การจำแนกเชื้อและการตรวจหายีนก่อโรคด้วยวิธีอณูวิทยาในแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิด

Bacterial Identification and Molecular Detection of Virulence Genes in Bacteria Isolated from Infant Feces

มารุตพงศ์ ปัญญา[1*] และ วีระพงศ์ ลุลิตานนท์[2]

[1]วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190

[2]ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

*Email : Marutpong.p@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกเชื้อและตรวจหายีนก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลตที่แยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิด เทคนิคที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ เทคนิคทางอณูวิทยาปฏิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือ PCR การจำแนกเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์มียีนเป้าหมาย คือ 16s ribosomal DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตเป็นเชื้อ *Enterococcus faecalis* ส่วนการตรวจหายีนก่อโรค ทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *cyl*A *ace agg esp* และ *gel*E โดยวิธี PCR พบว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมียีนก่อโรคอย่างน้อย 1 ยีน ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *E. faecalis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในบริเวณลำไส้ของคนมียีนก่อโรค และอาจเป็นแหล่งในการถ่ายทอดยีนไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้

คำสำคัญ : เอ็นเทอโรคอคไค เอ็นเทตโรคอคคัส ฟีคาลิส ยีนก่อโรค ปฏิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส

Abstract

This study aimed to identify and detect pathogenic genes in bacterial strains which were isolated from feces of healthy infants. The techniques used to detect the genes in this research are PCR technique and DNA sequencing. Bacterial species identification was performed by 16s ribosomal DNA amplification, sequencing and analysis. It was found that all bacterial isolates were identifies as *Enterococcus faecalis.* At least one pathogenic gene of the genes (*cyl*A, *ace*, *agg*, *esp* and *gel*E) were found in all bacterial isolates. This research demonstrated that *E. faecalis*, a normal flora in human's intestine, had pathogenic genes which could be transferred to other bacterial species.

Keywords : Enterococci; *Enterococcus faecalis*; virulence gene; polymerase chain reaction

บทนำ

แบคทีเรียในจีนัส enterococci เป็นสมาชิกในไฟลัม *Firmicutes* มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (Gram positive cocci) ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase negative) ประกอบด้วยสมาชิกหลายสปีชีส์ ได้แก่ *E. faecalis* *E. faecium* *E. avium* *E. durans* *E. gallinarum* *E. casseliflavus* *E. raffinosus* *E. mundtii* *E. hirae* และ *E. malodoratus* [1]

เชื้อ enterococci คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ดิน และน้ำ พืช และจากแหล่งอาหารชนิดต่างๆ [2] การศึกษาชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในบริเวณลำไส้ของคนโดยใช้ตัวอย่างอุจจาระ (fecal microbiota) พบว่ามีความหลากหลาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ วิธีการเกิด โภชนาการ และพันธุกรรม เป็นต้น จุลินทรีย์ที่พบเป็นกลุ่มหลักในวัยผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีประกอบด้วยแบคทีเรียในไฟลัม *Bacteroidetes* และ *Firmicutes* ส่วนในเด็กแรกเกิด คือ สกุล *Eubacterium Ruminococcus Clostridium* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น [3] อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแต่ละชนิดจำเป็นต้องทำการแยกเชื้อเพื่อจะได้นำไปศึกษาคุณลักษณะที่จำเพาะต่อไปได้

เชื้อ enterococci บางสายพันธุ์ถูกพิสูจน์แล้วว่ามีคุณสมบัติที่ดีและสามารถนำไปใช้เป็นโพรไบโอติคในคนได้ [4] แต่บางสายพันธุ์พบว่าสามารถก่อโรคในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งเป็นสปีชีส์หลักในการก่อโรคในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) [5][6] และมักเป็นเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ทำให้ยากต่อการรักษา [7] โดยเชื้อ *E. faecalis* ก่อโรคได้ในหลายระบบ [8] ทั้งนี้ปัจจัยที่ทำให้เชื้อก่อโรคเนื่องจากเชื้อมียีนก่อโรค (virulence gene) ชนิดต่างๆ ทั้งยีนดื้อยาปฏิชีวนะ เช่น vancomycin [9] ยีนที่ส่งเสริมการเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์ ได้แก่ extracellular surface protein encoding gene (*esp*) และ adhesion of collagen (*ace*) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่ม (aggregation, *agg*) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน (cytolysinA, *cyl*A) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ แล้วมีผลทำให้เกิดการติดเชื้อได้ดีขึ้น (gelatinaseE, *gel*E)

การศึกษาก่อนหน้านี้ของมารุตพงศ์ และคณะ [10] พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียซึ่งมีคุณสมบัติเป็น gram positive cocci และ catalase negative ได้จำนวน 180 ไอโซเลต โดยในจำนวนนี้มีเชื้อจำนวน 14 ไอโซเลต ที่แสดงลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงคน และพบการดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด ดังนั้นเชื้อเหล่านี้อาจจะมียีนก่อโรคบรรจุอยู่ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีความน่าสนใจในการตรวจหายีนก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *esp ace agg cyl*A และ *gel*E ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการจำแนกเชื้อด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งแบคทีเรียที่ทำการศึกษาทั้งหมดมีจำนวน 14 ไอโซเลต

วัตถุประสงค์

เพื่อจำแนกเชื้อและตรวจหายีนก่อโรคในเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอุจจาระของคนด้วยวิธีการทางอณูวิทยา

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียบริสุทธิ์ (pure culture) จำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลต ที่แยกจากอุจจาระของเด็กแรกเกิดอายุระหว่าง 8-10 วัน ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว deMan, Rogosa and Shape (MRS) broth (LAB, United Kingdom) ส่วนชนิดแข็ง (MRS agar) เตรียมโดยเติม bacteriological agar ปริมาณ 15 g/L ลงใน MRS broth

เพาะเลี้ยงเชื้อใน MRS broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงใน MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญจึงนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์

สกัด genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic real DNA extraction (RBC, Taiwan) จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย คือ 16s rDNA ด้วยวิธีการ PCR ซึ่งใช้ primers ดังแสดงในTable1 โดย PCR มีองค์ประกอบ คือ 10X PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 50 mM $MgCl_2$ buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 1.25 mM dNTP ปริมาตร 8 ไมโครลิตร 10 μM forward (F) primer และ 10 μM reverse (R) primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase จำนวน 0.02 ยูนิต ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นชนิด DNase-free water ให้ได้ 50

ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR เป็นจำนวน 30 รอบ โดยมีสภาวะดังแสดงในTable2 ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1% ในสารละลาย 1X TAE ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 volt เป็นเวลา 27 นาที นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC) และส่งทำ DNA sequencing ที่บริษัท FirstBase ประเทศมาเลเซีย (http://www.base-asia.com/)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับเบสในส่วน 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตกับลำดับเบส 16s rDNA ของเชื้อในฐานข้อมูล National center for Biotechnology Information (NCBI data base) ผ่านโปรแกรม Blast search (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อวิเคราะห์และจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ต่อไป

3. การตรวจหายีนก่อโรค

การตรวจหายีนก่อโรค ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย จำนวน 5 ยีน ได้แก่ cytolysinA (*cylA*) Collagen adhesion precursor (*ace*) Cell aggregation and conjugation (*agg*) Cell-wall-associated protein involved in immune evasion (*esp*) และ gelatinaseE (*gel*E) ทำโดยนำ genomic DNA ไปทำ PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 1 และมีสภาวะดังแสดงใน Table 2

Table 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละยีน

Gene		Primer (5'→3')	Size (bp)	Reference
16s rDNA	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAC	1500	[11]
	R	GGTTACCTTGTTACGCTT		
ace	F	CCGAATTGAGCAAAAGTTC	746	[12]
	R	AGTGTAACGGACGATAA		
agg	F	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	923	[12]
	R	ACCTACAGCGTCCCAATCAC		
esp	F	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933	[13]
	R	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		
cylA	F	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517	[14]
	R	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA		
gelE	F	AATTGCTTTACACGGAACGG	547	
	R	AGCCATGGTTTCTGGTTGTC		

หมายเหตุ F และ R คือ forward และ reverse primer ตามลำดับ bp คือ base pair

Table 2 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละยีน

PCR step	Temperature (Degree Celsius, °C)						Time (min)
	16s rDNA	*ace*	*agg*	*esp*	*cylA*	*gelE*	
Pre-denaturation	95	95	95	95	95	95	5
Denaturation	95	95	95	95	95	95	0.30
Annealing	54	46	48	56	48	53	0.30
Extension	72	72	72	72	72	72	1 for 16s rDNA
							0.35 for *ace*
							0.40 for *agg* and *esp*
							0.25 for *cylA* and *gelE*
Final extention	72	72	72	72	72	72	7

4. การขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ณ วันที่ 30 พฤษภาคม 2556 โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (declaration of Helsinki)

ผลการวิจัย

ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิด ด้วยวิธีการทางอณูวิทยา โดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายตรงตำแหน่งยีน 16s rDNA และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ DNA sequencing ซึ่งแบคทีเรียมียีน 16s rDNA ขนาดสมบูรณ์อยู่ประมาณ 1,500 bp. (Figure1)

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* ทั้งหมด ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ว่าเป็นเชื้อดังกล่าวนั้น มีหลักการ คือ อาศัยค่าร้อยละความเหมือนหรือ percent of identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16s rDNA gene ระหว่างเชื้อไอโซเลตกับเชื้อที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI ผ่านการวิเคราะห์โดยโปรแกรม blast ซึ่งหากเปรียบเทียบแล้วพบว่ามีค่าความเหมือนตั้งแต่ 97% ขึ้นไป ให้จำแนกว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น ซึ่งเชื้อทุกไอโซเลตในการวิจัยครั้งนี้พบว่ามีค่าความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16s rDNA gene ของเชื้อ *E. faecalis* ตั้งแต่ 97% ทุกไอโซเลต ดังแสดงในTable 3 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *E. faecalis*

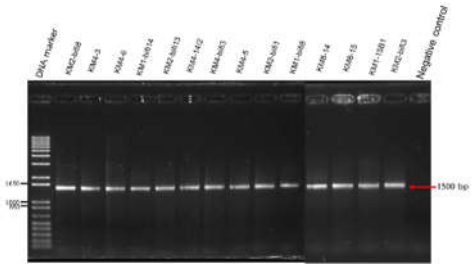

Figure 1 ผลการตรวจหายีน 16s rDNA ในเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 14 ไอโซเลต ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งขยีน 16s rDNA ที่ตรวจพบในดีเอนเอตัวอย่าง ขนาดประมาณ 1500 bp เปรียบเทียบกับ DNA marker ซึ่งแสดงเฉพาะดีเอนเอขนาด 850 1000 และ 1650 bp

Table 3 ผลการจำแนกเชื้อ 14 ไอโซเลต โดยเปรียบเทียบความเหมือนของยีนส่วน 16s rDNA กับเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูล NCBI database

Isolate	Gene similarity in NCBI data base*	% of identity	Identified bacteria
KM2-bifi8	*Enterococcus faecalis* strain Na15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	*Enterococcus faecalis*
KM4-3	*Enterococcus faecalis* strain Shbam40 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	*Enterococcus faecalis*
KM4-6	*Enterococcus faecalis* isolate EntDWW 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	*Enterococcus faecalis*
KM1-bifi14	*Enterococcus faecalis* strain JF85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	*Enterococcus faecalis*
KM2-bifi13	*Enterococcus faecalis* strain Na15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	*Enterococcus faecalis*
KM4-14/2	*Enterococcus faecalis* strain Na15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	*Enterococcus faecalis*
KM4-bifi3	*Enterococcus faecalis* strain Na15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	*Enterococcus faecalis*
KM4-5	*Enterococcus faecalis* strain FMA604 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	*Enterococcus faecalis*
KM2-bifi1	*Enterococcus faecalis* strain FMA444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	*Enterococcus faecalis*
KM1-bifi 8	*Enterococcus faecalis* strain Na15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	*Enterococcus faecalis*
KM8-14	*Enterococcus faecalis* strain Shbam40 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99	*Enterococcus faecalis*
KM8-15	*Enterococcus faecalis* strain P26-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	*Enterococcus faecalis*
KM1-15B1	*Enterococcus faecalis* strain ZL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	*Enterococcus faecalis*
KM2-bif3	*Enterococcus faecalis* strain ZL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	*Enterococcus faecalis*

*แสดงผลเฉพาะยีนที่มีความเหมือนมากที่สุด

ผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยรุนแรงของการก่อโรค (virulent gene) ทั้ง 5 ยีน ได้แก่ *cylA ace agg esp* และ *gel*E ในเชื้อ *Enterococcus faecalis* จำนวน 14 ไอโซลเลต โดยใช้เทคนิค PCR และ gel electrophoresis พบว่าในจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ทั้ง 14 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตจะมี virulent gene อย่างน้อยหนึ่งชนิด ดังแสดงใน Figure 2

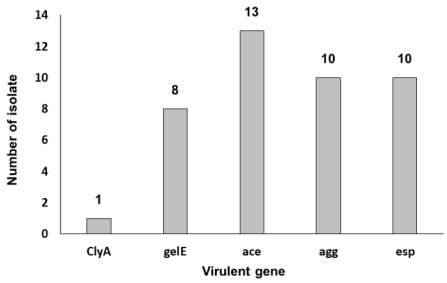

Figure 2 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและจำนวนของ virulent gene ที่ตรวจพบในเชื้อ *Enterococcus faecalis* จำนวน 14 ไอโซเลต

โดยพบว่ายีน *cylA* ซึ่งมีขนาด 517 bp ตรวจพบได้ในเชื้อ *E. faecalis* ไอโซเลต KM2-bifi3 เท่านั้น (Figure3) ยีน *ace* ซึ่งมีขนาด 746 bp สามารถตรวจพบได้ในเชื้อ *E. faecalis* เกือบทุกไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลต KM2-bifi8 (Figure4) ยีน *gel*E ซึ่งมีขนาด 547 bp ตรวจพบได้ในเชื้อ *E. faecalis* จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ KM4-3 KM4-6 KM4-14/2 KM4-bifi3 KM4-5 KM8-14 KM8-15 และ KM1-15B1 (Figure5) ส่วนยีน *esp* ซึ่งมีขนาด 933 bp ตรวจพบได้ในเชื้อ *E. faecalis* จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ KM2-bifi8 KM1-bifi14 KM2-bifi13 KM4-bifi3 KM2-bifi1 KM1-bifi8 KM8-14 KM8-15 KM1-15B1 และ KM2-bifi3 (Figure6) และยีน *agg* ขนาด 923 bp ตรวจพบได้ในเชื้อ *E. faecalis* จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ KM2-bifi8 KM1-bifi14 KM2-bifi13 KM4-14/2 KM2-bifi1 KM1-bifi8 KM8-14 KM8-15 KM1-15B1 และ KM2-bifi3 (Figure7)

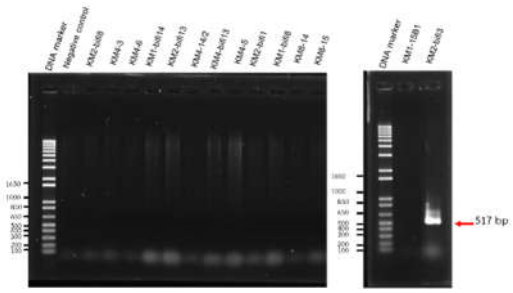

Figure3 ผลการตรวจหายีนรุนแรง *cyl*A ในแบคทีเรีย จำนวน 14 ไอโซเลต DNA marker แสดงเฉพาะดีเอนเอขนาด 100 200 300 400 500 650 850 1000 และ 1650 bp. ลูกศรแสดงตำแหน่งของยีน *cyl*A ที่ตรวจพบในตัวอย่าง ขนาด 517 bp.

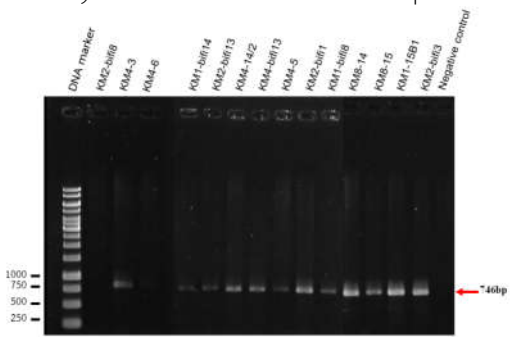

Figure 4 ผลการตรวจหายีน *ace* ในเชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลต DNA marker แสดงเฉพาะดีเอนเอขนาด 250 500 750 และ 1000 bp. ลูกศรแสดงตำแหน่งของยีน ace ที่ตรวจพบในตัวอย่าง ขนาด 746 bp.

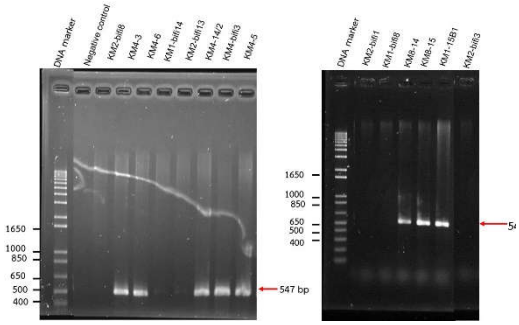

Figure5 ผลการตรวจหายีน *gel*E ในเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 14 ไอโซเลต DNA marker แสดงเฉพาะดีเอนเอขนาด 400 500 650 850 1000 และ 1650 bp. ลูกศรแสดงตำแหน่งของยีน *gel*E ที่ตรวจพบในตัวอย่าง ขนาด 547 bp

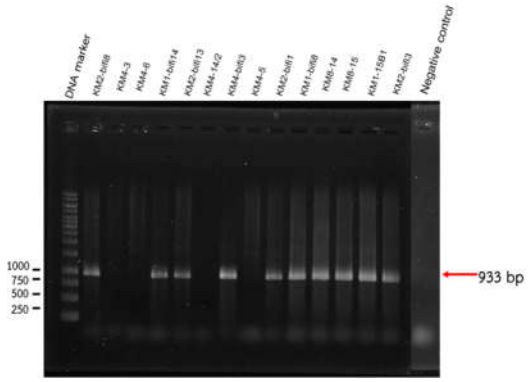

Figure 6 ผลการตรวจหายีน *esp* ในเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 14 ไอโซเลต DNA marker แสดงเฉพาะดีเอนเอขนาด 250 500 750 และ 1000 bp ลูกศรแสดงตำแหน่งของยีน *esp* ที่ตรวจพบในตัวอย่าง ขนาด 933 bp

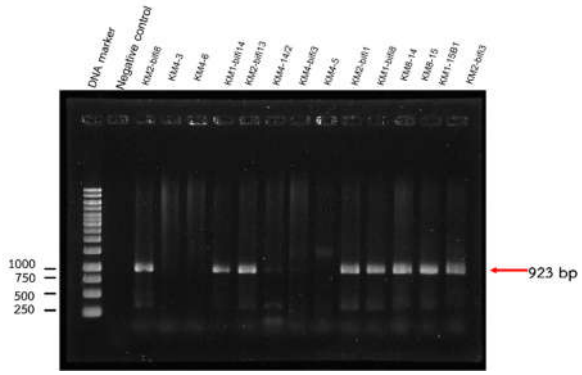

Figure7 ผลการตรวจหายีน *agg* ในเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 14 ไอโซเลต DNA marker แสดงเฉพาะดีเอนเอขนาด 250 500 750 และ 1000 bp ลูกศรแสดงตำแหน่งของยีน *agg* ที่ตรวจพบในตัวอย่าง ขนาด 923 bp

สรุปและเสนอแนะ

การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในบริเวณลำไส้ของคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กแรกเกิด พบว่าชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในเด็กแรกเกิดที่คลอดด้วยวิธีการตามธรรมชาติ (vaginal delivery) จะมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น สกุล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มากกว่าเด็กที่เกิดด้วยวิธีการผ่าตัด (cesarean delivery) [15] อย่างไรก็ตามชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่พบ

ในช่วงอายุที่มากขึ้นจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องโภชนาการ [16]

การศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย เกี่ยวกับการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนในอุจจาระของเด็กแรกเกิด พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก (probiotic) และยังพบแบคทีเรียซึ่งมีคุณสมบัติในการก่อโรคจำนวน 14 ไอโซเลต จึงเป็นจุดสนใจในการนำเชื้อดังกล่าวมาศึกษาในเชิงลึกต่อไป

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลต ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนยีนที่ตำแหน่ง 16s rDNA ซึ่งมีขนาด 1500 bp ด้วยวิธีการ PCR ตามด้วยการทำ DNA sequencing และการวิเคราะห์ลำดับเบสทางชีวสารสนเทศ โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการการจำแนกเชื้อที่น่าเชื่อถือ ผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตในงานวิจัยครั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis*

เชื้อ *E. faecalis* จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) และพบเป็นปัญหาของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยพบว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลมักเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น vancomycin และ high level gentamicin resistant (HLGR) [17] นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์รุนแรงและก่อโรคติดเชื้อและแพร่กระจายในโรงพยาบาลมักจะมียีนก่อโรค บรรจุอยู่ [18] อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolate) มักจะมียีนก่อโรคบรรจุอยู่มากกว่าในเชื้อที่คัดแยกได้จากอุจจาระของคนที่มีสุขภาพแข็งแรง หรือแม้กระทั่งจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ[19]

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการก่อโรคของเชื้อ *E. faecalis* หรือที่เรียกว่ายีนรุนแรงหรือยีนก่อโรค (virulent gene) นั้น ได้แก่ ยีน *esp ace agg cyl*A และ *gel*E พบว่าในจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ทั้ง 14 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตจะมี virulent gene อย่างน้อยหนึ่งชนิดบรรจุอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *E. faecalis* ไอโซเลต KM2-bifi3 พบว่ามียีนดังกล่าวทั้ง 5 ชนิดบรรจุอยู่ โดยความสำคัญของยีนก่อโรคนั้นพบว่ายีน *cylA* เป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีนไซโตไลซิน (cytolysin) ซึ่งทำหน้าที่ทำลายเนื้อเยื่อและเป็นสาเหตุของการก่อโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) [12] ส่วนยีน *gelE* เป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีนเจลาติเนส (gelatinase) ซึ่งมีผลทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพลดลง [13]

ผลการตรวจหายีนก่อโรคในงานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecalis* ที่ถึงแม้จะเป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายคนปกติ แต่ก็อาจกลายเป็นแหล่งของยีนก่อโรคชนิดต่างๆและส่งเสริมให้เชื้อกลายเป็นเชื้อสาเหตุโรคติดเชื้อในคนได้ นอกจากนี้งานวิจัยที่น่าสนใจคือการศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างคุณสมบัติทาง genotypic และ phenotypic ของเชื้อทุกไอโซเลต ทั้งนี้จะได้เปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *E. faecalis* ที่มีและไม่มียีนก่อโรคว่าแตกต่างกันอย่างไร หรือแม้กระทั่งศึกษาลำดับเบสในยีนก่อโรคแต่ละชนิดว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือการกลายพันธุ์ (mutation) หรือไม่ ซึ่งคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการวิจัยขั้นสูงเกี่ยวกับเรื่องนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

[1] Tsiodras, S. and et al. 2000. “Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species”. **J Clin Microbiol**. 38(11):3991-3993.

[2] Medeiros, A.W. and et al. 2014. “Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil”. **Braz J Microbiol**. 45(1):327-332.

[3] Lloyd-Price, J. Huttenhower C. and AbuAli, G.. 2016. “The healthy human microbiome”. **Genome Med**. 8(1):51.

[4] Franz, C.M. and et al. 2011. “Enterococci as probiotics and their implications in food safety”. **Int J Food Microbiol**. 151(2):125-140.

[5] Samuelsson, A. and et al. 2003. “Clustering of enterococcal infections in a general intensive care unit”. **J Hosp Infect**. 54 (3):188-195.

[6] Butler, K.M. 2006. “Enterococcal infection in children”. **Semin Pediatr Infect Dis**. 17(3):128-139.

[7] Marothi, Y.A., Agnihotri, H. and Dubey, D. 2005. “Enterococcal resistance--an overview”. **Indian J Med Microbiol**. 23 (4):214-219.

[8] Vankerckhoven, V. 2004. “Development of a multiplex PCR for the detection of *asa*1, *gel*E, *cyl*A, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*”. **J Clin Microbiol**. 42(10):4473-4479.

[9] Huycke, M.M., Sahm, D.F. and Gilmore, M.S. 1998. “Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future”. **Emerg Infect Dis**. 4(2):239-249.

[10] Panya, M. and et al. 2014. “In vitro probiotic characterization of *Enterococcus* species Isolated from Feces of Thai Breast-Fed Infant”. **Journal of Science & technology, Ubon Ratchathani University**. 16(3):38-45.

[11] Cai, H. and et al. 2007. “Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity”. **Microbiology**. 153(8):2655-2665.

[12] Lindenstrauss, A.G. et al. 2011. “Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium”*. **Syst Appl Microbiol**. 34(8):553-560.

[13] Eaton, T.J. and 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.

[14] Tan, Q. and et al. 2013. “Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough”. **J Food Sci**. 78(4):M587-93.

[15] Kuang, Y-S. and et al. 2016. “Composition of gut microbiota in infants in China and global comparison”. **Scientific Reports**. 6:36666. doi:10.1038/ srep 36666.

[16] Azad, M.B. and et al. 2013. “Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months”. **Canadian Medical Association Journal**. 185(5):385-394.

[17] Viagappan, M. and Holliman, R.E. 1999. "Risk factors for acquisition of gentamicin-resistant enterococcal infection: a case-controlled study". **Postgrad Med J**. 75(884):342-345.

[18] Willems, R.J. and et al. 2001. "Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals". **Lancet**. 357(9259):853-855.

[19] Al-Talib, H. and et al. 2015. "Genotypic variations of virulent genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from three hospitals in Malaysia". **Adv Clin Exp Med**. 24(1):121-127.