 580-588.
- Peciuliene, V., Balciuniene, I., Eriksen, H. M., & Haapasalo, M. (2000). Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod*, 26(10), 593-595.



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

- Pinheiro, E. T., Gomes, B. P., Ferraz, C. C., Sousa, E. L., Teixeira, F. B., & Souza-Filho, F. J. (2003). Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*, 36(1), 1-11.
- Poeta, P., Costa, D., Klibi, N., Rodrigues, J., & Torres, C. (2006). Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53(5), 203-208.
- Reynaud af Geijersstam, A., Culak, R., Molenaar, L., Chattaway, M., Roslie, E., Peciulienė, V., Shah, H. N. (2007). Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 22(2), 87-94.
- Rôças, I. N., Jung, I. Y., Lee, C. Y., & Siqueira, J. F., Jr. (2004). Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod*, 30(7), 504-508.
- Rôças, I. N., Siqueira, J. F., Jr., & Santos, K. R. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*, 30(5), 315-320.
- Saffari, F., Dalfardi, M. S., Mansouri, S., & Ahmadrajabi, R. (2017). Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates. *Infect Chemother*, 49(3), 176-183.
- Sedgley, C. (2017). *Endodontic Microbiology* (2nd ed). Hoboken: John Wiley & Sons.
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., & Barreto Crespo, M. T. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, 41(6), 2569-2576.
- Siqueira, J. F., Jr., & Rôças, I. N. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97(1), 85-94.
- Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., & Sjogren, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(1), 86-93.
- Van Tyne, D., Martin, M. J., & Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins (Basel)*, 5(5), 895-911.
- Wang, L., Dong, M., Zheng, J., Song, Q., Yin, W., Li, J., & Niu, W. (2011). Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod*, 37(5), 631-636.



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 10

The 10th STOU National Research Conference

- Williams, J. M., Trope, M., Caplan, D. J., & Shugars, D. C. (2006). Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod*, 32(8), 715-721.
- Zhu, X., Wang, Q., Zhang, C., Cheung, G. S., & Shen, Y. (2010). Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod*, 36(12), 1950-1955.
- Zoletti, G. O., Pereira, E. M., Schuenck, R. P., Teixeira, L. M., Siqueira, J. F., Jr., & dos Santos, K. R. (2011). Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol*, 162(2), 151-158.

