

PHENOTYPE AND GENE EXPRESSION OF *cylA* GENE IN *Enterococcus Faecalis* STRAINS ISOLATED FROM HUMAN ROOT CANALS

Wirintra WATCHARANON¹, Rawee TEANPAISAN², Kewalin THAMMASITBOON¹ and Nuntiya PHAHUMANTO³

1 Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Thailand

2 Medical Science Research and Innovation Institute, Prince of Songkla University, Thailand

3 Department of Oral Diagnostic Sciences, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 16 August 2024

Revised: 30 August 2024

Published: 13 September 2024

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the presence of hemolytic activity and *cylA* gene expression of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) strains isolated from endodontic-periodontal lesions showing the same (*Ef.S*) and different (*Ef.D*) genotype. A total of 54 strains, 36 strains of *Ef.S* and 18 strains of *Ef.D*, were examined for hemolytic activity on blood agar plate, the presence of the *cylA* gene using polymerase chain reaction (PCR), and *cylA* gene expression levels by real-time PCR. Results showed that *Ef.S* strains exhibited a higher hemolytic activity Med = 0 (0,5.33) mm. compared to the *Ef.D* strains Med = 0 (0,4.63) mm. Moreover, the gene expression of *Ef.S* strains Med = 0.93 (0,6670.4) folds of induction was higher than in the *Ef.D* strains Med = 1.33 (0.41,1376.4) folds of induction. Additionally, all strains (100%) presented the *cylA* gene. Our study concluded that *Ef.S* strains showed a high virulence factors compared to *Ef.D* and it may be associated with the high severity of the disease.

Keywords: *cylA* Gene, Hemolytic Activity, Gene Expression, *Enterococcus faecalis*, Endodontic-Periodontal Lesions

CITATION INFORMATION: Watcharanon, W., Teanpaisan, R., Thammasitboon, K., & Phahumanto, N. (2024). Phenotype and Gene Expression of *cylA* Gene in *Enterococcus Faecalis* Strains Isolated from Human Root Canals. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 2(9), 8

ฟีโนไทป์และการแสดงออกของยีน *cyIA* ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสที่แยกจากคลองรากฟันของคน

วิรินทรา วัชรานนท์¹, รวี เกียรติไพศาล², เกวลิน ธรรมสิทธิบุรณ์¹ และ นันทิยา พาหุมนโต³

1 สาขาวิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2 สถาบันวิจัยและนวัตกรรมทางการแพทย์ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3 สาขาวิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และระดับการแสดงออกของยีน *cyIA* ของเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ที่แยกจากรอยโรคระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน (*Ef.S*) และต่างกัน (*Ef.D*) โดยเชื้อ *E. faecalis* ทั้งหมดจำนวน 54 สายพันธุ์ แบ่งเป็น *Ef.S* 36 สายพันธุ์ และ *Ef.D* 18 สายพันธุ์ นำมาศึกษาถึงความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การมียีน *cyIA* และระดับการแสดงออกของยีน โดยทดสอบการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดผสมเลือด ตรวจหายีน *cyIA* ด้วยเทคนิค PCR และศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค PCR แบบเรียลไทม์ ผลการศึกษาพบว่าในการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงเชื้อ *Ef.S* มีค่ามัธยฐาน = 0 (0,5.33) mm ซึ่งมีแนวโน้มในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* ค่ามัธยฐาน = 0 (0,4.63) mm เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการแสดงออกของยีน พบว่าเชื้อ *Ef.S* มีค่ามัธยฐาน = 0.93 (0,6670.4) folds of induction ซึ่งมีแนวโน้มระดับการแสดงออกที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* ที่มีค่ามัธยฐาน = 1.33 (0.41,1376.4) folds of induction และพบว่าเชื้อทั้งหมดมียีน *cyIA* สรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Ef.S* มีปัจจัยก่อโรคที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* และอาจส่งผลให้รอยโรคร่วมนี้มีความรุนแรงมากขึ้น

คำสำคัญ: ยีน *cyIA*, การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง, การแสดงออกของยีน, เชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส, รอยโรคระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์อักเสบ

ข้อมูลการอ้างอิง: วิรินทรา วัชรานนท์, รวี เกียรติไพศาล, เกวลิน ธรรมสิทธิบุรณ์ และ นันทิยา พาหุมนโต. (2567). ฟีโนไทป์และการแสดงออกของยีน *cyIA* ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสที่แยกจากคลองรากฟันของคน. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 2(9), 8

บทนำ

รอยโรคร่วมระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ (endodontic-periodontal lesions) เป็นรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบรากฟันในฟันซี่เดียวกัน (Simring et al., 1964) กลุ่มเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเนื้อเยื่อในนั้นมีความคล้ายกับเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ โดยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส (*Enterococcus faecalis* หรือ *E. faecalis*) ก็เป็นหนึ่งในกลุ่มเชื้อนี้

เชื้อ *E. faecalis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สามารถดำรงชีพอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถพบได้ทั้งในคลองรากฟันที่มีการติดเชื้อปฐมภูมิ (primary infection) ในรอยโรคปริทันต์ปฐมภูมิ (primary periodontal lesions) (Souto et al., 2008)

จากการศึกษาของ พรชนก ศรีสังข์ (2565) ได้ศึกษาถึงความชุกของเชื้อ *E. faecalis* ในรอยโรคร่วมระหว่างเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์อักเสบ โดยแยกเชื้อ *E. faecalis* จากผู้ป่วย พบว่า มีผู้ป่วย 6 จาก 21 ราย (ร้อยละ 28.6) ที่พบเชื้อ *E. faecalis* ทั้งในคลองรากฟันและร่องลึกปริทันต์ และพบว่า เชื้อเหล่านี้สามารถแยกได้ 2 ลักษณะ คือ เชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันทั้งในคลองรากฟันและร่องลึกปริทันต์ และเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมในคลองรากฟันต่างกับในร่องลึกปริทันต์ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าความเหมือนหรือความต่างกันของลักษณะทางพันธุกรรมนี้ อาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *E. faecalis* ด้วยหรือไม่

ปัจจัยในการก่อโรคเชื้อ *E. faecalis* มีด้วยกันหลายปัจจัย เช่น สามารถสร้างถิ่นฐานในรูปแบบของแผ่นคราบชีวภาพ (biofilm) ทำให้ต้านทานขบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) แอนติบอดี (antibodies) และสารต้านจุลชีพ (antimicrobial) สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย สามารถหลั่งเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ไลติก (lytic enzyme) ไซโตไลซิน (cytolysin) ซึ่งพบว่า cytolysin activator gene (*cytA*) เป็นหนึ่งในยีนก่อโรคที่สำคัญของเชื้อ *E. faecalis* โดยยีน *cytA* สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์โฮสต์ และส่งผลให้เกิดการอักเสบและการติดเชื้อของอวัยวะปริทันต์ได้ จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสามารถปรับตัวมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไม่พึ่งออกซิเจนได้อีกด้วย ยีน *cytA* นั้นมีฟีโนไทป์ที่สำคัญซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในรอยโรคร่วมระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ หรืออาจมีผลเอื้อให้เชื้อ *E. faecalis* สามารถปรับตัวและดำรงชีวิตอยู่ได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงการมียีนก่อโรค (virulence genes) ฟีโนไทป์ (phenotypes) และการแสดงออก (expression) ของยีน *cytA* ของเชื้อ *E. faecalis* ที่แยกจากรอยโรคร่วมระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน (*Ef.S*) และต่างกัน (*Ef.D*)

การทบทวนวรรณกรรม

รอยโรคร่วมระหว่างเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์เป็นรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบรากฟันในฟันซี่เดียวกัน (Simring et al., 1964) โดยอาจเกิดจากรอยโรคเนื้อเยื่อในก่อนหรือเกิดจากรอยโรคของเนื้อเยื่อรอบรากฟันก่อน หรือเกิดจากทั้งรอยโรคของเนื้อเยื่อในและจากรอยโรคของอวัยวะปริทันต์ที่แยกกันและมีการพัฒนาของรอยโรคทั้งสองจนมารวมกัน (Simon et al., 1972) โดยเนื้อเยื่อในและอวัยวะปริทันต์มีช่องทางติดต่อกันได้หลายทาง เช่น apical foramen, lateral canals และ accessory canal เป็นต้น

ดังนั้นหากมีการตายของเนื้อเยื่อใน แบคทีเรียและสารพิษจะผ่านออกสู่อวัยวะปริทันต์ทำให้เกิดรอยโรคที่ปลายรากฟันหรือกระดูกรอบรากฟันได้ ในทางกลับกันหากโรคปริทันต์อักเสบลุกลามมากและทำลายอวัยวะปริทันต์จนถึงรูปลายรากฟัน เชื้อโรคจากโรคปริทันต์อักเสบอาจมีผลทำให้เกิดการติดเชื้อของเนื้อเยื่อในได้ (Langeland et al., 1974) ช่องทางดังกล่าวจึงมีบทบาทสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียและสารพิษสามารถผ่านเข้าออกระหว่างภายในคลองรากฟันและอวัยวะปริทันต์ ทำให้เกิดรอยโรคร่วมระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ขึ้น

เอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส (*E. faecalis*) เป็นเชื้อหนึ่งที่สามารถพบได้ทั้งจากร่องลึกปริทันต์ และคลองรากฟันของฟันที่มีรอยโรคร่วมระหว่างโรคปริทันต์และเนื้อเยื่อใน (Kipioti et al., 1984; Rovai et al., 2019) โดยเชื้อ *E. faecalis* เป็น

แบคทีเรียแกรมบวกรูปทรงกลม อาจพบในลักษณะเชลล์เดี่ยว เชลล์คู่ หรือมีการยึดและเรียงตัวเป็นสายสั้น ไม่สร้างสปอร์ สามารถดำรงชีพได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจนจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *facultative anaerobic* ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่และไม่ย่อยสลายเม็ดเลือด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 1 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ดี ในอุณหภูมิตั้งแต่ 10 ถึง 45 องศาเซลเซียส และอยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที รวมถึงทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือหรือมีความเป็นด่างสูง (Tendolkar et al., 2003)

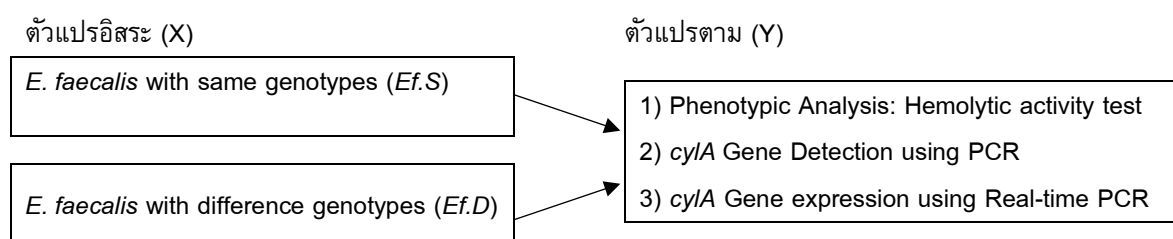
cytolysin activator gene (*cylA*) เป็นยีนก่อโรคที่พบบ่อยของเชื้อ *E. faecalis* โดยเป็นยีนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์โฮสต์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์บางชนิด (Zhu X et al., 2010) โดยเซลล์เป้าหมายของไซโตไลซิน คือ เม็ดเลือดแดงโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ นิวโตรฟิล แมคโครฟาจ และแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Kayaoglu & Ørstavik, 2004)

บทบาทสำคัญของยีน *cylA* คือ การกระตุ้นให้เกิดกระบวนการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยมีรายงานของ Jett et al. (1994) ว่า เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะเพิ่มจำนวนและสร้างอาณานิคมบริเวณเนื้อเยื่อเหงือกจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลของระบบนิเวศ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าว ซึ่งจะส่งเสริมให้แบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างแท่ง มีการเพิ่มจำนวนและสร้างอาณานิคม จึงส่งผลให้เกิดการอักเสบและการติดเชื้อของอวัยวะ ปรีทนต์ การศึกษาของ Kayaoglu et al. (2004) พบว่า เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสามารถปรับตัวมีชีวิตอยู่ในสภาวะไม่พึ่งออกซิเจน (anaerobe) ได้รวมถึงเอื้อต่อการสร้างแผ่นคราบชีวภาพในคลองรากฟัน จึงอาจมีแนวโน้มที่จะเกิดการติดเชื้อเพิ่มขึ้น การศึกษาของ Ike et al. (1987) พบว่า ร้อยละ 60 ของการติดเชื้อทางหลอดเลือด (parenteral infections) เกิดจาก *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและยังพบว่า *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multiple drug resistance) ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ทั้งการดื้อยาปฏิชีวนะและการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง อาจมีผลทำให้เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมีความรุนแรงในการก่อโรคได้มากขึ้น

สมมติฐานการวิจัย

เชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน (*Ef.S*) และต่างกัน (*Ef.D*) จะมีฟิโนไทป์ และการแสดงออกของยีน *cylA* แตกต่างกัน

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด

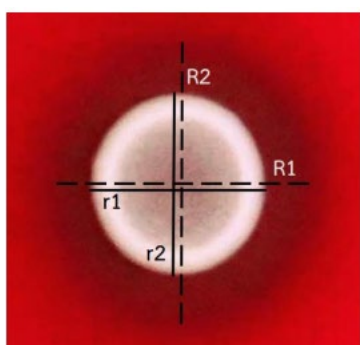
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา จะใช้เชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 19433 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากคลินิกโดยนำมาจากโครงการวิจัยเรื่อง “ความชุกของเชื้อ พอฟไโรโมแนส จิงจิวัลิส ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีโอทัม และเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสที่แยกจากรอยโรคร่วม ระหว่างโรคปริทันต์และเนื้อเยื่อใน โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและ Real-Time PCR” โดย พรชนก ศรีสังข์ และคณะ (2565) ซึ่งพบเชื้อ *E. faecalis* ทั้งหมด 54 strains แบ่งเป็น *Ef.S* 36 strains และ *Ef.D* 18 strains

1) ความสามารถในการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด (ลักษณะทางฟีโนไทป์ของ ยีน *cyA*) (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Sedgley et al. (2005))

ปรับความเข้มข้นของเชื้อ *E. faecalis* ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) (ปรับค่า OD600 nm = 0.2) แล้วจึงนำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด สายพันธุ์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 เป็นกลุ่มควบคุมบวก เนื่องจากสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง

แปลผลโดยวัดวงใสรอบโคโลนี (clear halo) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางในแนวนอนและแนวตั้งของบริเวณย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวนอนและแนวตั้งหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยใช้ไม้บรรทัดความละเอียด 0.1 เซนติเมตร อ่านค่าด้วยสายตา แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตรคำนวณขนาดวงใสรอบโคโลนี (ภาพที่ 2) ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



ภาพที่ 2 การวัดวงใสรอบโคโลนี (clear halo)

$$\text{สูตรคำนวณขนาดวงใสรอบโคโลนี} = \frac{(R1+R2) - (r1+r2)}{2}$$

โดย R1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางในแนวนอนของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

R2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางในแนวตั้งของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

r1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวนอน

r2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวตั้ง

2) ตรวจหายีนก่อโรค *cyA* โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Sedgley et al. (2005))

นำเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอและทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นตรวจสอบ DNA ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิลิกโทรโฟเรซิส และนำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจหายีน *cyA* ด้วยเทคนิค PCR โดยในงานวิจัยนี้ใช้นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (nucleotide primers) ดังตารางที่ 1 เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *cyA* ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย $MgCl_2$, Taq DNA polymerase, forward primer, reverse primer, dNTP, DNA template, Buffer และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ กำหนดให้มีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร และใช้สารสกัดดีเอ็นเอ 20 $\mu g/ml$ และใช้สายพันธุ์มาตรฐานเชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 เป็นกลุ่มควบคุมบวก ตรวจสอบ PCR product ด้วยเจลอิลิกโทรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ 80 โวลต์ ในสารละลาย Tris-acetate-EDTA buffer (1X TAE) ซึ่งจะย้อมเจลดึงกล่าวด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจากเครื่องให้กำเนิดแสงยูวีสำหรับวิเคราะห์เจล เพื่อตรวจหายีน *cyA* และรายงานเป็นร้อยละของเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ตัวอย่างที่มียีน *cyA* ทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 1 นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา ยีน *cyIA*

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	คู่เบส (bp)	Tm *** (°C)	เอกสารอ้างอิง
<i>cyIAF</i>	5'-GGTTATGCATCAGATCTCTCAA-3'	81	58	Gilmore et al., 1994
<i>cyIAR</i>	5'-CTGTATATAATCTACTTTTTCAGA AGATAATTC-3'			

3) ตรวจหาการแสดงออกของยีนก่อโรค *cyIA* ด้วยวิธี real-time PCR (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Wang et al. (2011)) นำเชื้อ *E. faecalis* มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอตัวอย่างด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของอาร์เอ็นเอเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาค่า mRNA ของยีน *cyIA* ด้วยเครื่อง Real-Time PCR ไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ตรวจสอบดังตารางที่ 1 และใช้สายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* ATCC 19433 (gene+) เป็นกลุ่มควบคุมบวก รวมถึงยีน 16s rRNA (forward primer: 5'-CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG-3' และ reverse primer: 5'-CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC3') 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำยา One-Step Real-time qPCR ปริมาตร 11.5 ไมโครลิตร RNase-free water ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร นำค่า threshold cycles (CT) มาวิเคราะห์ค่า mRNA ของยีนก่อโรค

คำนวณได้จากสูตร $\Delta\Delta CT = (CT_{cyIA} - CT_{16s\ rRNA})_{Sample\ A} - (CT_{Control} - CT_{16s\ rRNA})_{Sample\ O}$

(Sample A: เชื้อ *E. faecalis* แต่ละสายพันธุ์ตัวอย่าง; Sample O: สายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* ATCC 19433 (*cyIA*⁺)) ซึ่งค่าการแสดงออกของยีนจะออกมาเป็นจำนวนเท่า $2^{-\Delta\Delta CT}$ ทำซ้ำ 2 ครั้ง

4) การวิเคราะห์ข้อมูล จะใช้สถิติพรรณนาและใช้สถิติเชิงวิเคราะห์ โดยรายงานเป็นร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ที่มีฟิโนไทป์ของยีน *cyIA* รายงานร้อยละของจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cyIA* และในการเปรียบเทียบฟิโนไทป์และการแสดงออกของยีน *cyIA* ของเชื้อ *Ef.S* และ *Ef.D* จะใช้สถิติ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เนื่องจากข้อมูลที่ได้มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ

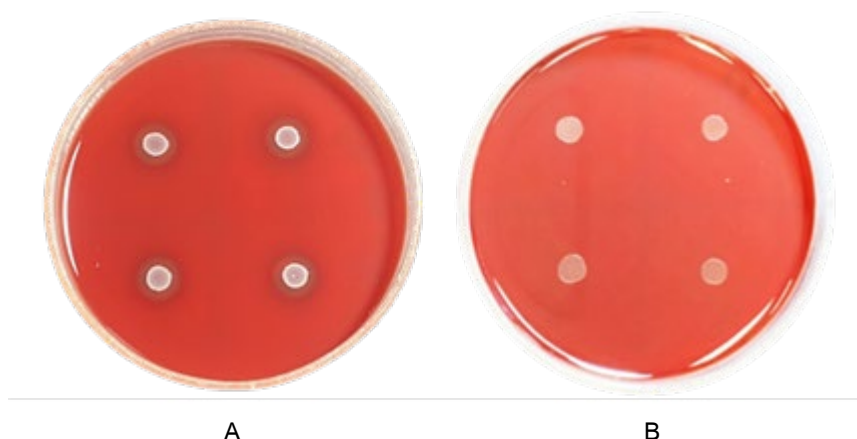
ผลการวิจัย

การทดสอบการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด

พบว่า เชื้อ *Ef.S* และ *Ef.D* สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ร้อยละ 30.56 (11/36 สายพันธุ์) และร้อยละ 27.78 (5/18 สายพันธุ์) ตามลำดับ (ภาพที่ 3) โดยเชื้อ *Ef.S* มีค่า Med = 0 (0,5.33) mm มีแนวโน้มในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* ค่า Med = 0 (0,4.63) mm แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test [Med (Min,Max)] (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การมียีน *cyIA* และระดับการแสดงออกของยีน *cyIA* ของเชื้อ *Ef.S* และ *Ef.D*

ปัจจัยก่อโรค	เชื้อสายพันธุ์ตัวอย่าง	
	<i>Ef.S</i>	<i>Ef.D</i>
ค่าความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (mm.)	0 (0,5.33)	0 (0,4.63)
การมียีน <i>cyIA</i> (%)	100	100
ระดับการแสดงออกของยีน <i>cyIA</i> (folds of induction)	0.93 (0,6670.4)	1.33 (0.41,1376.4)



ภาพที่ 3 A เชื้อ *E. faecalis* ที่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ B เชื้อ *E. faecalis* ที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้

การตรวจหายีนก่อโรคด้วยเทคนิค PCR

พบว่า เชื้อ *Ef.S* และ *Ef.D* ที่แยกจากรอยโรคระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ ทั้งหมดมียีน *cyIA* (36/36 สายพันธุ์) และ (18/18 สายพันธุ์) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

การแสดงออกของยีนก่อโรค *cyIA* ด้วยวิธี real-time PCR

พบว่า เชื้อ *Ef.S* มีค่า Med = 0.93 (0,6670.4) folds of induction มีแนวโน้มระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* ค่า Med = 1.33 (0.41,1376.4) folds of induction แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test [Med (Min,Max)] (ตารางที่ 2)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การตรวจหาฟิโนไทป์ของยีน *cyIA* กล่าวคือ การทดสอบการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด โดยวัดวงไฮรอลโคโลนี พบว่า เชื้อ *Ef.S* มีแนวโน้มในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการตรวจหายีนก่อโรคด้วยเทคนิค PCR พบว่า เชื้อ *Ef.S* และ *Ef.D* ที่แยกจากรอยโรคระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ มียีน *cyIA* ทุกสายพันธุ์ ร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (Zhu et al., 2010; ทักษิธร วงศ์ศิริธูเดช, 2563) ส่วนการทดสอบการแสดงออกของยีน *cyIA* ด้วยวิธี real-time PCR พบว่าเชื้อ *Ef.S* (0.93 (0,6670.4) folds of induction) จะมีแนวโน้มระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* (1.33 (0.41,1376.4) folds of induction) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการทดสอบได้ให้ผลที่เป็นไปในแนวทางเดียวกันว่า เชื้อ *Ef.S* มีแนวโน้มในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการแสดงออกของยีน *cyIA* ที่สูงกว่าเชื้อ *Ef.D* ซึ่งได้ยืนยันสมมติฐานการวิจัยที่ว่า เชื้อ *Ef.S* และ *Ef.D* จะมีฟิโนไทป์ และการแสดงออกของยีน *cyIA* แตกต่างกัน โดยอาจเป็นผลมาจากการที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันของเชื้อ *Ef.S* ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกว่าเชื้อที่พบในคลองรากฟันและในร่องลึกปริทันต์เป็นตัวเดียวกัน กล่าวคือ เชื้อ *Ef.S* สามารถเคลื่อนที่ไปมาและแทรกผ่านช่องทางติดต่อต่างๆในรอยโรคระหว่างเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ได้ และสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพในทั้งสองเนื้อเยื่อได้ จึงมีแนวโน้มในการมีปัจจัยก่อโรคที่มากกว่าเชื้อ *Ef.D* ซึ่งเชื่อดังกล่าวอาจมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคที่รุนแรง

และเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่ศึกษาทั้งหมดล้วนมียีน *cyIA* ทุกสายพันธุ์ แต่กลับมีการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงเพียงร้อยละ 29.63 (16/54 สายพันธุ์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecalis* บางสายพันธุ์ที่มียีนแต่ไม่แสดงฟิโนไทป์ออกมาและเพื่อให้เกิดความเข้าใจในปรากฏการณ์ดังกล่าวมากขึ้น จึงต้องมาดูที่ค่าการแสดงออกของยีน *cyIA*

โดยหากพิจารณาเพียงปัจจัยการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยไม่คำนึงลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน (*Ef.S*) และต่างกัน (*Ef.D*) ในคลองรากฟันและร่องลึกปริทันต์ จะพบว่าเชื้อกลุ่มที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Hemolysis) จะมีระดับการแสดงออกของยีน *cyIA* มากกว่าเชื้อที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Non-Hemolysis) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *E. faecalis* ที่มีค่าการแสดงออกของยีนต่ำหรือไม่พบการแสดงออกของยีนเลย จะไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ และเชื้อ *E. faecalis* ที่มีค่าการแสดงออกของยีนสูง จะสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน *cyIA* กับความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นเป็นไปในแนวทางเดียวกัน จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า กระบวนการผลิตสารไซโตไลซินเพื่อย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น จำเป็นต้องอาศัยยีนที่เกี่ยวข้องทั้ง 5 ยีน (Hällgren A et al., 2009) ซึ่งอยู่ภายใน *cyI* operon โดยมียีน *cyLL* และ *cyLS* เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารไซโตไลซิน ยีน *cyIM* มีหน้าที่ดัดแปลงโปรตีนหลังจากผลิตสารไซโตไลซิน ยีน *cyIB* มีหน้าที่ขนส่งสารไซโตไลซิน และยีน *cyIA* มีหน้าที่กระตุ้นไซโตไลซินให้เกิดการย่อยสลาย เซลล์เม็ดเลือดแดง (Eaton & Gasson, 2001) ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้จึงคาดการณ์ว่า เชื้อ *E. faecalis* ที่มียีน *cyIA* แต่ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ อาจมี *cyI* operon ไม่ครบทั้ง 5 ยีน จึงทำให้เชื้อ *E. faecalis* ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ อีกทั้งผู้วิจัยไม่ได้ศึกษา *cyI* operon ครบทุกยีน จึงไม่สามารถทราบถึงยีน *cyI* ตัวอื่นได้

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

ควรศึกษายีนก่อโรคชนิดอื่นเพิ่มเติม เช่น *asa1*, *ace*, *esp* และ *gelE* รวมถึงศึกษาฟิโนไทป์และการแสดงออกของยีนนั้นๆ ด้วย รวมถึงศึกษาปัจจัยการก่อโรคอื่นๆ เช่น การดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เพื่อให้เกิดความเข้าใจในบทบาทของกลไกการก่อโรคอย่างเป็นระบบและสามารถอธิบายถึงปรากฏการณ์ต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ถือเป็นองค์ความรู้สำหรับการค้นคว้าและพัฒนาสารต้านจุลชีพที่สามารถกำจัดการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *E. faecalis* ได้อย่างตรงจุดและมีประสิทธิภาพมากขึ้น นำไปสู่การวางแผนการรักษาที่เหมาะสมกับพื้นที่มีรอยโรคร่วมระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์ เพื่อให้การรักษาคลองรากฟันมีอัตราความสำเร็จที่สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- พรชนก ศรีสังข์. (2565). ความชุกของเชื้อพอไฟโรโมนเนส จิงจิวัลิส ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีโอแทม และเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ในรอยโรคร่วมระหว่างโรคเนื้อเยื่อในและโรคปริทันต์โดยวิธี Real-Time PCR. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- หทัยภัทร วงศ์หิรัญเดชา. (2563). ยีนก่อโรคและฟิโนไทป์ของเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส สายพันธุ์ที่แยกจากคลองรากฟันที่ล้มเหลวจากการรักษาและมีรอยโรคปลายราก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67(4), 1628-1635.
- 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. *Journal of bacteriology*, 176(23), 7335-7344.
- Hällgren, A., Claesson, C., Saeedi, B., Monstein, H. J., Hanberger, H., & Nilsson, L. E. (2009). Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolyisin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(5), 323-332.

- 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., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 462-478.
- Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(5), 308-320.
- Kipioti, A., Nakou, M., Legakis, N., & Mitsis, F. (1984). Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 58(2), 213-220.
- Langeland, K., Rodrigues, H., & Dowden, W. (1974). Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 37(2), 257-270.
- Rovai, E. D. S., Matos, F. D. S., Kerbauy, W. D., Cardoso, F. G. D. R., Martinho, F. C., Oliveira, L. D. D., ... & Carvalho, C. A. T. (2019). Microbial profile and endotoxin levels in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement. *Brazilian dental journal*, 30(4), 356-362.
- Sedgley, C. M., Molander, A., Flannagan, S. E., Nagel, A. C., Appelbe, O. K., Clewell, D. B., & Dahlén, G. (2005). Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral microbiology and immunology*, 20(1), 10-19.
- Simon, J. H., Glick, D. H., & Frank, A. L. (1972). The relationship of endodontic-periodontic lesions. *The Journal of Periodontology*, 43(4), 202-8.
- Simring, M., & Goldberg, M. (1964). The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis. *The Journal of Periodontology*, 35(1), 22-48.
- Souto, R., & Colombo, A. P. V. (2008). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of oral biology*, 53(2), 155-160.
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., & Shankar, N. (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(12), 2622-2636.
- 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. *Journal of endodontics*, 37(5), 631-636.
- 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. *Journal of endodontics*, 36(12), 1950-1955.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2024 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).