การแยกและศึกษาลักษณะของไลติกเฟจ ที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ

Isolation and characterization of lytic phages against antibiotic-resistant *Escherichia coli*

นริศรา ปัดภัย ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*Email: rattanachaikunsopon@yahoo.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติกเฟจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* ดื้อยาปฏิชีวนะชนิด extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (ESBL-*E.coli*) โดยทำการแยกแบคเทอริโอเฟจ จากน้ำและน้ำเสียโดยวิธี enrichment method และ double agar layer method จากการทดลองสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ 7 ชนิด/หรือไอโซเลตจากตัวอย่างน้ำต่างชนิดกัน โดยตั้งชื่อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ว่า EP1, EP2, EP3, EP4, EP5, EP6 และ EP7 ตามลำดับ การศึกษาความสามารถในการบุกรุกแบคทีเรียทดสอบ 17 ชนิดของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี spot test พบว่า แบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตที่แยกได้ (ยกเว้น EP2) สามารถบุกรุกแบคทีเรียได้มากกว่าหนึ่งชนิด เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า แบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตเป็นแบคเทอริโอเฟจใน order *Caudovirales* โดยแบคเทอริโอเฟจ EP1, EP2, EP3, EP5, EP6 and EP7 จัดอยู่ใน family *Siphoviridae* และแบคเทอริโอเฟจ EP4 จัดอยู่ใน family *Podoviridae* การศึกษา one-step growth experiment ทำให้ทราบค่า latent period, burst time และ burst size ของแบคเทอริโอเฟจแต่ละไอโซเลต การศึกษาสารพันธุกรรมของแบค เทอริโอเฟจพบว่า แบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตมีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA และสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จากการศึกษารูปแบบ DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี agarose gel electrophoresis และการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ของแบคเทอริโอเฟจพบว่า แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ทั้งหมดเป็นคนละชนิดกัน ซึ่งบ่งบอกถึงความหลากหลายของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้

คำสำคัญ : ไลติกเฟจ *Escherichia coli* ดื้อยาปฏิชีวนะ การรักษาโรคด้วยแบคเทอริโอเฟจ

Abstract

The objective of this study was to isolate and characterize lytic phages capable of infecting extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (ESBL-*E.coli*). Bacteriophages were isolated from water and wastewater samples using an enrichment protocol and the double agar layer method. Seven bacteriophages from different water samples were detected. They were named EP1, EP2, EP3, EP4, EP5, EP6 and EP7, respectively. The host ranges of the 7 bacteriophages were determined by performing spot tests with 17 bacterial strains. All bacteriophages, except EP2, infected more than one bacterial host. Transmission electron microscopy revealed the bacteriophages belonged to the order *Caudovirales*. Bacteriophage EP1, EP2, EP3, EP5, EP6 and EP7 were members of the family *Siphoviridae*, but bacteriophage EP4 belonged to the family *Podoviridae*. One-step growth experiment

was employed to determine a latent period, a burst time and a burst size of each bacteriophage. All bacteriophages had a double-stranded DNA which was digested with *Eco*RI. DNA restriction patterns by agarose gel electrophoresis and protein profiles by SDS-PAGE of the bacteriophages showed the diversity among the isolated bacteriophages.

Keywords: Lytic phages; Antibiotic-resistant *Escherichia coli*; Phage therapy

บทนำ

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง อยู่ใน family Enterobacteriaceae และจัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe พบได้ในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์เลือดอุ่นเกือบทุกชนิด *E.coli* ส่วนใหญ่มักไม่ทำให้เกิดโรคโดยอาศัยเป็น normal flora ในร่างกายคนและสัตว์ มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) และทำให้เกิดอาการท้องร่วง กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ซึ่งถ่ายทอดโดยการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว นอกจากนี้ *E.coli* ยังสามารถก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารได้ด้วย ได้แก่ โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และโลหิตเป็นพิษ เป็นต้น

E.coli สายพันธุ์ที่ก่อโรคในทางเดินอาหารซึ่งจัดเป็น foodborne pathogen มีหลายสายพันธุ์ อาจเรียกโดยรวมว่า diarrheagenic *E.coli* คือ enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC หรือ Shiga toxin-producing *E.coli* ; STEC) สายพันธุ์ที่รู้จักกันดีคือ *E.coli* O157:H7, enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), enteropathogenic *E.coli* (EPEC), enteroaggregative *E.coli* (EAEC), enteroinvasive *E.coli* (EIEC) และ diffusely adherent *E.coli* (DAEC) [1] เป็นต้น อาการที่พบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ diarrheagenic *E.coli* ได้แก่ ปวดท้องถ่ายเหลวเป็นน้ำ มีแก๊สในกระเพาะอาหาร คลื่นไส้อาเจียน และอาจมีไข้ร่วมด้วย การรักษาโรคติดเชื้อ *E.coli* นิยมใช้ยาในกลุ่ม β-lactam (beta-lactam) ได้แก่ penicillin, amoxicillin และ trimethoprim-sulfamethoxazole เป็นต้น

การรักษาโรคติดเชื้อ *E.coli* ด้วยยาปฏิชีวนะมาเป็นระยะเวลายาวนาน ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์มีการปรับตัวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวาง เนื่องจาก *E.coli* บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ที่ทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้กว้างขวาง จึงเรียก *E.coli* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้หลากหลายชนิดนี้ว่า extended spectrum beta-lactamase *E.coli* หรือ ESBL-producing *E.coli* (ในที่นี้จะขอเรียกสั้นๆ ว่า ESBL-*E.coli*) โดยเอนไซม์ดังกล่าวยังสามารถทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ที่ถูกพัฒนาให้มีความทนทานต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ beta-lactamase แล้ว เช่น cephalosporin ได้ด้วย ด้วยเหตุนี้จึงมักมีผลทำให้การรักษาโรคติดเชื้อ ESBL-*E.coli* ทำได้ลำบาก และเป็นปัญหาในการรักษามากขึ้นทุกที

แนวทางในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการรักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยา คือการพัฒนายาปฏิชีวนะให้มีประสิทธิภาพดีทนต่อการทำลายของเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้าง แต่วิธีนี้ทำได้ค่อนข้างยาก ต้องใช้เวลาในการพัฒนายาที่ค่อนข้างยาวนาน และเมื่อเชื้อมีการปรับตัวได้ ในเวลาอีกไม่นานก็จะสามารถดื้อต่อยาที่ผลิตออกมาใหม่นั้นได้ อีกแนวทางหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากคือ การรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟจ (phage) โดยการค้นหาแบคเทอริโอเฟจที่มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคชนิดนั้นเพื่อนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะ เรียกวิธีการรักษาโรคติดเชื้อด้วยเฟจนี้ว่า phage therapy [2, 3] ซึ่งมีข้อดีเหนือกว่าการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอยู่หลายประการ คือ การหาแบคเทอริโอเฟจจากธรรมชาติ หาได้ง่าย ใช้เวลาไม่นานเมื่อเทียบกับการคิดค้นยาปฏิชีวนะขนานใหม่ แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์ (host) หรือแบคทีเรียค่อนข้างสูง จึงทำลายเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น ไม่ออกฤทธิ์กว้างเช่นที่พบในยา

ปฏิชีวนะซึ่งอาจมีผลข้างเคียงกับ normal flora ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายคนและสัตว์ และการใช้แบคเทอริโอ เฟจค่อนข้างปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อแบคทีเรียเป้าหมายถูกกำจัดหรือทำลายให้หมดไป แบคเทอริโอเฟจนั้นก็จะกลายเป็น inert particles ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อมใดๆ

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีเป้าหมายที่จะตรวจหา แบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย ESBL-*E.coli* โดยจะทำการแยกแบคเทอริโอเฟจจากน้ำ น้ำทิ้ง น้ำเสียจากแหล่งต่างๆ จากนั้นนำแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มาศึกษาคุณสมบัติบางประการ เช่น ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดสารพันธุกรรม เพื่อการจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ ลักษณะการเจริญของแบคเทอริโอเฟจ ตลอดจนโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักของแบคเทอริโอเฟจนั้น ซึ่งคาดว่าข้อมูลเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL-*E.coli* นี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ESBL- *E.coli* เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1. แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ESBL- *E.coli* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้แบคทีเรียนี้เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) สำหรับใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจจากแหล่งน้ำตัวอย่าง และใช้ในการเพิ่มจำนวนและการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้

การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แบคทีเรียทดสอบที่ใช้แสดงไว้ในตารางที่ 1

การเลี้ยง ESBL- *E.coli* ใช้อาหาร NB (Nutrient broth) แบคทีเรียทดสอบใช้อาหาร NB หรือ BHI (Brain heart infusion) (ขึ้นกับชนิดของเชื้อ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองจะเก็บรักษาในอาหารที่เติม glycerol 20 % และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

2.2. การแยกแบคเทอริโอเฟจและการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจในน้ำตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำ/น้ำทิ้ง/น้ำเสียจากแหล่งต่างๆ ประมาณ 100 มิลลิลิตร/แห่ง เพื่อใช้สำหรับแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL- *E.coli* โดยวิธี enrichment menthod [4] ดังนี้ นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสที่ผ่านการกรอง (filtrate 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหาร double strength NB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเชื้อแบคทีเรีย ESBL-*E.coli* ที่บ่มข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง) ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) ไปตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL- *E.coli* โดยวิธี spot test [5] ซึ่งมีขั้นตอนคือ ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงใน ESBL- *E.coli* ที่บ่มข้ามคืน นำไปป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร NA (nutrient agar) ให้ทั่วจานอาหาร จากนั้นหยด filtrate 2 ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร NA รอให้ filtrate 2 ซึมลงในเนื้ออาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากพบ clear zone แสดงว่าใน filtrate 2 มีแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL- *E.coli*

2.3. การนับจำนวนและการเพิ่มจำนวนแบค เทอริโอเฟจ

การนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจใช้วิธี double agar layer plaque assay โดยนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (phage lysate) มาเจือจาง (ten-fold serial dilution) นำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร NA soft agar ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เติม ESBL- *E.coli* ที่บ่มข้ามคืน

ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร NA soft agar ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเทลงบนอาหาร NA agar plate รออาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานจำนวนแบคเทอริโอเฟจในหน่วย plaque-forming unit (pfu)/ml

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage propagation) ทำโดยใช้ loop เขี่ย plaque ใส่ลงใน ESBL-*E.coli* ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ของเหลวที่ได้จากการกรองเรียกว่า phage lysate นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.4. การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ใช้แบคทีเรียทดสอบจำนวน 17 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยวิธี spot test ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หากพบ clear zone แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียชนิดนั้น

2.5. การศึกษารูปร่างแบคเทอริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

แบคเทอริโอเฟจที่จะนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) (JEOL, JEM-1230, Japan) นำมาทำให้มีความเข้มข้นสูง (high titer) โดยใช้เครื่อง freeze dryer วิธีการคือ นำ phage lysate ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่แช่แข็งไว้แล้ว ใส่ลงไปในเครื่อง freeze dryer ประมาณ 2-3 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี double agar layer plaque assay (ควรมากกว่า10^9 pfu/ml) จากนั้นจึงนำไปศึกษาภายใต้กล้อง TEM โดยใช้วิธีการย้อมแบบ negative stain ด้วย uranyl acetate ความเข้มข้น 2 %(w/v) บน carbon coated grid

2.6. การศึกษาการเจริญของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการเจริญของแบคเทอริโอเฟจ (one step grow curve) ทำโดยการนำ ESBL-*E.coli* ที่เจริญอยู่ในระยะ log phage ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเติม phage lysate ซึ่งมีความเข้มข้น $1x10^8$ pfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 และ 330 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ผ่านการกรองไปหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี double agar layer plaque assay และนำปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (pfu/infected cell) ที่นับได้ที่เวลาต่างๆ ไปสร้างกราฟ one-step growth curve เพื่อหาค่า latent period, burst time และ burst size

2.7. การศึกษาโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ

นำ phage lysate มาสกัดโปรตีนโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป All-in-One Purification kit (Norgen Biotek, Ontario, Canada) และเก็บโปรตีนที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ การศึกษาโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ทำตามวิธีของ Laemmli [6]

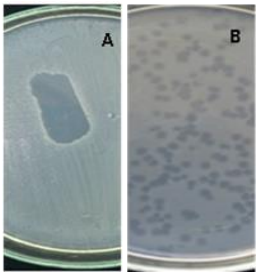
2.8. การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

นำ phage lysate มาสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัด PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ RNase, Nuclease S1 และ restriction endonucleases ตามสภาวะที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์กำหนด (Promega) หลังจากสารพันธุกรรมถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การแยกและการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจจากน้ำตัวอย่าง

จากน้ำตัวอย่างจำนวน 39 ตัวอย่างที่นำมาแยกและตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL-*E.coli* พบว่า มีจำนวน 25 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบ spot test เป็นบวกคือปรากฏ clear zone บนผิวหน้าอาหาร (รูปที่ 1A) และเมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบ spot test เป็นบวกไปตรวจยืนยันการมีแบคเทอริโอเฟจอยู่ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธี double agar layer plaque assay พบว่า มี 7 ตัวอย่างที่พบจุดใส (clear plaque) บนผิวหน้าอาหาร (รูปที่ 1B) แสดงว่าในน้ำตัวอย่างทั้ง 7 นี้น่าจะมีแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL-*E.coli* อยู่จริงและเป็นไลติกเฟจ (lytic phage) เพราะสามารถทำให้เกิดการตายของโฮสต์ [2] ตั้งชื่อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า EP1, EP2, EP3, EP4, EP5, EP6 และ EP7 ตามลำดับ



รูปที่ 1 การทดสอบ spot test ที่ให้ผลบวก (A) และลักษณะ plaque ที่พบบนผิวหน้าอาหารเมื่อทำ double agar layer plaque assay (B)

2. ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจทั้ง 7 ไอโซเลตที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 17 สายพันธุ์ พบว่า แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ด้วย (นอกเหนือจากโฮสต์) โดย EP1, EP3 และ EP5 สามารถทำลายแบคทีเรียอื่นได้อีก 2-3 ชนิด และ EP4, EP6 และ EP7 สามารถทำลายแบคทีเรียอื่นได้อีกอย่างน้อยหนึ่งชนิด ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจทุกไอโซเลตที่แยกได้จึงน่าจะจัดเป็นพวก broad-host-range bacteriophage [7],[8] ยกเว้น EP2 ที่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบจึงน่าจะเป็น narrow-host-range bacteriophage [9] (ตารางที่1)

ตารางที่ 1 ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

Bacteria	EP1	EP2	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7
Gram-negative bacteria							
ESBL-*Escherichia coli*	+	+	+	+	+	+	+
Escherichia coli O157:H7	+	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli ATCC25922	-	-	-	-	-	-	-
Escheichia coli 0001 (phage T4 sensitive)	+	-	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae ATCC27736	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	-	-	-	-	-	-	-
Serratia marcescens ATCC8100	-	-	-	-	+	-	-
Enterobacter aerogenes ATCC13048	-	-	-	-	-	-	-
Proteus vulgaris ATCC29905	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella typhi DMS5784	-	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae DMST15111	-	-	-	-	-	-	-
Shigella flexneri DMST4423	-	-	-	-	-	-	-
Shigella boydii DMST28180	-	-	+	-	-	+	+
Shigella sonnei ATCC11060	-	-	-	-	-	-	-
Gram-positive bacteria							
Staphylococus epidermidis	+	-	+	+	+	-	-
Staphylocoucus aureus ATCC25923	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cerus ATCC11778	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis ATCC6633	-	-	+	-	-	-	-

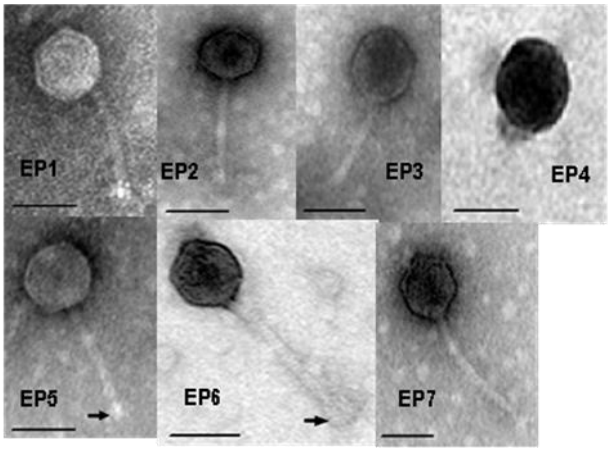
หมายเหตุ + หมายถึง แบคเทอริโอเฟจสามารถทำลายแบคทีเรีย
- หมายถึง แบคเทอริโอเฟจไม่สามารถทำลายแบคทีเรีย

3. การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ

จากการศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ EP1-EP7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ TEM พบว่า แบคเทริโอเฟจทุกตัวเป็น tailed phage จัดอยู่ใน order *Caudovirales* [7] สามารถจัดจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม [9] ดังนี้ แบคเทอริโอเฟจ EP1, EP2, EP3, EP5, EP6 และ EP7 มีหัวแบบ isomeric มีหางยาว จัดอยู่ใน family *Siphoviridae* และ แบคเทอริโอเฟจ EP4 มีหัวแบบ isomeric มีหางสั้น จัดอยู่ใน family *Podoviridae* (รูปที่ 2) ขนาดหัวและความยาวหางของแบคเทอริโอเฟจ แสดงไว้ในตารางที่ 2

4. การเจริญของแบคเทอริโอเฟจ

การนำแบคเทอริโอเฟจแต่ละตัวที่แยกได้มาศึกษาลักษณะการเจริญโดยการสร้างกราฟ one step growth curve เพื่อทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่ไลติกเฟจใช้ในการเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์จนกระทั่งปลดปล่อยแบคเทอริโอเฟจ รุ่นลูก (progeny phage) ออกสู่นอกเซลล์ซึ่งเรียกว่า latent period เวลาที่มีการปล่อยอนุภาคไวรัสออกมากที่สุดในหนึ่งรอบของการเจริญซึ่งเป็นเวลาที่โฮสต์เกิดการแตกสลายไปมากที่สุดเช่นกันเรียกว่า burst time และค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่ปลดปล่อยออกมาต่อแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ (pfu/infected cell) เรียกว่า burst size [10] ผลการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 3



รูปที่ 2 รูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ EP1-EP7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ TEM (Bar = 50 nm)

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจตามสัณฐานวิทยา

Bacteriophages	Family	Head (nm) (WxL)[a]	Tail (nm)
EP1	*Siphoviridae*	56.67x56.67	103.33
EP2	*Siphoviridae*	50x60	120
EP3	*Siphoviridae*	50x55.67	66.67
EP4	*Podoviridae*	43.33x43.33	10
EP5	*Siphoviridae*	56.67x50	96.67
EP6	*Siphoviridae*	50x56	133.33
EP7	*Siphoviridae*	50x56.67	100

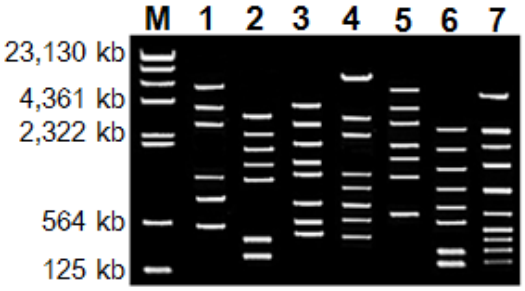
[a] W = ความกว้าง; L = ความยาว

ตารางที่ 3 latent period, burst time และ burst size ของแบคเทอริโอเฟจ

Bacteriophages	Latent period (min)	Burst time (min)	Burst size (pfu/infected cell)
EP1	30	100	410.26
EP2	30	100	794.87
EP3	30	180	632.48
EP4	40	240	367.52
EP5	30	210	1102.56
EP6	30	180	4529.91
EP7	30	210	1188.03

5. ชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

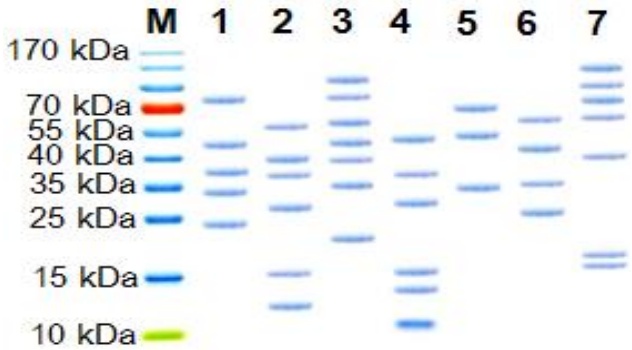
จีโนมของแบคเทอริโอเฟจ EP1-EP7 ถูกตัดได้ด้วย restriction endonuclease *Eco*RI (รูปที่ 3) แต่ไม่ถูกตัดด้วย RNAse ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัด RNA และไม่ถูกตัดด้วย Nuclease S1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัด single stranded DNA (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าจีโนมของแบคเทอริโอเฟจทั้งหมดเป็น double stranded DNA [11]



รูปที่ 3 agarose gel electrophoresis ของจีโนมของแบค เทอริโอเฟจ EP1-EP7 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI (lane M = Lambda DNA cut with *Hind*III ; lane 1-7 = bacteriophage genome EP1-EP7)

6. โปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ

เมื่อศึกษาโปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดมีรูปแบบของแถบโปรตีน (protein profile) ที่ปรากฏบนแผ่น gel แตกต่างกันทั้งในแง่ของจำนวนแถบโปรตีนและ/หรือขนาดของแถบโปรตีน (รูปที่ 4 และตารางที่ 4) ผลการทดลองนี้เป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่ยืนยันว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ทั้งหมดเป็นแบคเทอริโอเฟจคนละชนิดกัน [12]



รูปที่ 4 โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจ EP1-EP7 เมื่อศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE(M = PageRuler Prestained Protein Ladder; 1-7 = proteins of bacteriophage EP1-EP7)

ตารางที่ 4 จำนวนและขนาดของโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ

Bacteriophages	Protein bands	
	No. of bands	Size (kDa)
EP1	5	24, 34, 38,48, 85
EP2	6	13, 16, 28, 38, 40, 60
P3	7	22, 35, 40, 48, 65, 85, 120
EP4	6	12, 14, 17, 30, 38, 48
P5	3	35, 50, 70
EP6	4	26, 35, 42, 63
EP7	7	16, 17, 40, 63, 70, 100, 130

สรุปและเสนอแนะ

การศึกษานี้สามารถแยกไลติกเฟจที่มีความจำเพาะต่อ ESBL-*E.coli* ได้จากธรรมชาติ แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้เหล่านี้แม้ว่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม tailed phage ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ [9] แต่ก็มีความแตกต่างกันทั้งรูปร่างลักษณะการเจริญ และตลอดจนโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง และความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ [2] นอกจากนี้ยังพบว่าแบคเทอริโอเฟจบางตัวที่แยกได้สามารถทำลายโฮสต์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจชนิดหนึ่งจึงน่าจะสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้มากกว่าหนึ่งชนิดด้วย [7, 8] อีกทั้งแบคเทอริโอเฟจต่างชนิดกันแต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดเดียวกัน ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในรูปของ bacteriophage cocktail [13] คือนำมาใช้ร่วมกันเพื่อให้ได้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามหากจะนำแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้ไปใช้งานจริงในสิ่งมีชีวิต จำเป็นต้องมีการศึกษาอีกมากไม่ว่าจะเป็นในแง่ของคุณสมบัติเฉพาะตัวของแบคเทอริโอเฟจ จำนวนแบคเทอริโอเฟจต่อจำนวนโฮสต์เซลล์ที่เหมาะสม (multiplicity of infection; MOI) ความปลอดภัยเมื่อแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต ประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกันของแบคเทอริโอเฟจ (ในกรณีที่ใช้แบค เทอริโอเฟจมากกว่าหนึ่งชนิด) และความเป็นปฏิปักษ์ต่อกันระหว่างแบคเทอริโอเฟจแต่ละตัว เป็นต้น หากแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้งานได้จริงในอนาคตจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยาซึ่งนับวันจะเป็นปัญหาในการรักษามากขึ้นเรื่อยๆ

เอกสารอ้างอิง

[1] Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. “Diarrheagenic *Escherichia coli*”. **Clinical Microbiology Reviews.** 11(1): 142-201.

[2] Kropinski, A.M. 2006. “Phage therapy-Everything old is new again”. **Cannadian Journal of Infectious Disease and Medical Microbiology**. 17(5): 297-306.

[3] Greer, G.G. 2005. “Bacteriophage control of foodborn bacteria”. **Journal of Food Protection**. 68(5): 1102-1111.

[4] Bao, H., Zhang, H. and Wang, R. 2011. “Isolation and characterization of bacte riophages of *Salmonella enteric* serovar Pullorum. **Poutry Science**. 90(10): 2370-2377.

[5] Lu, Z., Breidt, Jr. F., Fleming, H.P., Altermann, E. and Klaenhammer, T.R. 2003. "Isolati on and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕJL-1, from a cucumber fermentation". **International Jo urnal of Food Microbiology**. 84 (2): 225-235.

[6] Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". **Nature**. 227(5259): 680-685.

[7] Garbe, J., Wesche, A., Bunk, B., Kazmierczak, M., Selezska, K., Rohde, C., Sikorski, J., Rohde, M., Jahn, D. and Schobert, M. 2010. "Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginasa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions". **BMC Microbiology**. 10(301): 1-10.

[8] Jensen, E.C., Schrader, H.S., Rieland, B., Thompson, T.L., Lee, K.W., Nickerson, K.W. and Kokjohn, T.A. 1998. "Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans, Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*". **Applied and Environmental Micro biology**. 64(2): 575-580.

[9] Ackermann, H.W. 2003. "Bacteriophage observations and evolution". **Research in Microbiology**. 154: 245-251.

[10] Chow, J.J., Batt, C.A. and Sinskey, A.J. 1988. "Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2". **Applied and Environmental Microbiology**. 54(5): 1138-1142.

[11] Shahrbabak, S.S., Khodabandehlou, Z.,Shah verdi, A.R., Skunik, M., Ackermann, H.W., Varjosalo, M., Yazdi, M.T., and Sepeh rizadeh, Z. 2013. "Isolation, charact erization and complete genome sequence of Phaxl: a phage of *Escherichia coli* O157:H7". **Microbiology**. 159: 1629-1638.

[12] Elshayeb, A.A., Yagoub, S.O., Yousif, A.S., Abedalkareem, E.A., El hag, S.M. and Elagib, A.A. 2011. "Identification of protein profiles of *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and their corresponding phages". **American Journal Biotechnology and Molecular Sciences**. 1(2): 39-44.

[13] Flynn, G.O., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A. 2004. "Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7". **Applied and Environmental Microbiology**. 70(6): 3417-3424.