



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาความชุกและคุณสมบัติของเชื้อ
nontypeable *Haemophilus influenzae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย

โดย ดร. ดวงกมล ชันธเลิศ และคณะ

31 พฤษภาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาความชุกและคุณสมบัติของเชื้อ
nontypeable *Haemophilus influenzae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย

คณะผู้วิจัย

1. ดร. ดวงกมล ชันธเลิศ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ผศ. ดร. สุมาลี พุกษากร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้จะสำเร็จไปไม่ได้ หากขาดการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบพระคุณสำหรับโอกาสที่ให้นแก่นักวิจัยรุ่นใหม่ในการเริ่มต้น เพื่อการพัฒนาศักยภาพในงานวิจัย

ขอกราบพระขอบคุณ ผศ. ดร. สุมาลี พฤษภากร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาเป็นนักวิจัยที่ปรึกษาของโครงการวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณสำหรับการให้คำปรึกษา คำแนะนำที่มีคุณค่ายิ่งกับโครงการวิจัยนี้ ตลอดจนการให้กำลังใจในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณปาริชาติ คำกลอน หัวหน้างานจุลชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ของหน่วยงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก เป็นอย่างสูงสำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และข้อมูลผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอัญชลี สุวานิชย์ สำหรับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง และคำแนะนำที่มีประโยชน์ในการทำ pulsed-field gel electrophoresis

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ตลอดจนให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ที่จำเป็นในการทำงานวิจัยนี้ จนทำให้งานสำเร็จลงได้

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำการทดลองตลอดโครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ

เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางแล้วว่าเชื้อ nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในทางเดินหายใจของคน โดยก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ทั่วโลก เชื้อ nontypeable *H. influenzae* นี้เป็นสาเหตุสำคัญของโรคหุ้้นกลางอักเสบในเด็ก โรคปอดบวมในผู้ใหญ่ โรคไซนัสอักเสบในเด็กและผู้ใหญ่ และโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง เนื่องจากข้อมูลการติดเชื้อของ NTHi ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความชุกและคุณสมบัติของเชื้อ NTHi ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2548 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549 โดยอาศัยเทคนิค PCR-serotyping จากเชื้อ *H. influenzae* 102 isolate พบว่าเป็นเชื้อ NTHi จำนวน 94 (92.16%) isolate และส่วนใหญ่ของเชื้อ NTHi แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วย เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ NTHi ที่ตรวจพบจำนวนหนึ่งมาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดของผู้ป่วย invasive infection และจำนวนที่ตรวจพบนี้ใกล้เคียงกันกับเชื้อ *H. influenzae* serotype b เชื้อ NTHi ในการศึกษาแยกได้จากผู้ป่วยทุกวัย (อายุ 1 ถึง 105 ปี) โดยพบการติดเชื้อในอัตราที่สูงในผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 46 ปีขึ้นไป การศึกษา biotype ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้พบว่าเป็น biotype III 63.83% รองลงมาเป็น biotype II (7.45%), VIII (7.45%), I (6.38%), V (6.38%), IV (5.32%) และ VI (3.19%) ตามลำดับ และ 37 (37.23%) จาก 94 NTHi strains พบว่าดื้อต่อยา ampicillin และ 16 strains (17.02%) ดื้อต่อยา chloramphenicol นอกจากนี้พบการดื้อต่อทั้งยา ampicillin และ chloramphenicol จำนวน 16 (17.02%) isolate เชื้อ NTHi ที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์ β -lactamase โดยคิดเป็นร้อยละ 37.23 ของ NTHi isolate ทั้งหมด และเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ทุก isolate จะดื้อต่อยา ampicillin เชื้อ NTHi ทั้งหมดยังคงมีความไวต่อยา cefotaxime และ ofloxacin จากการศึกษารูปแบบของ outer membrane proteins (OMPs) ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยที่แยกได้ โดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีความหลากหลายมากในการแสดงออกของ OMPs และจากการทำ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ของเชื้อเหล่านี้พบความแตกต่างของ PFGE pattern มากถึง 46 (83.63%) pattern จากจำนวน 55 NTHi isolate ที่นำมาศึกษา ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยเป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่าการบ่งชี้ถึงการระบาดของเชื้อ NTHi ในประเทศไทยยังต้องอาศัยจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ ผลการศึกษาที่ได้รับครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความชุก ความหลากหลายทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ NTHi ในผู้ป่วยไทยที่แยกได้จากโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง จึงสมควรอย่างยิ่งที่จะตระหนักถึงความสำคัญ และบทบาทของ NTHi ในฐานะเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยไทย

Abstract

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) has become a significant human pathogen causing mild to severe respiratory illnesses worldwide. The pathogen is associated with a wide variety of diseases including otitis media in infants and children, pneumonia in adults, sinusitis in children and adults, and lower respiratory tract infection in adults with chronic obstructive pulmonary disease. There has been limited data concerning NTHi infections in Thailand. This study thus carried out to determine the prevalence of, and to characterize the clinical NTHi isolates among Thai patients. One hundred and two strains of *H. influenzae* isolated from patients at a Buddhachinaraj Hospital, Phitsanulok during July, 2005 to August, 2006 were serotyped by PCR. Of 102 isolates, 94 (92.16%) were identified as non(sero)typeable. Most of these NTHi isolates were from sputum. Interestingly, a comparative number of NTHi and *H. influenzae* serotype b isolates was observed among patients with invasive infections. The NTHi population in this study were from patients at all ages (1 year to 105 years), with most of the infections found in patients aged 46 years or over. Biotype analysis showed that the majority (91.67%) of NTHi strains were biotype III. The rest belonged to biotype II (7.45%), VIII (7.45%), followed by biotypes I (6.38%), V (6.38%), IV (5.32%) and VI (3.19%). Thirty-seven (37.23%) out of 94 NTHi strains were resistant to ampicillin, and 16 strains (17.02%) to chloramphenicol. Resistance to both ampicillin and chloramphenicol was present in 16 (17.02%) of NTHi strains. β -lactamase production was detected in 37.23% of isolates. All β -lactamase strains were resistant to ampicillin. However, all NTHi strains were found to be susceptible to cefotaxime and ofloxacin. SDS-PAGE analysis of outer membrane protein profiles showed a marked OMP patterns among Thai NTHi isolates. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis revealed 46 (83.63%) pattern of NTHi 55 isolates studied, suggesting the genetic heterogeneity among Thai NTHi strains. Although additional clinical samples are required to define the burden of NTHi in Thailand, the results in this study suggest the high prevalence of NTHi infections among Thai patients, and that role(s) of NTHi as a significant pathogen should be assessed in Thailand.

Keywords: Nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi, biotypes, β -lactamase, antimicrobial susceptibility, outer membrane proteins, pulsed-field gel electrophoresis

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางแล้วว่า Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) สามารถก่อให้เกิดโรคทางทางเดินหายใจที่รุนแรงหลายชนิด ทั้งในเด็ก ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ (Hardy *et al.*, 2003; Murphy, 2003) ทั้งประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา (Foxwell *et al.*, 1998) NTHi ก่อโรคได้ทั้งที่เป็นแบบ localized และ invasive infection ที่สำคัญได้แก่ otitis media, pneumonia, exacerbation of chronic lung disease, sinusitis, conjunctivitis meningitis, bacteraemia และ postpartum และ neonatal sepsis โดยมีรายงานอัตราการติดเชื้อโดย NTHi สูงขึ้นทุกๆ ปี และสูงกว่าในอดีตที่ผ่านมา ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่นประเทศในแถบอเมริกา ลาตินอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย (Smith-Vaughan *et al.*, 1996; Smith-Vaughan *et al.*, 1997; Bonifacio da Silva and Martin, 2001; O'Neill *et al.*, 2003; Bajanca *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2004) และประเทศที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชีย เช่น ไต้หวัน ญี่ปุ่น ปากีสถาน และ ฟิลิปปินส์ (Chen *et al.*, 1999; Turnak *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2004; Straus *et al.*, 1998, Weinberg *et al.*, 1990) ปัจจุบันการรักษาการติดเชื้อจาก NTHi อาศัยเพียงยาต้านจุลชีพ (antibiotics) เท่านั้น อย่างไรก็ตามมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ NTHi ในอัตราที่สูงในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งในอเมริกา ลาตินอเมริกา ยุโรป และเอเชีย และอัตราการดื้อยาดังกล่าวสูงกว่าเชื้อ *H. influenzae* type b ที่สำคัญในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อ NTHi

ที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันประเทศไทยได้ให้ความสำคัญต่อเชื้อ *H. influenzae* เฉพาะ type b เท่านั้น การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการจึงมุ่งเน้นเฉพาะ *H. influenzae* type b โดยไม่ได้ตระหนักถึงบทบาทสำคัญในฐานะเชื้อก่อโรคของ NTHi เท่าที่ควร ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ประกอบกับมีรายงานเกี่ยวกับ phenotypic และ genotypic diversity ที่หลากหลายของเชื้อ NTHi จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับประเทศไทยที่จะต้องมีการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะในด้านการระบาดวิทยา บทบาทในการก่อโรค คุณสมบัติทาง phenotype และ genotype ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ตลอดจนการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อตัวเชื้อ NTHi ดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ขึ้นเพื่อการศึกษาถึงความชุก และคุณสมบัติทาง genotype และ phenotype (biotype, outer membrane protein และ antibiotic susceptibility) ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลขั้นพื้นฐานในการการเฝ้าระวังเชื้อ และการเตรียมการเพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อนี้ในประเทศไทย และเนื่องจาก outer membrane protein ของ NTHi มีความสำคัญในแง่ของการเป็น target antigen ที่ดีสำหรับ

protective immune response และเป็น adherence factor สำหรับขบวนการ colonization ซึ่งถือว่าเป็น critical step ของการเกิดพยาธิสภาพโดย NTHi การศึกษา outer membrane protein profile ของ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยในโครงการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษารูปแบบการแสดงออก ความหลากหลายของ outer membrane protein กลไกการก่อโรคโดย NTHi (ซึ่งขณะนี้ยังไม่ทราบแน่นอน) ตลอดจนการพัฒนาวัคซีนสำหรับ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในอนาคตต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความชุก และคุณสมบัติทาง phenotype และ genotype ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* (NTHi) ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศูนย์ภาคเหนือตอนล่าง (โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก)

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (specimen)

เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งที่เป็น sterile และ non-sterile site จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (ทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน) ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ของเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2548 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549 พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลของผู้ป่วย ทั้งเพศ อายุ การวินิจฉัยและประวัติการใช้ยา antibiotics (ถ้ามี)

3.2 Isolation and Identification of *Haemophilus influenzae*

3.2.1 Bacterial strains and isolation

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ได้จะนำมาแยกหาเชื้อ *H. influenzae* โดยนำมาเลี้ยงบน chocolate agar (CA) plate ที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ และตรวจสอบยืนยันโคโลนีที่ได้ โดย Gram staining และความต้องการทั้ง haemin (X factor) และ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD; V factor) ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. influenzae*

3.2.2 Identification of *H. influenzae*

3.2.2.1 Identification by PCR method

แต่ละ isolate ของ *H. influenzae* ที่แยกได้จากข้อ 3.2.1 จะนำมาทำการ identify ว่าเป็น typeable หรือ nontypeable strain โดยอาศัยเทคนิค PCR โดยใช้ HI-1, HI-2 primers และยืนยันผลการตรวจสอบด้วย capsular type-specific primers a ถึง f ตามวิธีการของ Falla และ LaClaire (Falla et al., 1994; LaClaire et al., 2003)

3.3 Characterization of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates

3.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทาง phenotype

3.3.1.1 Biotype of NTHi

เนื่องจากมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง biotype และ clinical isolate ของเชื้อ *H. influenzae* (Murphy *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1995; Alrawi *et al.*, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้จะนำ NTHi แต่ละ isolate ที่ได้มาตรวจหา biotype โดยอาศัย biochemical reaction ของ indole, ornithine decarboxylase และ urease ตามวิธีการของ Kilian (Kilian, 1976)

3.3.1.2 Antibiomicrobial susceptibility test

Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) strain ที่แยกได้ จะนำมาตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้อยู่กับผู้ป่วยติดเชื้อ *H. influenzae* ด้วยวิธี disk diffusion method ตามวิธีการของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)

3.3.1.3 Analysis of outer membrane protein profiles

เนื่องจากมีรายงานพบความหลากหลายในอัตราที่สูงของเชื้อ NTHi โดยเฉพาะส่วนที่เป็น outer membrane protein (OMP) และพบในอัตราที่สูงกว่า OMP ของเชื้อ *H. influenzae* type b ทั้งมีการศึกษาว่ากลไกการก่อโรคโดย NTHi นั้น อาศัย adhesion molecule หลายชนิด โดยเฉพาะส่วนที่เป็น OMP ของตัวเชื้อ และการพัฒนายาวัคซีนสำหรับ NTHi ในปัจจุบันก็มุ่งเน้นไปที่ OMP เหล่านั้น ในโครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษา profile ของ OMP ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย โดยการสกัด OMPs ตามวิธีการของ Carlone (Carlone *et al.*, 1986) และศึกษา OMP profile โดยอาศัยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 10% separating gel

3.3.2 การศึกษาคุณสมบัติทาง genotype

3.3.2.1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

นอกจากการศึกษา OMP ของ NTHi แล้ว ในโครงการวิจัยนี้ยังศึกษาคุณสมบัติทาง genotype ของเชื้อ NTHi ด้วย โดยใช้เทคนิคที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น “gold standard” สำหรับการ typing ของเชื้อ *H. influenzae* คือ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ในการตรวจวิเคราะห์ โดยจะทำการตัด chromosomal DNA ด้วย *Sma*I ตามวิธีการของ Moor *et al.* (Moor *et al.*, 1999) และนำไปวิเคราะห์บน agarose gel เปรียบเทียบกับ DNA marker ใน CHEF-Mapper (BioRad) หลังจากนั้นทำการย้อมเจลด้วย ethidium bromide และทำการวิเคราะห์ PFGE pattern ตามวิธีการของ Tenover *et al.* (Tenover *et al.*, 1995)

4. ผลการทดลอง

4.1. Clinical samples and microbiological identification of *Haemophilus influenzae*

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ 5 ชนิด ได้แก่ เสมหะ (sputum), throat swab, bronchial wash, หนอง (pus) จากตาและโพรงจมูก, และเลือด (sterile site) จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2548 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549 นำมาทำการแยกเชื้อ

โดยวิธีในหัวข้อ 3.2.1 สามารถแยกเชื้อ *H. influenzae* ได้ทั้งสิ้น 102 isolate เชื้อ *H. influenzae* บริสุทธิ์ดังกล่าวมาจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปี ถึง 105 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยที่ 56 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 64 คน และเพศหญิง 38 คน ในจำนวนนี้เป็น *H. influenzae* ที่แยกได้จากเสมหะ, throat swab, bronchial wash, หนอง (pus) จากตาและโพรงจมูก, และจากเลือด จำนวน 87, 1, 1, 8 และ 5 isolates ตามลำดับ

4.2 Serotyping of *H. influenzae* by PCR

เชื้อ *H. influenzae* บริสุทธิ์จะถูกนำมาทำการ identify ต่อเพื่อแยกว่าเป็น capsular serotypeable strain หรือ nonserotypeable strain ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ HI-1, HI-2 primers และ ยืนยันผลการตรวจสอบด้วย capsular type-specific primers a ถึง f ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.2.2.1 ผลการจำแนกเชื้อ *H. influenzae* จำนวน 102 isolate ด้วยวิธี PCR พบว่าเป็น nontypeable *H. influenzae* (NTHi) strain ทั้งหมด 94 isolates คิดเป็น 92.16% ของ *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมด ที่เหลือเป็น serotype a, b, e และ f จำนวน 3, 3, 1 และ 1 isolate คิดเป็นร้อยละ 2.94, 2.94, 0.98 และ 0.98 ตามลำดับ และส่วนใหญ่ (81 จาก 94; 86.17%) ของเชื้อ NTHi แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วย พบการติดเชื้อ NTHi ในผู้ป่วยทุกวัยตั้งแต่อายุ 1 ปี จนถึงอายุ 105 ปี โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงในผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 46 ปีขึ้นไป เป็นที่น่าสังเกตว่าในจำนวนเชื้อ NTHi ที่แยกได้ทั้งหมดมี 3 isolate (3.19%) แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (hemoculture) ซึ่งเป็น sterile site จากผู้ป่วยที่มีอายุ 2 และ 70 ปี (อีก 1 รายไม่ทราบอายุ) ซึ่งเป็นจำนวนที่ใกล้เคียงกับการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุมาจาก *H. influenzae* type b

4.3 การศึกษาคุณสมบัติทาง phenotype ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้

4.3.1 Biotype ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae*

เชื้อ NTHi ที่แยกได้ นำมาทำการตรวจหา biotype โดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ indole production, ornithine decarboxylation และ urease activity ตามวิธีการของ Kilian (Kilian, 1976) พบว่า 60 จาก 94 isolate ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้เป็น biotype III คิดเป็น 63.83% ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาเป็น biotype II (7.45%), VIII (7.45%), I (6.38%), V (6.38%), IV (5.32%) และ VI (3.19%) ตามลำดับ และในจำนวน 55 isolate (91.67%) ของ *H. influenzae* biotype III มาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ ไม่พบ biotype VII จากเชื้อ NTHi ในการศึกษา

4.3.2 Antimicrobial susceptibility

ผลการศึกษาความไวของยาต้านจุลชีพของเชื้อ NTHi จำนวน 94 isolate ที่แยกได้ พบว่ามีความสามารถในการต้านต่อยา ampicillin และ chloramphenicol ถึงร้อยละ 37.23 และ 17.02

ตามลำดับ พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิด (ampicillin และ chloramphenicol) จำนวนถึง 16 isolate โดยคิดเป็น 17.02% ในกรณีที่มีการทดสอบความไวต่อยา trimetoprim/sulfa(cotrimoxazole) พบเชื้อ NTHi ที่ดื้อต่อยาดังกล่าวถึง 57.45% ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 37% ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ทุก isolate จะดื้อต่อยา ampicillin ในจำนวนนี้รวมถึง NTHi ที่แยกได้จากเลือด (1 isolate) จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ไม่พบ isolate ที่เป็น ampicillin-resistant β -lactamase negative strain และเชื้อ NTHi ที่แยกได้ทั้งหมดยังคงมีความไวต่อยา cefotaxime และ ofloxacin

4.3.3 Analysis of outer membrane protein profiles of NTHi isolates

เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการวิจัยนี้ นำมาทำการศึกษา profile ของ outer membrane proteins (OMPs) ตามวิธีในหัวข้อ 3.3.1.3 ผลจากการทำ SDS-PAGE พบว่า OMP profile ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ผู้ป่วยไทยจากการศึกษานี้ ประกอบไปด้วย OMPs จำนวน 4-7 ชนิดซึ่งมี molecular weight อยู่ระหว่าง 25-116 kDa รูปแบบของ OMP จากเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ผู้ป่วยไทยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่ามีหลากหลายมาก ทั้งชนิดของ major OMP bands และระดับการแสดงออก (levels of expression) ของ OMP แต่ละชนิด และไม่มีรูปแบบใดที่พบเป็น dominant OMP pattern อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์รูปแบบของ OMP ด้วยโปรแกรม GeneTool System พบว่าเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ผู้ป่วยไทยที่ศึกษาเหล่านี้มีการแสดงออกของ major outer membrane proteins ที่ molecular weight ระหว่าง 37-42 kDa นอกจากนี้ยังพบ OMPs ที่ molecular weight ระหว่าง 26-32 kDa ด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่า NU-48 และ NU-56 ซึ่งแยกได้จากเลือดของผู้ป่วย invasive infection มี OMP profile ที่เหมือนกัน ในขณะที่ NU-84 ซึ่งแยกได้จากเลือดผู้ป่วยเช่นกัน มีการแสดงออกของ OMP ที่ต่างจาก NU ทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากความหลากหลายของรูปแบบแล้ว ผลจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง OMP profile และ biotype หรือ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ

4.4 การศึกษาคุณสมบัติทาง genotype ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้โดยเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่วิเคราะห์คุณสมบัติของ OMPs แล้วจะนำมาทำการศึกษาคุณสมบัติทาง genotype ต่อโดยใช้เทคนิค PFGE ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.3.2.1 ผล PFGE ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย จะเห็นได้ว่า โดยใช้ restriction enzyme, SmaI, PFGE pattern ของ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย มีความแตกต่างกันมาก จากการวิเคราะห์พบ PFGE pattern ที่ต่างกันถึง 46 (83.63%) pattern จากจำนวน NTHi 55 isolates ที่ทำการศึกษาทั้งหมด ความแตกต่างของ PFGE pattern นี้พบได้แม้ในกรณีที่มีการแสดงออกของ OMP profile เหมือนกัน เช่น NU-97 และ

NU-100 มี OMP profile เหมือนกัน แต่มี PFGE pattern ที่ต่างกันโดยสิ้นเชิง เช่นเดียวกับ NU-64 และ NU-66 เป็นต้น เป็นที่น่าสังเกตว่า NTHi strains ที่แยกได้จากผู้ป่วย invasive infection (NU-48 และ NU-56) ซึ่งมี OMP profile เหมือนกัน ก็พบ pattern ของ PFGE ที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบ NTHi strains ที่มีการแสดงออกของทั้ง OMP และ PFGE profiles ที่เหมือนกัน ดังเช่นในกรณีของ NU-77, NU-97, NU-103 และ NU-62, NU-63 ซึ่งเชื้อ NTHi เหล่านี้แยกจากผู้ป่วยต่างคนกันทั้งสิ้น และในจำนวน isolate ที่นำมาศึกษา PFGE มีเพียง NU-35, -37 และ -68 ที่เอนไซม์ SmaI ไม่สามารถย่อยได้ (results not shown)

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้นำเทคนิค PCR ซึ่งมีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูง มาใช้เพื่อการจำแนกเชื้อ nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) ออกจาก serotypeable *H. influenzae* โดยการใช้ primers HI-1 และ HI-2 ซึ่งจะ amplify ชิ้นส่วนของ *bexA* gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการ export และการแสดงออกของ polysaccharide capsule ของ *H. influenzae* (Luong *et al.*, 2004; Falla *et al.*, 1994; LaClaire *et al.*, 2003) สามารถแยกเชื้อ NTHi ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก โดยพบเชื้อ NTHi สูงถึงร้อยละ 92.16% ของเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมดจากผู้ป่วย ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าเชื้อ *H. influenzae* serotype b (2.94%) มาก ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ NTHi เหล่านี้ พบว่ามีอายุตั้งแต่ 1 ปี ถึง 105 ปี และไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีเหมือนการติดเชื้อจาก *H. influenzae* type b โดยพบการติดเชื้อ NTHi ในอัตราสูงในผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 46 ปีขึ้นไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยสูงอายุ อายุระหว่าง 66-75 ปี ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาจากประเทศอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากประเทศที่กำลังพัฒนา (Foxwell *et al.*, 1998) และหากพิจารณาเฉพาะเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย invasive infection พบว่าเป็นเชื้อ NTHi และ *H. influenzae* type b ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน (3 isolate และ 2 isolate ตามลำดับ) และเชื้อ NTHi ที่แยกได้นี้มาจากการติดเชื้อของผู้ป่วยที่มีอายุ 2 และ 70 ปี (อีก 1 รายไม่ทราบอายุ) และที่น่าสนใจพบว่าเชื้อจากผู้ป่วย invasive infection ดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และดื้อต่อยา ampicillin

เนื่องจากมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง biotype และ clinical isolate ของเชื้อ *H. influenzae* (Murphy *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1995; Alrawi *et al.*, 2002) การศึกษา biotype ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยที่แยกได้จากผู้ป่วยจากการศึกษานี้ พบว่าเป็น biotype III ถึง 63.83% และ 91.67% ของ *H. influenzae* biotype III มาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ นอกนั้นพบเป็น biotype II (7.45%), VIII (7.45%), I (6.38%), V (6.38%), IV (5.32%) และ VI (3.19%) ตามลำดับ แต่ไม่พบ biotype VII จากเชื้อ NTHi จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เนื่องจากชนิดของสิ่งส่งตรวจในโครงการนี้ส่วนใหญ่

ได้มาจากเสมหะผู้ป่วย การศึกษาครั้งนี้จึงไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่าง biotype และชนิดของ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้

เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยเหล่านี้ พบว่ามีความสามารถในการต้านต่อยา ampicillin และ chloramphenicol สูงถึงร้อยละ 37.23 และ 17.02 ตามลำดับ พบการดื้อต่อทั้งยา ampicillin และ chloramphenicol ถึง 17.02% และพบเชื้อ NTHi ที่ดื้อต่อยา trimetoprim/sulfa(cotrimoxazole) สูงถึง 57.45% ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบเชื้อ NTHi ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด (multidrug resistant strains) คือ ampicillin, chloramphenicol และ trimetoprim/sulfa(cotrimoxazole) ถึง 7.45% และประมาณ 37% ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ทุก isolate จะดื้อต่อยา ampicillin และไม่พบ isolate ที่เป็น ampicillin-resistant β -lactamase negative strains อย่างไรก็ตาม เชื้อ NTHi ที่แยกได้ยังคงมีความไวต่อยา cefotaxime และ ofloxacin โดยรวม ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในอัตราที่สูงของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยเหล่านี้

การศึกษา outer membrane protein (OMP) profile ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย โดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าประกอบ OMPs จำนวน 4-7 ชนิดซึ่งมี molecular weight อยู่ระหว่าง 25-116 kDa รูปแบบของ OMP จากเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความหลากหลายมาก ทั้งชนิดของ major OMP bands และระดับการแสดงออก (levels of expression) ของ OMP แต่ละชนิด และไม่มีรูปแบบใดที่พบเป็น dominant OMP pattern และจากการวิเคราะห์รูปแบบของ OMP พบว่าเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยที่ศึกษาเหล่านี้มีการแสดงออกของ major outer membrane proteins ที่ molecular weight ระหว่าง 37-42 kDa ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยจากประเทศอื่น ๆ (Munson *et al.*, 1990, Murphy and Bartos, 1988; Yi and Murphy, 1994; Neary *et al.*, 2001) ที่พบ most abundant OMP ของเชื้อ NTHi ที่ molecular weight 36-42 kDa (P2 protein) (Munson *et al.*, 1990, Murphy and Bartos, 1988; Yi and Murphy, 1994; Neary *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบ OMPs ที่ molecular weight ระหว่าง 26-32 kDa ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานอื่น ๆ ที่พบ OMPs ที่ molecular weight ระหว่าง 26-32 kDa ที่สำคัญ ได้แก่ P4 (Green *et al.*, 1991), P5 (Bakaletz *et al.*, 1997; Bakaletz *et al.*, 1999; Webb and Cripps, 2000; Bakaletz, 2001), OMP26 (Kyd and Cripps, 1998; El-Adhami *et al.*, 1999; Kyd *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า antigenic heterogeneity ของ OMP ของเชื้อ NTHi ในอัตราที่ค่อนข้างสูง (Smith-Vaughan *et al.*, 1996) ผลการศึกษารูปแบบของ OMPs นี้เป็นเพียงองค์ความรู้พื้นฐานที่ได้รับ การศึกษาในขั้นต่อไปจะเน้นการศึกษา antigenicity และ immunogenicity ของ OMPs จากเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย ตลอดจน common epitope(s) ที่ปรากฏ

บน OMP ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ดังกล่าว เพื่อศึกษาถึงกลไก และ/หรือบทบาทในการก่อโรค ตลอดจนการพัฒนาวัคซีนในอนาคต

การศึกษาทาง genotype โดยอาศัยเทคนิค PFGE ซึ่งถือเป็น gold standard สำหรับการทำการ typing ของเชื้อ NTHi พบ PFGE pattern ที่ต่างกันถึง 46 (83.63%) pattern จากจำนวน NTHi 55 isolate ที่ทำการศึกษาทั้งหมด และเป็นที่น่าสนใจที่ NTHi isolate จาก hemoculture (NU-48 และ NU-56) ในขณะที่มีการแสดงออกของ OMP เหมือนกัน แต่มี PFGE pattern ที่ต่างกัน เป็นไปได้ว่า NTHi strain ซึ่งมีความแตกต่างกันทาง genetic อาจใช้กลไก (เช่น OMPs) ที่เหมือนกันในการก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามกลไกการก่อโรสดังกล่าวยังคงต้องได้รับการศึกษาวิจัยต่อไป โดยรวมผลจาก PFGE นี้แสดงให้เห็นถึง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ NTHi strain ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยไทย แม้จะเป็นการศึกษาจากโรงพยาบาลศูนย์เพียงแห่งเดียวก็ตาม เทคนิค PFGE ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยได้ และผลจาก PFGE สามารถยังสามารถบอกถึง NTHi strain ที่ circulate อยู่ในชุมชนนั้นๆ ได้ด้วย

สรุปโดยภาพรวมของโครงการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อของ nontypeable *H. influenzae* ในอัตราที่สูงถึง 92.16% เมื่อเทียบกับเชื้อ *H. influenzae* ทั้งหมดที่แยกได้ในผู้ป่วยที่เข้าการรักษาจากโรงพยาบาลศูนย์แห่งหนึ่งในเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง และการติดเชื้อดังกล่าวพบในผู้ป่วยทุกราย ตั้งแต่เด็กอายุ 1 ปี จนถึง 105 ปี แต่มักพบการติดเชื้อในอัตราที่สูงในผู้สูงอายุ ที่มีอายุระหว่าง 66-75 ปี เชื้อ NTHi ที่แยกได้เหล่านี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และดื้อต่อยาต้านจุลชีพในอัตราที่สูง และยิ่งไปกว่านั้นพบ multidrug-resistant NTHi strain ในอัตราที่สูงอีกด้วย เป็นที่น่าสนใจที่เชื้อ NTHi สามารถก่อให้เกิด invasive infection ได้ในอัตราที่พอ ๆ กับเชื้อ *H. influenzae* serotype b และการศึกษา OMP และ PFGE pattern ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้ พบความหลากหลายทาง phenotype และ genotype ระหว่างสายพันธุ์จากผู้ป่วยที่แยกได้ในประเทศไทย ถึงแม้จะมีข้อจำกัดในเรื่องจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาและมาจากโรงพยาบาลศูนย์เพียงแห่งเดียว ผลการศึกษาที่ได้รับครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความชุกของเชื้อ NTHi ในผู้ป่วยไทย การตระหนักถึงบทบาทความสำคัญของเชื้อ NTHi ในฐานะเชื้อก่อโรค การวางแผนการป้องกัน และควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ NTHi ในประเทศไทยจึงควรได้รับความสนใจ

ovid0kdoyhoผลการศึกษาทางด้าน phenotype และ genotype จากโครงการวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ (coccobacilli) มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างไปจาก serotypeable *H. influenzae* อื่นๆ (type a, b, c, d, e และ f) คือไม่มีการสร้าง polysaccharide capsule ห่อหุ้มบนผิวเซลล์ จึงเรียกว่าเป็น nontypeable strain แบคทีเรียชนิดนี้มีมนุษย์เป็น natural host เท่านั้น พบเชื้อนี้ได้บริเวณทางเดินหายใจส่วนบน รวมถึง nasopharynx และ posterior oropharynx โดยมี carriage rate สูงถึง 80% และ 40% ในเด็กและ ในผู้ใหญ่ตามลำดับ (Mackowiak, 1982; Kuklinska and Kilian, 1984) ในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น Papua New Guinea มีรายงานของ carriage rate ในเด็กแรกเกิดอายุ 0-3 เดือน สูงถึง 100% (Gratten *et al.*, 1986) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางแล้วว่า NTHi สามารถก่อให้เกิดโรคทางทางเดินหายใจที่รุนแรงและเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขหลายชนิด การเกิดโรคโดย NTHi ไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีเหมือนใน *H. influenzae* type b (Hib) เท่านั้น NTHi ยังเป็นสาเหตุของโรคภัยร้ายแรงในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุอีกด้วย (Hardy *et al.*, 2003; Murphy, 2003) NTHi ก่อโรคได้ทั้งที่เป็นแบบ localized และ invasive infection ซึ่งมีรายงานการก่อโรคโดย NTHi ในหลายประเทศ ทั้งประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา (Foxwell *et al.*, 1998) โรคที่สำคัญได้แก่ otitis media, pneumonia, exacerbation of chronic lung disease, sinusitis, conjunctivitis meningitis, bacteraemia และ postpartum และ neonatal sepsis ขณะนี้การรักษาการติดเชื้อจาก NTHi อาศัยเพียงยาต้านจุลชีพ (antibiotics) เท่านั้น อย่างไรก็ตามมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ NTHi ในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งในอเมริกา ลาตินอเมริกา ยุโรป และเอเชีย ที่สำคัญยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ออกมาใช้ วัคซีนสำหรับเชื้อ *H. influenzae* ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ capsular-polysaccharide conjugate (polyribosyl ribitol phosphate; RPR) vaccine ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันการติดเชื้อจาก *H. influenzae* serotype b เท่านั้น แต่วัคซีนชนิดนี้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อจาก NTHi ได้ เนื่องจาก NTHi ไม่มีการสร้าง polysaccharide capsule บนผิวเซลล์

สำหรับประเทศไทย ยังไม่พบการรายงานข้อมูลใดๆ ที่เกี่ยวกับการระบาดวิทยา และการศึกษาอื่นๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับเชื้อ NTHi ที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันประเทศไทยได้ให้ความสำคัญต่อเชื้อ *H. influenzae* เฉพาะ type b เท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้ เป็นไปได้ว่าสาเหตุของการก่อโรครุนแรงโดย *H. influenzae* ในอดีตจะมาจาก type b เป็นส่วนใหญ่ การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการจึงมุ่งเน้นเฉพาะ *H. influenzae* type b โดยไม่ได้ตระหนักถึงบทบาทสำคัญในการก่อโรคของ NTHi เท่าที่ควร

และเนื่องจาก non-serotypeable *H. influenzae* มักจะเกิดการเกาะกลุ่มระหว่างตัวเชื้อด้วยตัวเอง การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการอาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการแปลผลได้ เมื่อมีการทดสอบโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) เช่นแปลผลเป็น serotype b เนื่องจากมีความลำเอียงในการตรวจหาเชื้อ type b อยู่แล้ว (Shann, 1999) อย่างไรก็ตาม ขณะนี้ทั่วโลกได้ยอมรับและให้ความสำคัญอย่างยิ่งต่อเชื้อ NTHi ในการเป็นสาเหตุก่อโรคทางทางเดินหายใจที่ร้ายแรงหลายชนิด โดยมีรายงานอัตราการติดเชื้อโดย NTHi สูงขึ้นทุกๆ ปี และสูงกว่าในอดีตที่ผ่านมา ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่นประเทศในแถบอเมริกา ลาตินอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย (Smith-Vaughan *et al.*, 1996; Smith-Vaughan *et al.*, 1997; Bonifacio da Silva and Martin, 2001; O'Neill *et al.*, 2003; Bajanca *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2004) และประเทศที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชีย เช่น ไต้หวัน ญี่ปุ่น ปากีสถาน และ ฟิลิปปินส์ ด้วยเช่นกัน (Chen *et al.*, 1999; Turnak *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2004; Straus *et al.*, 1998, Weinberg *et al.*, 1990) ที่สำคัญในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อ NTHi ประกอบกับมีรายงานเกี่ยวกับ phenotypic และ genotypic diversity และรายงานการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ NTHi ในอัตราที่สูง และสูงกว่าเชื้อ *H. influenzae* type b ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับประเทศไทยที่จะต้องมีการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะในด้านการระบาดวิทยา บทบาทในการก่อโรค คุณสมบัติทาง phenotype และ genotype ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ตลอดจนการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อตัวเชื้อ NTHi ดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ขึ้นเพื่อทำการศึกษาถึงความชุก บทบาทในการก่อโรคของเชื้อ NTHi และคุณสมบัติทาง genotype และ phenotype (biotype, outer membrane protein และ antibiotic susceptibility) ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลขั้นพื้นฐานในการการเฝ้าระวังเชื้อ และการเตรียมการเพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อในประเทศไทย และเนื่องจาก outer membrane protein ของ NTHi มีความสำคัญในแง่ของการเป็น target antigen ที่ดีสำหรับ protective immune response และเป็น adherence factor สำหรับขบวนการ colonization ซึ่งถือว่าเป็น critical step ของการเกิดพยาธิสภาพโดย NTHi การศึกษา outer membrane protein profile ของ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยในโครงการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษารูปแบบการแสดงออก ความหลากหลายของ outer membrane protein กลไกการก่อโรคโดย NTHi (ซึ่งขณะนี้ยังไม่ทราบแน่นอน) ตลอดจนการพัฒนาวัคซีนสำหรับ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยในอนาคตต่อไป

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* (NTHi) เทียบกับเชื้อ typeable *H. influenzae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศูนย์ภาคเหนือตอนล่าง (โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก)

2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทาง phenotype ได้แก่ biotype, outer membrane protein profile และ antibiotic susceptibility ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้จากผู้ป่วยในข้อ 2.1

2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทาง genotype รวมทั้งการหาลำดับเบสของ 16S rRNA ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้จากผู้ป่วยในข้อ 2.1

3. วิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (specimen)

เก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งที่เป็น sterile และ non-sterile site จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก (ทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน) ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ของเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2548 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549 พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลของผู้ป่วย ทั้งเพศ อายุ การวินิจฉัยและประวัติการใช้ยา antibiotics (ถ้ามี)

3.2 Isolation and Identification of *Haemophilus influenzae*

3.2.1 Bacterial strains and isolation

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ได้จะนำมาแยกหาเชื้อ *H. influenzae* โดยนำมาเลี้ยงบน chocolate agar (CA) plate ที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ และตรวจสอบยืนยันโคโลนีที่ได้ โดย Gram staining และความต้องการทั้ง haemin (X factor) และ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD; V factor) ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. influenzae*

3.2.2 Identification of *H. influenzae*

3.2.2.1 Identification by PCR method

แต่ละ isolate ของ *H. influenzae* ที่แยกได้จากข้อ 3.2.1 จะนำมาทำการ identify ว่าเป็น typeable หรือ nontypeable strain โดยอาศัยเทคนิค PCR โดยใช้ HI-1, HI-2 primers และยืนยันผลการตรวจสอบด้วย capsular type-specific primers a ถึง f

การจำแนก serotype โดย PCR ทำได้โดยการสกัด DNA จากโคโลนีของเชื้อ *H. influenzae* ตามวิธีการของ Falla และ LaClaire (Falla *et al.*, 1994; LaClaire *et al.*, 2003) โดยปรับเปลี่ยนวิธีการบางส่วน เริ่มจากการเขี่ย 8-10 โคโลนีของเชื้อ *H. influenzae* บริสุทธิ์ที่เจริญอยู่บน CA ในสภาวะ 37°C, 5% CO₂ ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 120 µl นำไป incubate ที่ 100 °C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 rpm, 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ และนำ DNA ที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และคำนวณความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้

PCR-serotyping ของเชื้อ *H. influenzae* ทำได้โดยใช้ primers HI-1 และ HI-2 ซึ่งจะ amplify *bexA* gene ของ capsular typeable *H. influenzae* (a, b, c, d, e และ f) ได้ PCR product ขนาด 343 bp ในขณะที่ nontypeable (noncapsulated) strains จะให้ผลลบกับ HI-1 และ HI-2 primers ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ใช้ reference *H. influenzae* strains; type a, b, c, d, e, และ f (DMST 4690, DMST 7956, DMST 4693, DMST 4694, DMST 4695, และ DMST 9003) และ nontypeable strain (DMST 3088) ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาเป็น positive และ negative control ตามลำดับ *H. influenzae*-DNA ที่ให้ผลลบกับ HI-1/HI-2 primers จะถูกนำมาตรวจสอบยืนยันผลโดยใช้ capsular type-specific primers a ถึง f (a1/a2, b1/b2, c1/c2, d1/d2, e1/e2 และ f1/f2) อีกครั้ง *H. influenzae* isolate ใดที่ให้ผล PCR เป็นลบกับ HI-1 และ HI-2 primers, และ capsular type-specific primers a ถึง f จะถือว่าเป็น nontypeable strain Primers และ PCR components และ PCR condition ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้แสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1 *H. influenzae* capsule type-specific primers (Falla *et al.*, 1994)

Primer names	Sequence (5' to 3')	capsular type
HI-1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	a to f
HI-2	TGTCCATGTCTTCAAATGATG	a to f
a1	CTACTCATTGCAGCATTTGC	a
a2	GAATATGACCTGATCTTCTG	a
b1	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC	b
b2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA	b
c1	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	c
c2	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	c
d1	TGATGACCGATACAACCTGT	d
d2	TCCACTCTTCAAACCATCT	d
e1	GGTAACGAATGTAGTGGTAG	e
e2	GCTTTACTGTATAAGTCTAG	e
f1	GCTACTATCAAGTCCAAATC	f
f2	CGCAATTATGGAAGAAAGCT	f

ตารางที่ 2 Components of PCR reaction mixture and their concentration.

Component	Final concentration
Sterile ddH ₂ O	to final volume
10x PCR reaction buffer (Fermentas)	1x
MgCl ₂	3 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Fermentas)	200 μ M
DNA template	100 ng
5' Primer	0.4 μ M
3' Primer	0.4 μ M
Tag DNA polymerase (Fermentas)	0.5 Unit

ตารางที่ 3 PCR conditions ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้

Condition	For HI-1/HI-2 และ e1/e2 primers	For a1/a2, b1/b2, c1/c2, d1/d2, และ f1/f2
Denaturing temperature	94 °C, 1 นาที	94 °C, 1 นาที
Annealing temperature	55 °C, 1 นาที	60 °C, 1 นาที
Extension temperature	72 °C, 1 นาที	72 °C, 1 นาที

- Total 35 cycles

3.3 Characterization of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates

3.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทาง phenotype

3.3.1.1 Biotype of NTHi

เนื่องจากมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง biotype และ clinical isolate ของเชื้อ *H. influenzae* (Murphy *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1995; Alrawi *et al.*, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้จะนำ NTHi แต่ละ isolate ที่ได้มาตรวจหา biotype โดยอาศัย biochemical reaction ของ indole, ornithine decarboxylase และ urease ตามวิธีการของ Kilian (Kilian, 1976)

3.3.1.2 Antibiomicrobial susceptibility test

Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) strain ที่แยกได้ จะนำมาตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธี disk diffusion method โดยใช้ *Haemophilus* test medium (HTM) และแผ่นยาต้านจุลชีพ ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), cefotaxime (30 µg), และ ofloxacin (5 µg) หลังการบ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 16-18 ชั่วโมง วัด zone of inhibition โดยเทียบกับตารางมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) นอกจากนี้ยังทำการวัด β-lactamase production ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้ โดยใช้ Chromogenic Cephalosporin method (Cefinase®) โดยใช้ ampicillin resistant *H. influenzae* (β-lactamase producer) และ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น positive และ negative control ตามลำดับ

3.3.1.3 Analysis of outer membrane protein profiles

การศึกษา profile ของ outer membrane proteins (OMPs) ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการวิจัยนี้ ทำได้โดยการสกัด OMPs ตามวิธีการของ Carlone (Carlone *et al.*, 1986) เริ่มจากการ scrap เชื้อ NTHi ที่เจริญบน CA ใส่ใน 1 ml ของ 10 mM HEPES เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำไปปั่นที่ 5,000 g, 4°C, 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1 ml 10 mM HEPES จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งที่ 15,600 g, 4°C, นาน 2 นาที Bacterial cell pellet ที่ได้นำไปเก็บที่ -70 °C ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนการสกัด OMPs

ขั้นตอนการสกัด OMPs เริ่มจากการ resuspend bacterial pellet ด้วย 1 ml ของ 10 mM HEPES จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องสลายเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูง Vibra cell VCX600 ที่ 40 Watt นาน 10 วินาที จำนวนทั้งสิ้น 6 ครั้ง ทำการปั่นที่ 15,600 g, 4°C, 2 นาที และเก็บ supernatant ที่ได้ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ ทำการปั่นอีกครั้งหนึ่งที่ 15,600 g, 4°C, นาน 30 นาที Resuspend pellet ที่ได้ด้วย 200 µl ของ 10 mM HEPES และเติม 200 µl ของ 2% sarkosyl (ใน 10 mM HEPES) จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทำการปั่นอีกครั้งที่ 15,600 g, 4°C, 30 นาที และดูด supernatant ทิ้ง เก็บส่วนที่เป็น pellet ไว้ จากนั้นเติม 0.5 ml ของ 10 mM HEPES อย่างช้า ๆ โดยไม่ให้รบกวน pellet ที่ได้ และทำการปั่นอีกครั้งที่ 15,600 g, 4°C,

2 นาที ดูด supernatant ที่ทิ้ง และ resuspend OMPs ที่สกัดได้ด้วย 50-100 μ l ของ 10 mM HEPES และวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วย Bio-Rad Protein assay kit (Bio-Rad) ตามคู่มือที่ผู้ผลิตแนะนำ OMPs ที่สกัดได้จะนำมาทำการศึกษา profile ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 10% separating gel ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ ก่อนการผสมกับ sample buffer เท่ากับ 0.4 mg/ml

3.3.2 การศึกษาคุณสมบัติทาง genotype

3.3.2.1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่วิเคราะห์คุณสมบัติของ OMPs แล้วจะนำมาทำการศึกษาคุณสมบัติทาง genotype ต่อโดยใช้เทคนิค PFGE เริ่มจากการเตรียม bacterial suspension ใน SE buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA) ให้ได้ Optical Density ที่ 620 nm ประมาณ 0.8-0.9 จากนั้นนำไปผสมกับ 2% low-melting point agarose (Bio-Rad) ในอัตราส่วน 1:1 หลังการเตรียม plug จาก bacterial mixture ที่ได้ใน plug mould จึงทำการ treat plug ที่ได้ด้วย lysis buffer (0.1% SDS, 100 mM EDTA) ซึ่งมี proteinase K (Invitrogen) ความเข้มข้น 1.5 mg/ml ที่ 56 °C, 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้าง plugs ด้วย TE buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0) ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้นจึงทำการย่อย chromosomal DNA ด้วย SmaI (10 Units, Fermentas) ที่ 30 °C, 16 ชั่วโมง ก่อนนำ plug ที่ได้ไปทำ electrophoresis ใน CHEF Mapper (Bio-Rad) โดยเตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1% ใน 0.5 TBE buffer (45 mM Tris, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) ทำการแยก DNA fragment ที่ 6 V/cm ที่ 13 °C นาน 20 ชั่วโมง 18 นาที โดย pulse time จาก 0.47 ถึง 44.69 , linear ที่ 120 ° โดยใช้ Lambda ladder (promega) เป็น DNA size standard ย้อม gel ด้วย 1 μ g/ml ethidium bromide นาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่น 30 นาที จึงทำการถ่ายภาพด้วย UV transillumination และวิเคราะห์ DNA fragment ที่ได้โดยเทียบกับ DNA marker

4. ผลการทดลอง

4.1. Clinical samples and microbiological identification of *Haemophilus influenzae*

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ 5 ชนิด ได้แก่ เสมหะ (sputum), throat swab, bronchial wash, หนอง (pus) จากตาและโพรงจมูก, และเลือด (sterile site) จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ของเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2548 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2549 นำมาทำการแยกเชื้อโดยเลี้ยงบน chocolate agar (CA) plate ที่ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ และตรวจสอบยืนยันโคโลนีที่ได้โดยการทำ Gram staining จากนั้นทดสอบความต้องการ X, V และ XV factor ในการเจริญของเชื้อ *Haemophilus influenzae*

จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เก็บได้ สามารถแยกเชื้อ *H. influenzae* ได้ทั้งสิ้น 140 isolate ในจำนวนนี้มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ 38 isolates ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้บริสุทธิ์จำนวน 102 isolate เชื้อ *H. influenzae* บริสุทธิ์ดังกล่าวมาจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 1 ปี ถึง 105 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยที่ 56 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 64 คน และเพศหญิง 38 คน ในจำนวนนี้เป็น *H. influenzae* ที่แยกได้จากเสมหะ, throat swab, bronchial wash, หนอง (pus) จากตาและโพรงจมูก, และจากเลือด จำนวน 87, 1, 1, 8 และ 5 isolates ตามลำดับ

4.2 Serotyping of *H. influenzae* by PCR

เชื้อ *H. influenzae* บริสุทธิ์จะถูกนำมาทำการ identify ต่อเพื่อแยกว่าเป็น capsular serotypeable strain หรือ nonserotypeable strain ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ HI-1, HI-2 primers และยืนยันผลการตรวจสอบด้วย capsular type-specific primers a ถึง f ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.2.2.1

ผลการจำแนกเชื้อ *H. influenzae* จำนวน 102 isolate ด้วยวิธี PCR โดย primers HI-1/HI-2, a1/a2, b1/b2, c1/c2, d1/d2, e1/e2 และ f1/ f2 (ตารางที่ 4) พบว่าเป็น nontypeable *H. influenzae* (NTHi) strain ทั้งสิ้น 94 isolates คิดเป็น 92.16% ของ *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมด ที่เหลือเป็น serotype a, b, e และ f จำนวน 3, 3, 1 และ 1 isolate คิดเป็นร้อยละ 2.94, 2.94, 0.98 และ 0.98 ตามลำดับ และส่วนใหญ่ (81 จาก 94; 86.17%) ของเชื้อ NTHi แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วย ตารางที่ 5 แสดง *H. influenzae* แต่ละ serotype แยกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ

ตารางที่ 4 Identification of *H. influenzae* isolates by PCR.

<i>H. influenzae</i>	HI1/HI-2 primers	Capsular type-specific primers						Serotype or nontypeable strains
		a1/a2	b1/b2	c1/c2	d1/d2	e1/e2	f1/f2	
NU-1	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU -2	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU -3	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU -5	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-6	-	-	-	-	-	-	+	F
NU-7	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-8	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-9	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-10	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-11	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-13	+	-	+	-	-	--	-	B
NU-14	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-15	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-17	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-20	+	-	+	-	-	-	-	B
NU-21	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-22	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-23	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-24	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-26	+	-	+	-	-	-	-	B
NU-27	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-32	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-34	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-35	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-37	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-38	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-39	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-40	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-41	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-42	+	+	-	-	-	-	-	A
NU-43	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-44	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-46	+	+	-	-	-	-	-	A
NU-47	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-48	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-49	+	+	-	-	-	-	-	A
NU-52	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-53	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-54	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-55	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-56	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-58	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-59	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-60	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-61	+	-	-	-	-	+	-	E

<i>H. influenzae</i>	HI1/HI-2 primers	Capsular type-specific primers						Serotype or nontypeable strains
		a1/a2	b1/b2	c1/c2	d1/d2	e1/e2	f1/f2	
NU-62	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-63	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-64	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-65	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-66	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-67	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-68	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-69	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-70	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-71	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-74	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-75	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-76	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-77	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-78	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-80	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-81	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-82	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-83	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-84	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-85	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-86	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-87	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-89	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-92	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-95	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-96	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-97	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-100	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-101	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-102	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-103	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-104	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-105	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-106	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-107	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-111	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-112	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-113	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-105	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-106	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-107	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-111	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-112	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-113	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-114	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-115	-	-	-	-	-	-	-	NT

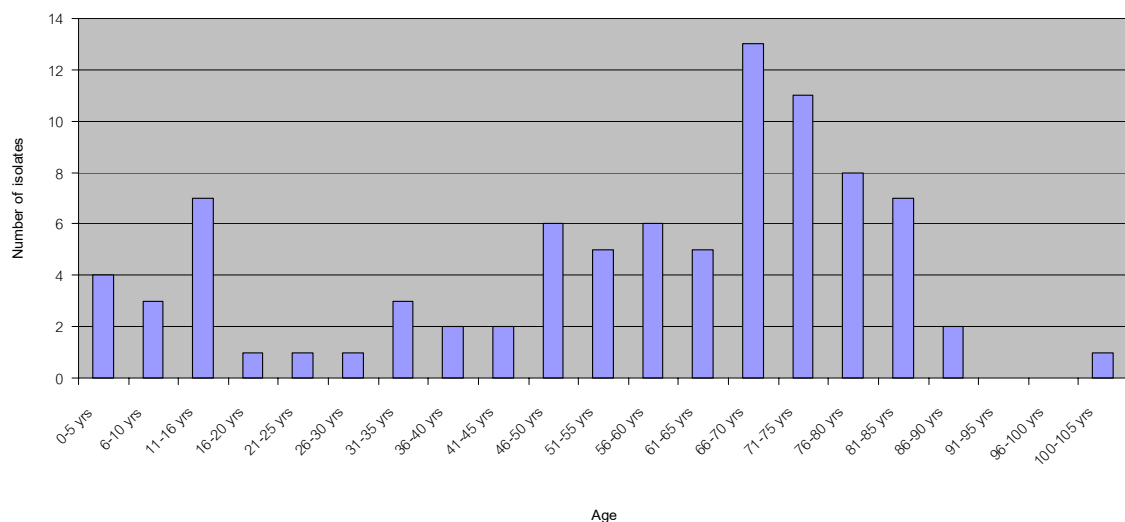
<i>H. influenzae</i>	HI1/HI-2 primers	Capsular type-specific primers						Serotype or nontypeable strains
		a1/a2	b1/b2	c1/c2	d1/d2	e1/e2	f1/f2	
NU-116	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-117	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-118	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-122	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-123	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-127	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-128	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-129	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-130	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-132	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-133	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-134	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-135	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-137	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-139	-	-	-	-	-	-	-	NT
NU-140	-	-	-	-	-	-	-	NT

+: Amplified PCR product ขนาด 343, 250, 480, 1350, และ 450 bp เมื่อใช้ HI1/HI-2, a1/a2, b1/b2, e1/e2 และ f1/f2 primers ตามลำดับ

ตารางที่ 5 Serotypes of *H. influenzae* isolates according to specimen types.

Serotypes	Total no. of isolates	No. of isolates according to specimen types				
		Sputum	Bronchial wash	Throat swab	Pus	Blood
NTHi	94	81	1	1	8	3
A	3	3	0	0	0	0
B	3	1	0	0	0	2
E	1	1	0	0	0	0
F	1	1	0	0	0	0
Total	102	87	1	1	8	5

เมื่อพิจารณาถึงอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ nontypeable *H. influenzae* จากการศึกษารั้งนี้ พบการติดเชื้อมากกว่าในผู้ป่วยทุกวัยตั้งแต่อายุ 1 ปี จนถึงอายุ 105 ปี โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงในผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 46 ปีขึ้นไป (รูปที่ 1) และในจำนวนนี้พบการติดเชื้อสูงสุด (13 ราย) ที่ช่วงอายุ 66 ถึง 70 ปี คิดเป็น 13.83% รองลงมาเป็นช่วงอายุ 71-75, 76-80 และ 81-85 ปี โดยพบการติดเชื้อจำนวน 11, 8 และ 7 ราย คิดเป็น 11.70%, 8.51%, 7.45% ตามลำดับ NTHi ทุก isolate ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 46 ปีขึ้นไปมาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะทั้งสิ้น ถึงแม้ว่าเชื้อ *H. influenzae* จะพบเป็น common colonizer บริเวณทางเดินหายใจของคนปกติ แต่จากการทำ Quantitative culture พบว่าปริมาณของเชื้อ *H. influenzae* ที่เพาะได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมากกว่าครั้งในการศึกษารั้งนี้มีนัยสำคัญในการก่อโรค (พบปริมาณของเชื้อเป็น moderate หรือ numerous หรือ $>10^5$ CFU/ml เมื่อทำ semi-quantitative culture) และเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้เหล่านี้ส่วนใหญ่พบเป็น dominant organism และส่วนน้อยพบการเจริญร่วมกับเชื้อก่อโรคทางทางเดินหายใจอื่น ๆ เป็นที่น่าสังเกตว่าในจำนวนเชื้อ NTHi ที่แยกได้ทั้งหมดมี 3 isolate (3.19%) แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (hemoculture) ซึ่งเป็น sterile site จากผู้ป่วยที่มีอายุ 2 และ 70 ปี (อีก 1 รายไม่ทราบอายุ) ซึ่งเป็นจำนวนที่ใกล้เคียงกับการติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีสาเหตุมาจาก *H. influenzae* type b (ตารางที่ 5)



รูปที่ 1 Age distribution of isolated nontypeable *H. influenzae*.

4.3 การศึกษาคุณสมบัติทาง phenotype ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้

4.3.1 Biotype ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae*

เชื้อ NTHi ที่แยกได้จำนวน 94 isolate นำมาทำการตรวจหา biotype โดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ indole production, ornithine decarboxylation และ urease activity ตามวิธีการของ Kilian (Kilian, 1976) พบว่า 60 จาก 94 isolate ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้เป็น biotype III คิดเป็น 63.83% ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาเป็น biotype II (7.45%), VIII (7.45%), I (6.38%), V (6.38%), IV (5.32%) และ VI (3.19%) ตามลำดับ และในจำนวน 55 isolate (91.67%) ของ *H. influenzae* biotype III มาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ ไม่พบ biotype VII จากเชื้อ NTHi ในการศึกษา (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 Biotypes of NTHi associated with types of specimens collected

Type of specimens	Total no. of isolates	Biotype							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Sputum	81	4	6	55	3	3	3	0	7
Bronchial wash	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Throat swab	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Pus	8	2	0	3	2	1	0	0	0
Blood	3	0	1	2	0	0	0	0	0
Total	94	6	7	60	5	6	3	0	7

4.3.3 Antimicrobial susceptibility

เชื้อ NTHi จำนวน 94 isolate ที่แยกได้ นำมาตรวจหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ และการสร้าง β -lactamase ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.3.1.2 ผลของความไวต่อยาต้านจุลชีพของ NTHi ที่แยกได้จากการศึกษานี้ แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Antimicrobial susceptibility of isolated NTHi.

	No. (%) of isolates
β -lactamase production*	35 (37.23)
Ampicillin resistance	35 (37.23)
Chloramphenicol resistance	16 (17.02)
Ampicillin + Chloramphenicol resistance	16 (17.02)
Cefotaxime susceptibility	94 (100)
Ofloxacin susceptibility	94 (100)

* β -lactamase production was determined by chromogenic Cephalosporin method.

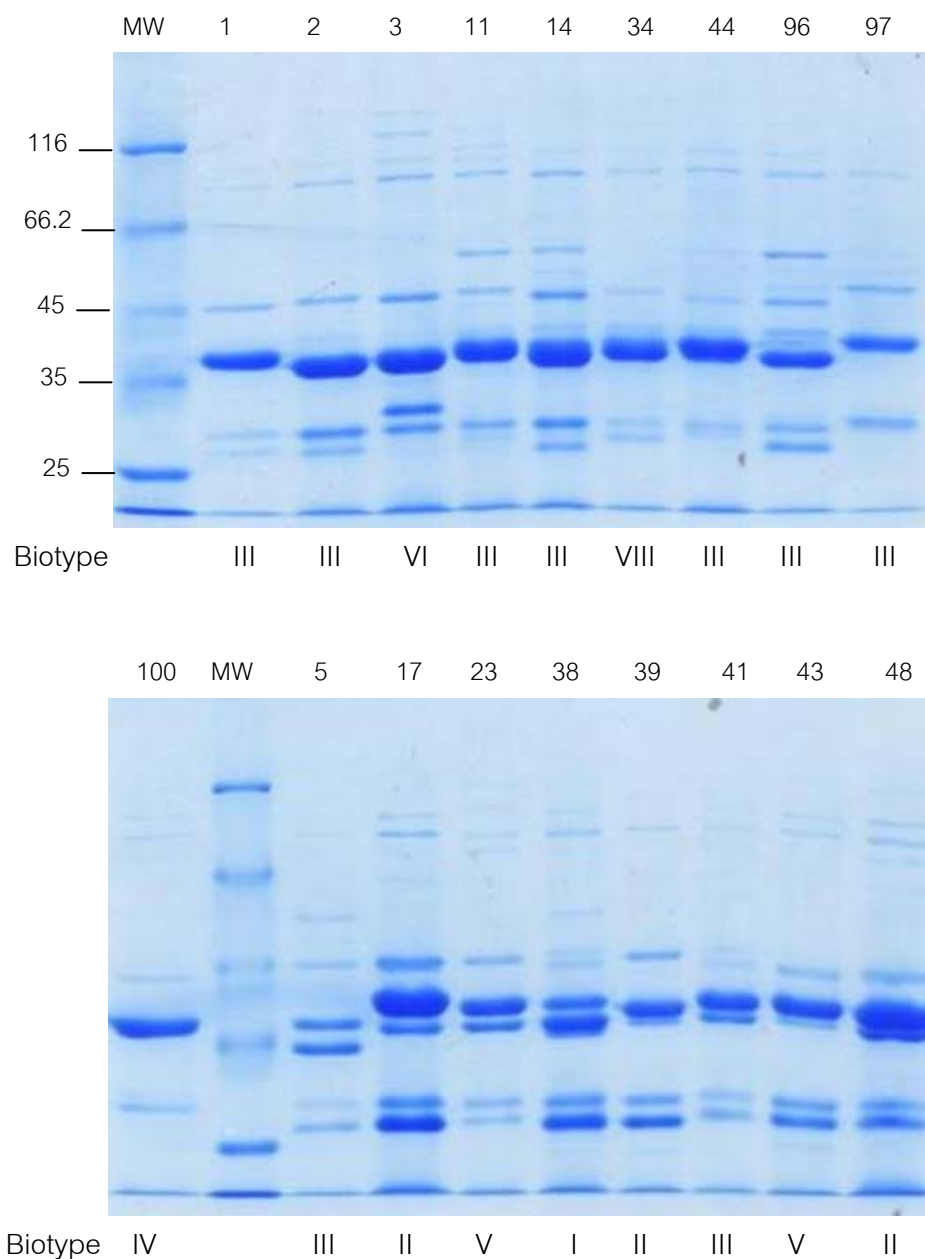
ผลการศึกษาความไวของยาต้านจุลชีพข้างต้น พบว่าเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้มีความสามารถในการต้านต่อยา ampicillin และ chloramphenicol ถึงร้อยละ 37.23 และ 17.02 ตามลำดับ พบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิด (ampicillin และ chloramphenicol) จำนวนถึง 16 isolate โดยคิดเป็น 17.02% ในกรณีที่มีการทดสอบความไวต่อยา trimetoprim/sulfa(cotrimoxazole) พบเชื้อ NTHi ที่ดื้อต่อยาดังกล่าวถึง 57.45% ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 37% ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ทุก isolate จะดื้อต่อยา ampicillin ในจำนวนนี้รวมถึง NTHi ที่แยกได้จากเลือด (1 isolate) จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ isolate ที่เป็น ampicillin-resistant β -lactamase negative strain และเชื้อ NTHi ที่แยกได้ทั้งหมดยังคงมีความไวต่อยา cefotaxime และ ofloxacin

4.3.3 Analysis of outer membrane protein profiles of NTHi isolates

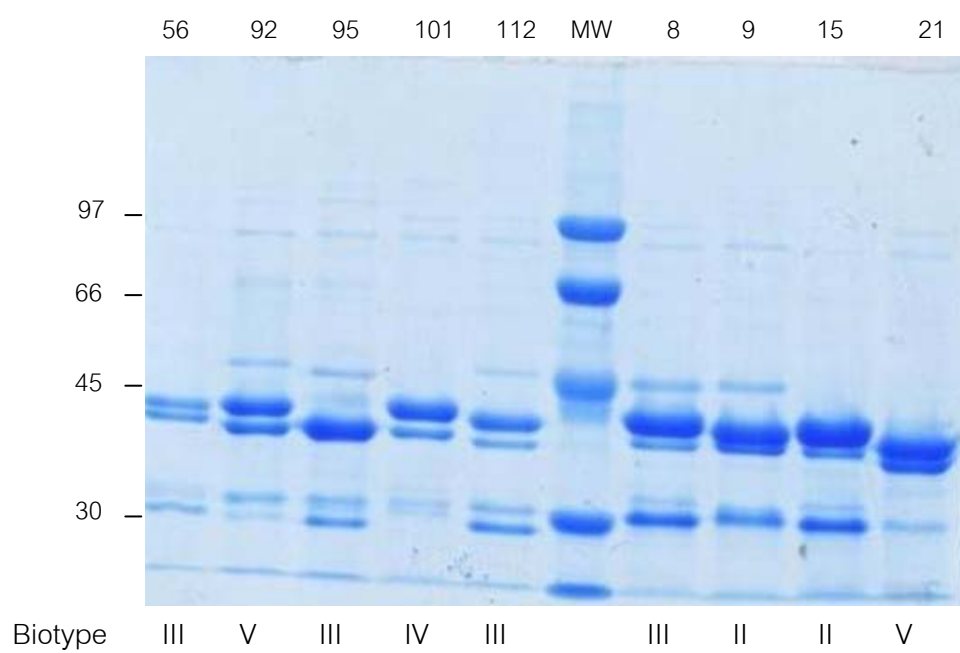
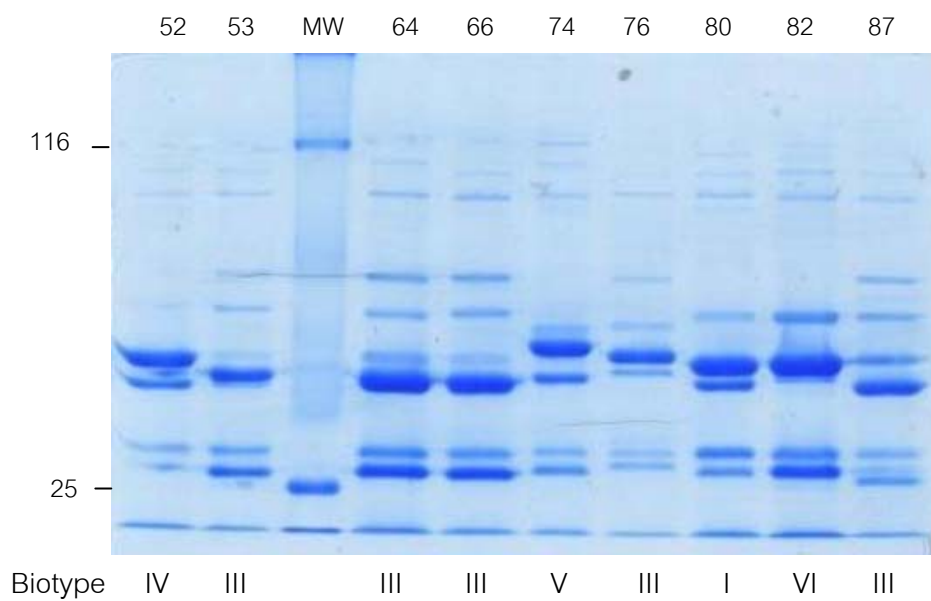
เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการวิจัยนี้ นำมาทำการศึกษา profile ของ outer membrane proteins (OMPs) ตามวิธีในหัวข้อ 3.3.1.3

ผลจากการทำ SDS-PAGE หลายครั้งซึ่งให้ผลเหมือนกัน (reproducible results) พบว่า OMP profile ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ผู้ป่วยไทยจากการศึกษานี้ ประกอบไปด้วย OMPs จำนวน 4-7 ชนิดซึ่งมี molecular weight อยู่ระหว่าง 25-116 kDa (รูปที่ 2) รูปแบบของ OMP จากเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ผู้ป่วยไทยในการศึกษานี้พบว่ามีหลากหลายมาก ทั้งชนิดของ major OMP bands และระดับการแสดงออก (levels of expression) ของ OMP แต่ละชนิด และไม่มีรูปแบบใดที่พบเป็น dominant OMP pattern อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์รูปแบบของ OMP ด้วย

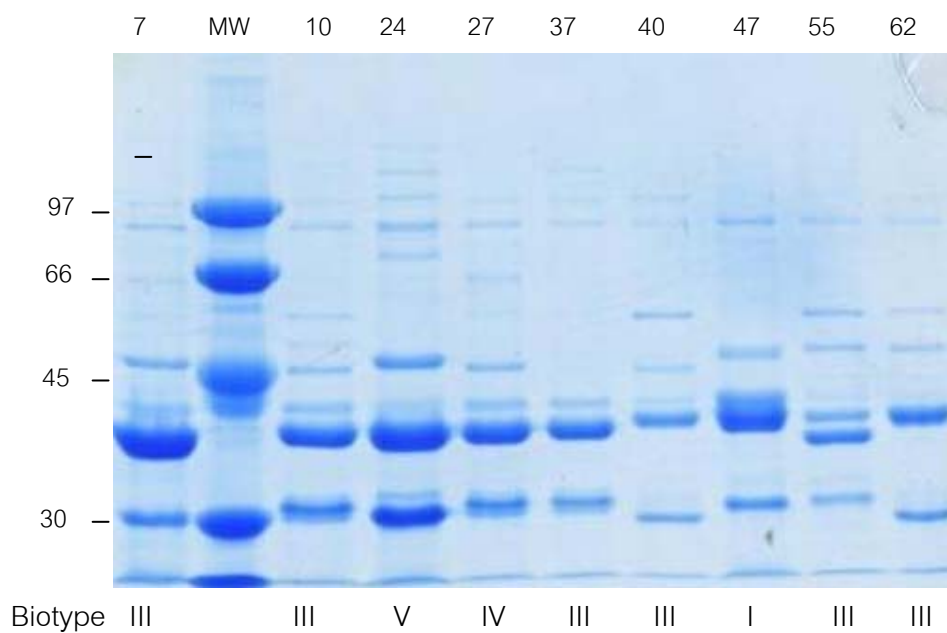
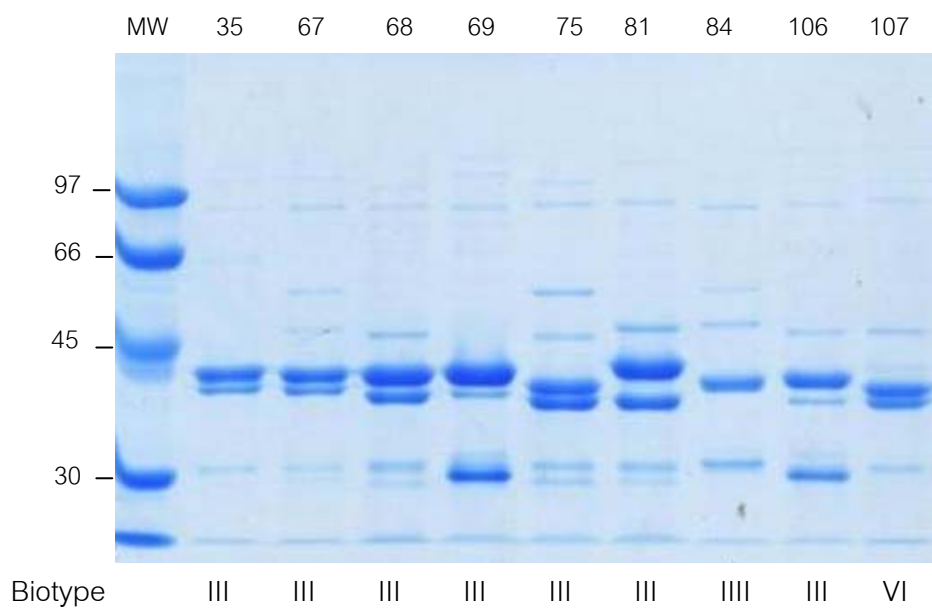
โปรแกรม GeneTool System พบว่าเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ผู้ป่วยไทยที่ศึกษาเหล่านี้มีการแสดงออกของ major outer membrane proteins ที่ molecular weight ระหว่าง 37-42 kDa นอกจากนี้ยังพบ OMPs ที่ molecular weight ระหว่าง 26-32 kDa ด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่า NU-48 และ NU-56 ซึ่งแยกได้จากเลือดของผู้ป่วย invasive infection มี OMP profile ที่เหมือนกัน ในขณะที่ NU-84 ซึ่งแยกได้จากเลือดผู้ป่วยเช่นกัน มีการแสดงออกของ OMP ที่ต่างจาก NU ทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากความหลากหลายของรูปแบบแล้ว ผลจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง OMP profile และ biotype หรือชนิดของสิ่งส่งตรวจ (รูปที่ 2)



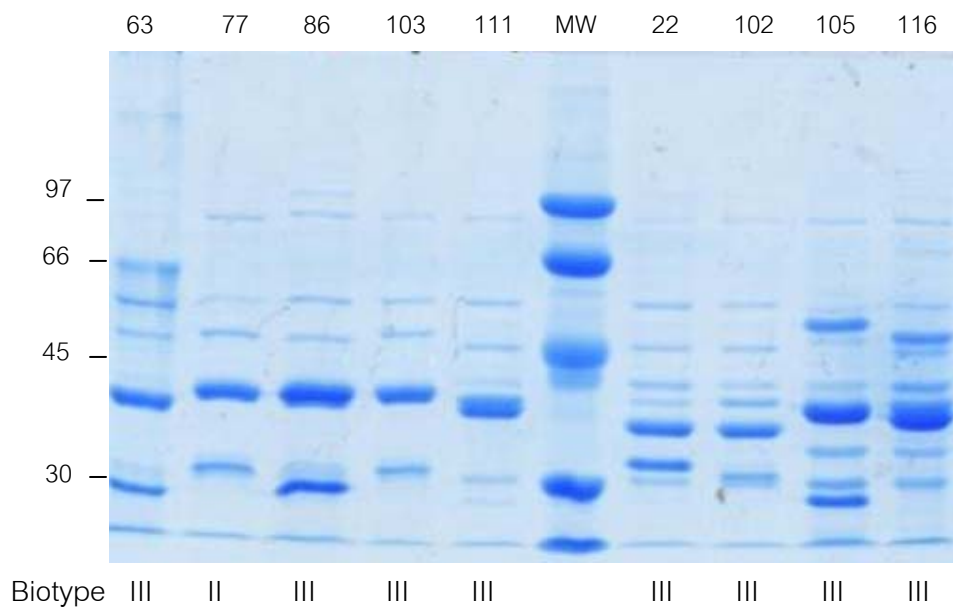
รูปที่ 2 OMP profiles of isolated NTHi analyzed by 10% SDS-PAGE and stained by Coomassie Brilliant Blue. MW, Molecular weight marker (kDa).



รูปที่ 2 (continued)



รูปที่ 2 (continued)

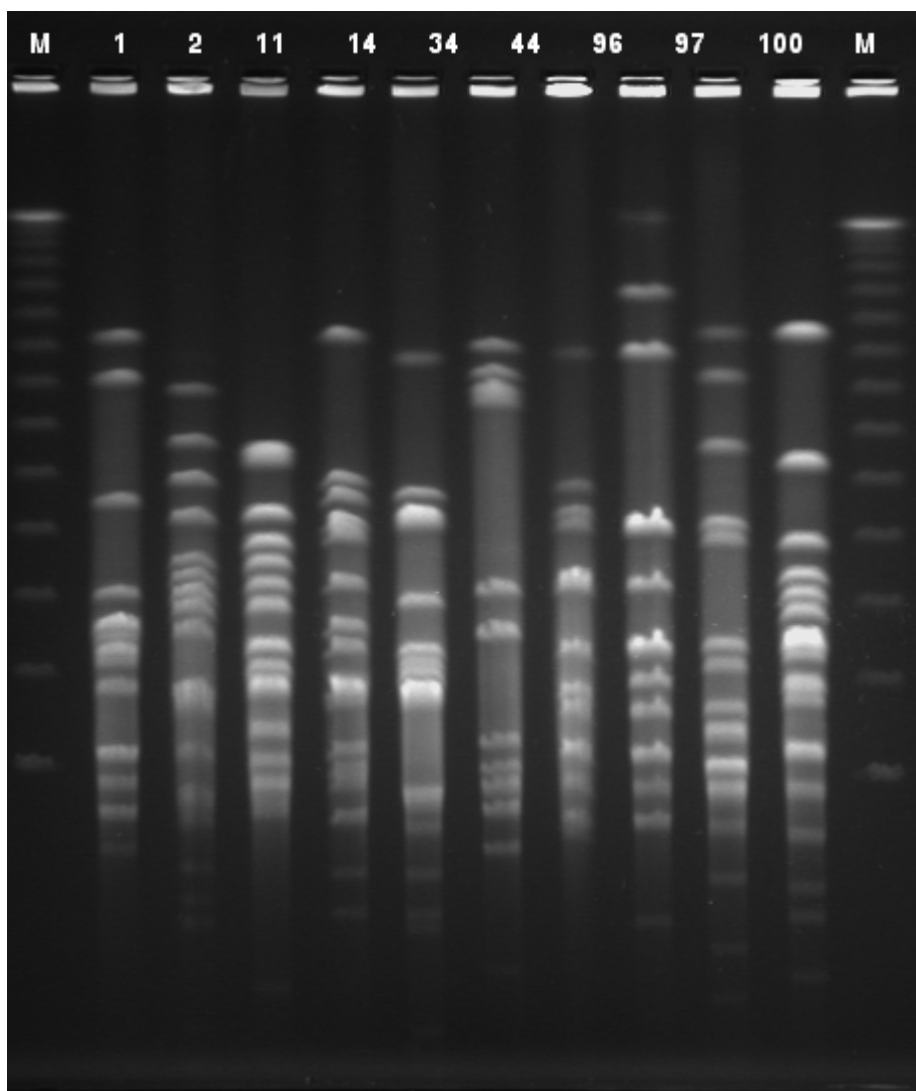


รูปที่ 2 OMP profiles of isolated NTHi analyzed by 10% SDS-PAGE and stained by Coomassie Brilliant Blue. MW, Molecular weight marker (kDa). Numbers above each figure indicate NTHi strains and biotypes are shown.

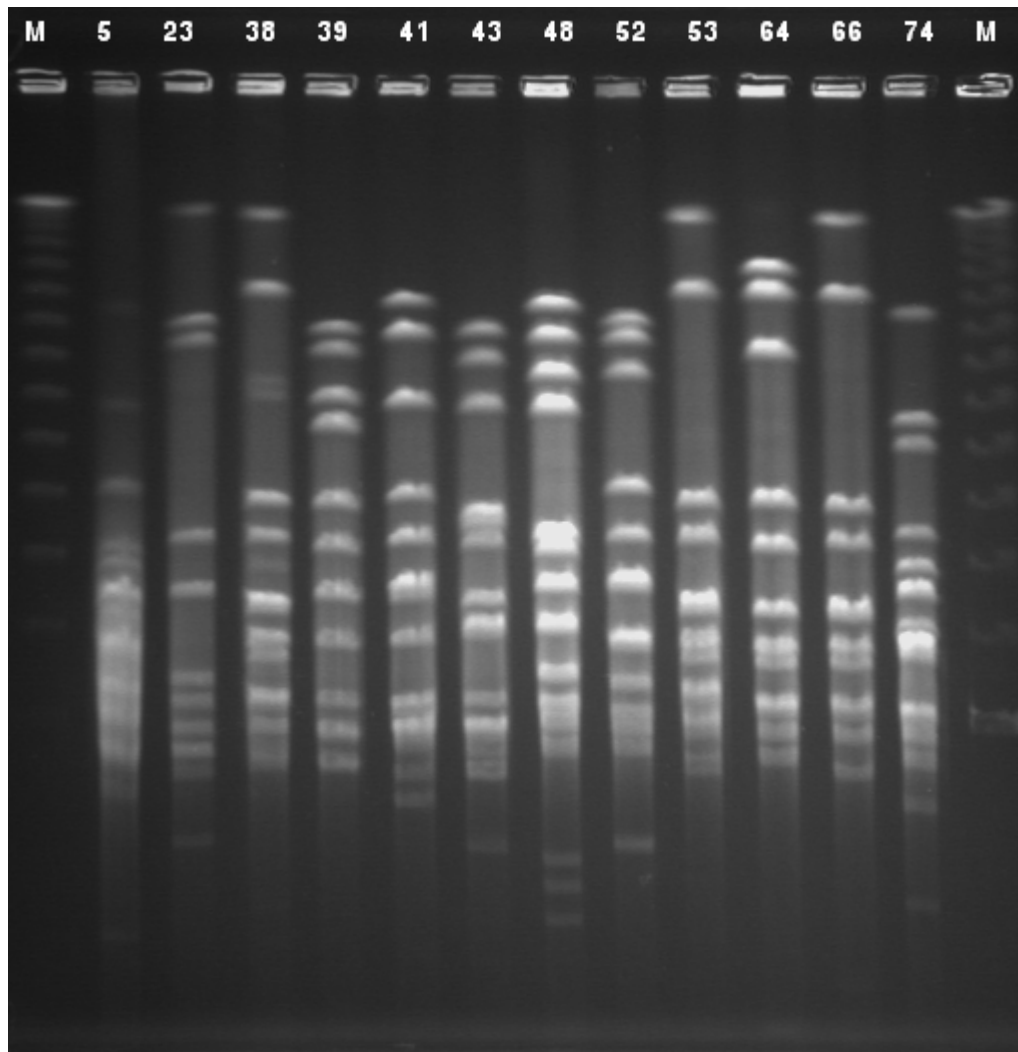
4.4 การศึกษาคุณสมบัติทาง genotype ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้โดยเทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่วิเคราะห์คุณสมบัติของ OMPs แล้วจะนำมาทำการศึกษาคุณสมบัติทาง genotype ต่อโดยใช้เทคนิค PFGE ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.3.2.1 ผล PFGE ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย แสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่า โดยใช้restriction enzyme, SmaI, PFGE pattern ของ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย มีความแตกต่างกันมาก จากการวิเคราะห์พบ PFGE pattern ที่ต่างกันถึง 46 (83.63%) pattern จากจำนวน NTHi 55 isolates ที่ทำการศึกษาทั้งหมด ความแตกต่างของ PFGE pattern นี้พบได้แม้ในกรณีที่มีการแสดงออกของ OMP profile เหมือนกัน

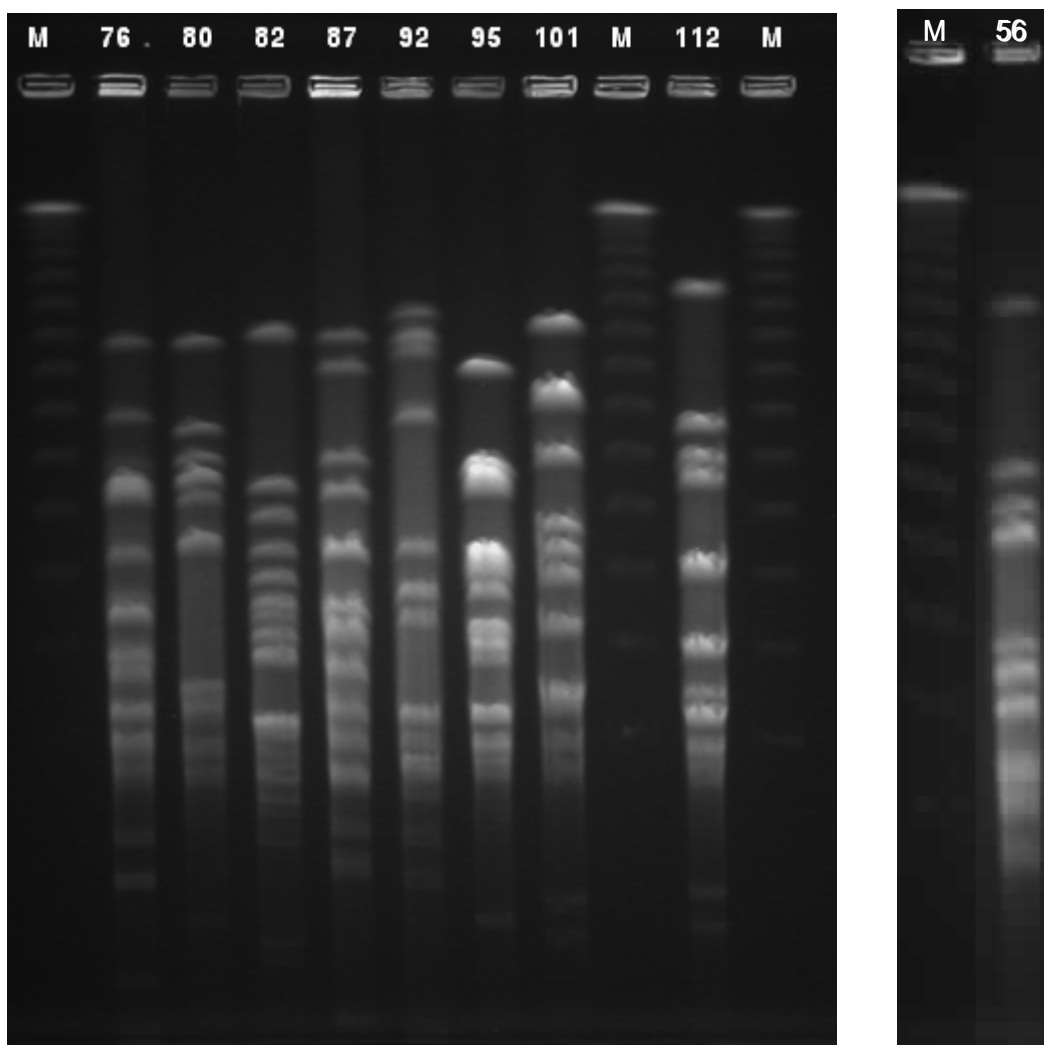
เช่น NU-97 และ NU-100 มี OMP profile เหมือนกัน แต่มี PFGE pattern ที่ต่างกันโดยสิ้นเชิง เช่นเดียวกับ NU-64 และ NU-66 เป็นต้น เป็นที่น่าสังเกตว่า NTHi strains ที่แยกได้จากผู้ป่วย invasive infection (NU-48 และ NU-56) ซึ่งมี OMP profile เหมือนกัน ก็พบ pattern ของ PFGE ที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบ NTHi strains ที่มีการแสดงออกของทั้ง OMP และ PFGE profiles ที่เหมือนกัน ดังเช่นในกรณีของ NU-77, NU-97, NU-103 และ NU-62, NU-63 ซึ่งเชื้อ NTHi เหล่านี้แยกจากผู้ป่วยต่างคนกันทั้งสิ้น และในจำนวน isolate ที่นำมาศึกษา PFGE มีเพียง NU-35, -37 และ -68 ที่เอนไซม์ SmaI ไม่สามารถย่อยได้ (results not shown)



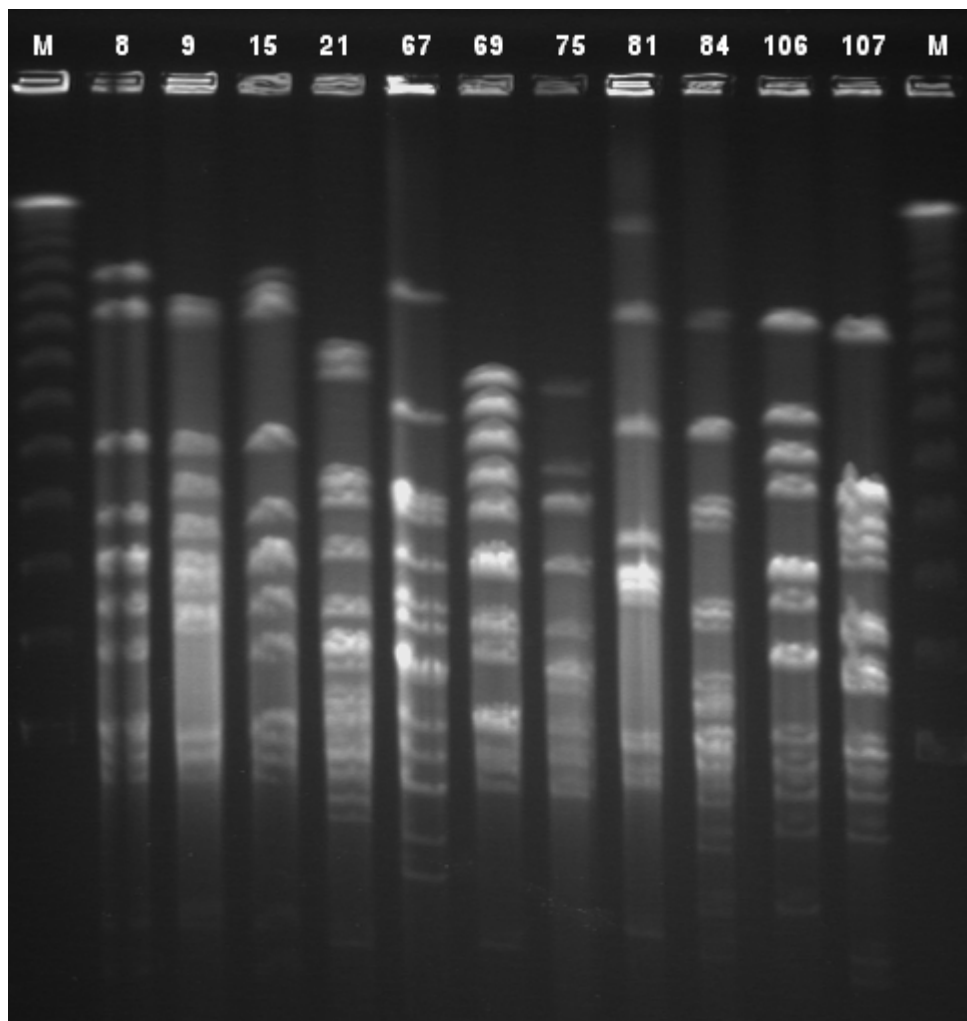
รูปที่ 3 PFGE patterns of SmaI-digested chromosomal DNAs of NTHi isolated from Thai patients. M, Lambda DNA size standard; numbers indicated NTHi strains (NUs).



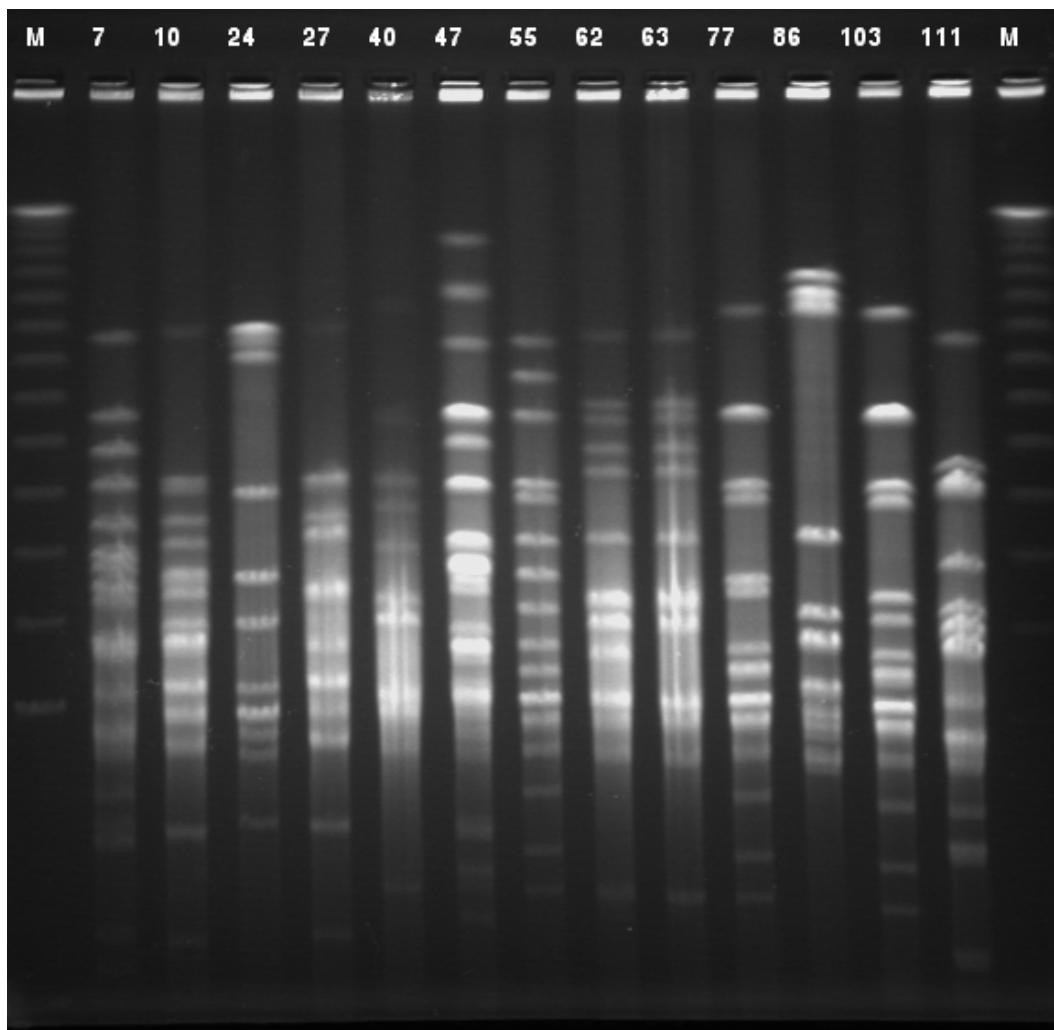
รูปที่ 3 (continued)



รูปที่ 3 (continued)



រូបទី 3 (continued)



รูปที่ 3 PFGE patterns of *Sma*I-digested chromosomal DNAs of NTHi isolated from Thai patients. M, Lambda DNA size standard; numbers indicated NTHi strains (NUs).

ผลการวิเคราะห์ด้วย PFGE ของ NTHi isolate สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า NTHi isolate เหล่านี้มีความแตกต่างทาง genotype เป็นอย่างมาก (46 PFGE patterns จาก 55 isolates) และเนื่องจากโครงการวิจัยนี้ได้ใช้งบประมาณส่วนใหญ่ในปีที่ 2 สำหรับสารเคมีเพื่อการหาสภาวะที่เหมาะสมของ PFGE ด้วยเหตุนี้ ประกอบกับมี NTHi isolate ที่มี PFGE pattern ที่ต่างกันเป็นจำนวนมาก ทำให้งบประมาณในส่วนที่จะทำ 16S rRNA sequencing ไม่เพียงพอ จากจำนวนตัวอย่างที่มี PFGE pattern ต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการวิจัยที่ได้รับครั้งนี้ น่าจะเพียงพอต่อการตอบโจทย์การวิจัยที่ได้ตั้งไว้เกี่ยวกับความชุกของเชื้อ nontypeable *Haemophilus influenzae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย ตลอดจนคุณสมบัติของเชื่อดังกล่าวทาง phenotype โดยการศึกษา OMP profiles และคุณสมบัติทาง genotype โดยเทคนิค PFGE ซึ่งถือว่าเป็น gold standard ในการทำ typing ของเชื้อแบคทีเรีย

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้นำเทคนิค PCR มาใช้เพื่อการจำแนกเชื้อ nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) ออกจาก serotypeable *H. influenzae* โดยการใช้ primers HI-1 และ HI-2 ซึ่ง จะ amplify ขึ้นส่วนของ *bexA* gene ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการ export และการแสดงออกของ polysaccharide capsule ของ *H. influenzae* (Luong *et al.*, 2004; Falla *et al.*, 1994; LaClaire *et al.*, 2003) เชื้อ *H. influenzae* isolate ที่ให้ผลลบ (no PCR product) กับ HI-1 และ HI-2 primers จะถูกนำมาตรวจสอบยืนยันผลที่ได้ด้วย capsular type-specific primers a ถึง f (a1/a2, b1/b2, c1/c2, d1/d2, e1/e2 และ f1/f2) อีกครั้ง *H. influenzae* isolate ที่ให้ผลลบทั้ง HI-1 และ HI-2 และ capsular type-specific primers a ถึง f จึงนับว่าเป็น nontypeable *H. influenzae* strain (NTHi) การ identify เชื้อ *H. influenzae* โดย PCR นี้มีข้อดีกว่าการวิธี conventional serotyping ซึ่งอาศัย *Haemophilus influenzae* capsular type-specific antisera serotyping เนื่องจากลดปัญหาเรื่อง cross-reaction และ autoagglutination ที่เกิดจากการใช้ *H. influenzae* type-specific antisera (Falla *et al.*, 1994)

โดยอาศัยเทคนิค PCR ดังกล่าว โครงการวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อ NTHi ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ของเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง โดยพบเชื้อ NTHi สูงถึงร้อยละ 92.16% ของเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมดจากผู้ป่วย ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าเชื้อ *H. influenzae* serotype b (2.94%) มาก ถึงแม้ว่าเชื้อ *H. influenzae* จะพบเป็น common colonizer บริเวณทางเดินหายใจของคนปกติ แต่ปริมาณของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่เพาะได้จากการทำ quantitative culture ของสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

ส่วนใหญ่จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีนัยสำคัญในการก่อโรค และพบเชื้อนี้เป็น dominant organism มีเพียงส่วนน้อยที่พบการเจริญร่วมกับเชื้อก่อโรคทางทางเดินหายใจอื่น ๆ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ NTHi เหล่านี้ พบว่ามีอายุตั้งแต่ 1 ปี ถึง 105 ปี และไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีเหมือนการติดเชื้อจาก *H. influenzae* type b โดยพบการติดเชื้อ NTHi ในอัตราสูงในผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 46 ปี ขึ้นไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยสูงอายุ อายุระหว่าง 66-75 ปี ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาจากประเทศอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากประเทศที่กำลังพัฒนา (Foxwell *et al.*, 1998) และหากพิจารณาเฉพาะเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย invasive infection พบว่าเป็นเชื้อ NTHi และ *H. influenzae* type b ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน (3 isolate และ 2 isolate ตามลำดับ) และเชื้อ NTHi ที่แยกได้นี้มาจากผู้ป่วยที่มีอายุ 2 และ 70 ปี (อีก 1 รายไม่ทราบอายุ) และที่น่าสนใจพบว่าเชื้อจากผู้ป่วย invasive infection ดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และดื้อต่อยา ampicillin

เนื่องจากมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง biotype และ clinical isolate ของเชื้อ *H. influenzae* (Murphy *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1995; Alrawi *et al.*, 2002) การศึกษา biotype ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยที่แยกได้จากผู้ป่วยจากการศึกษานี้ พบว่าเป็น biotype III ถึง 63.83% และ 91.67% ของ *H. influenzae* biotype III มาจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ นอกนั้นพบเป็น biotype II (7.45%), VIII (7.45%), I (6.38%), V (6.38%), IV (5.32%) และ VI (3.19%) ตามลำดับ แต่ไม่พบ biotype VII จากเชื้อ NTHi จากการศึกษานี้ เนื่องจากชนิดของสิ่งส่งตรวจในโครงการนี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเสมหะผู้ป่วย การศึกษานี้จึงไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่าง biotype และชนิดของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้

เชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยเหล่านี้ พบว่ามีความสามารถในการต้านต่อยา ampicillin และ chloramphenicol สูงถึงร้อยละ 37.23 และ 17.02 ตามลำดับ พบการดื้อต่อทั้งยา ampicillin และ chloramphenicol ถึง 17.02% และพบเชื้อ NTHi ที่ดื้อต่อยา trimetoprim/sulfa(cotrimoxazole) สูงถึง 57.45% ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบเชื้อ NTHi ที่ดื้อต่อยาด้านจุลชีพ 3 ชนิด (multidrug resistant strains) คือ ampicillin, chloramphenicol และ trimetoprim/sulfa(cotrimoxazole) ถึง 7.45% และประมาณ 37% ของเชื้อ nontypeable *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ทุก isolate จะดื้อต่อยา ampicillin และไม่พบ isolate ที่เป็น ampicillin-resistant β -lactamase negative strains อย่างไรก็ตาม เชื้อ NTHi ที่แยกได้ยังคงมีความไวต่อยา cefotaxime และ ofloxacin โดยรวม ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการดื้อต่อยาด้านจุลชีพในอัตราที่สูงของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยเหล่านี้ หากมีการ identify เชื้อที่ถูกต้องใน

ห้องปฏิบัติการ (เช่น PCR-serotyping) จะส่งผลให้มีการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม และลดปัญหาการใช้นาต้านจุลชีพที่ไม่จำเป็นลงได้

การศึกษา outer membrane protein (OMP) profile ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย โดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าประกอบ OMPs จำนวน 4-7 ชนิดซึ่งมี molecular weight อยู่ระหว่าง 25-116 kDa รูปแบบของ OMP จากเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทยในการศึกษานี้พบว่ามีความหลากหลายมาก ทั้งชนิดของ major OMP bands และระดับการแสดงออก (levels of expression) ของ OMP แต่ละชนิด และไม่มีรูปแบบใดที่พบเป็น dominant OMP pattern และจากการวิเคราะห์รูปแบบของ OMP พบว่าเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยที่ศึกษาเหล่านี้มีการแสดงออกของ major outer membrane proteins ที่ molecular weight ระหว่าง 37-42 kDa ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยจากประเทศอื่น ๆ (Munson *et al.*, 1990, Murphy and Bartos, 1988; Yi and Murphy, 1994; Neary *et al.*, 2001) ที่พบ most abundant OMP ของเชื้อ NTHi ที่ molecular weight 36-42 kDa (P2 protein) (Munson *et al.*, 1990, Murphy and Bartos, 1988; Yi and Murphy, 1994; Neary *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบ OMPs ที่ molecular weight ระหว่าง 26-32 kDa ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานอื่น ๆ ที่พบ OMPs ที่ molecular weight ระหว่าง 26-32 kDa ที่สำคัญ ได้แก่ P4 (Green *et al.*, 1991), P5 (Bakaletz *et al.*, 1997; Bakaletz *et al.*, 1999; Webb and Cripps, 2000; Bakaletz, 2001), OMP26 (Kyd and Cripps, 1998; El-Adhami *et al.*, 1999; Kyd *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า antigenic heterogeneity ของ OMP ของเชื้อ NTHi ในอัตราที่ค่อนข้างสูง (Smith-Vaughan *et al.*, 1996) ผลการศึกษารูปแบบของ OMPs นี้เป็นเพียงองค์ความรู้พื้นฐานที่ได้รับ การศึกษาในขั้นต่อไปจะเน้นการศึกษา antigenicity และ immunogenicity ของ OMPs จากเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย ตลอดจน common epitope(s) ที่ปรากฏบน OMP ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้ดังกล่าว เพื่อศึกษาถึงกลไก และ/หรือบทบาทในการก่อโรค ตลอดจนการพัฒนาวัคซีนในอนาคต

เป็นที่น่าสังเกตว่า NTHi isolates (NU-48 และ NU-56) ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วย invasive infection มีการแสดงออกของ OMP profile ที่เหมือนกัน OMP ดังกล่าวอาจมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้อ NTHi นี้ กลไกการก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไกการติดเชื้อในกระแสเลือดโดย NTHi ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

การศึกษาทาง genotype โดยอาศัยเทคนิค PFGE ซึ่งถือเป็น gold standard สำหรับการทำการ typing ของเชื้อ NTHi พบ PFGE pattern ที่ต่างกันถึง 46 (83.63%) pattern จากจำนวน NTHi 55 isolate ที่ทำการศึกษาทั้งหมด และเป็นที่น่าสังเกตว่า NTHi isolate จาก hemoculture (NU-48 และ NU-56) ในขณะที่มีการแสดงออกของ OMP เหมือนกัน แต่มี PFGE pattern ที่ต่างกัน เป็นไปได้ว่า NTHi strain ซึ่งมีความแตกต่างกันทาง genetic อาจใช้กลไก (เช่น OMPs) ที่เหมือนกันในการก่อโรค

ได้ อย่างไรก็ตามกลไกการก่อโรคนี้น่าจะยังคงต้องได้รับการศึกษาวิจัยต่อไป โดยรวมผลจาก PFGE นี้แสดงให้เห็นถึง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ NTHi strain ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยไทย แม้จะเป็นการศึกษาจากโรงพยาบาลศูนย์เพียงแห่งเดียวก็ตาม

เนื่องจากความสามารถในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเทคนิค pulsed field gel electrophoresis แม้ในกรณีของเชื้อที่มีการแสดงออกของ OMP เหมือนกัน ดังแสดงให้เห็นจากการศึกษาในครั้งนี้ เทคนิคดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้ศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยได้ และผลจาก PFGE สามารถยังสามารถบอกถึง NTHi strain ที่ circulate อยู่ในชุมชนนั้นๆ ได้ด้วย

สรุปโดยภาพรวมของโครงการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นถึงการติดเชื้อของ nontypeable *H. influenzae* ในอัตราที่สูงถึง 92.16% เมื่อเทียบกับเชื้อ *H. influenzae* ทั้งหมดที่แยกได้ในผู้ป่วยที่เข้าการรักษาจากโรงพยาบาลศูนย์แห่งหนึ่งในเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง และการติดเชื้อดังกล่าวพบในผู้ป่วยทุกวัย ตั้งแต่เด็กอายุ 1 ปี จนถึง 105 ปี แต่มักพบการติดเชื้อในอัตราที่สูงในผู้สูงอายุ ที่มีอายุระหว่าง 66-75 ปี เชื้อ NTHi ที่แยกได้เหล่านี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และดื้อต่อยาต้านจุลชีพในอัตราที่สูง และยิ่งไปกว่านั้นพบ multidrug-resistant NTHi strain ในอัตราที่สูงอีกด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ NTHi สามารถก่อให้เกิด invasive infection ได้ในอัตราที่พอ ๆ กับเชื้อ *H. influenzae* serotype b และการศึกษา OMP และ PFGE pattern ของเชื้อ NTHi ที่แยกได้ พบความหลากหลายทาง phenotype และ genotype ระหว่างสายพันธุ์จากผู้ป่วยที่แยกได้ในประเทศไทย ถึงแม้จะมีข้อจำกัดในเรื่องจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาและมาจากโรงพยาบาลศูนย์เพียงแห่งเดียว ผลการศึกษาที่ได้รับครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความชุกของเชื้อ NTHi ในผู้ป่วยไทย การตระหนักถึงบทบาทความสำคัญของเชื้อ NTHi ในฐานะเชื้อก่อโรค การวางแผนการป้องกัน และควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ NTHi ในประเทศไทยจึงควรได้รับความสนใจ

ovid0kdoyhoผลการศึกษาทางด้าน phenotype และ genotype จากโครงการวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

6. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Bajanca, P., M. Canica and M. S. Group. 2004. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). J Clin Microbiol 42(2): 807-10.
- Bakaletz, L. O. 2001. Peptide and recombinant antigens for protection against bacterial middle ear infection. Vaccine 19(17-19): 2323-8.
- Bakaletz, L. O., B.-J. Kennedy, L. A. Novotny, G. Duquesne, J. Cohen and Y. Lobet. 1999. Protection against development of otitis media induced by nontypeable *Haemophilus influenzae* by both

- active and passive immunization in a chinchilla model of virus-bacterium superinfection. *Infect Immun* 67(6): 2746-62.
- Bakaletz, L. O., E. R. Leake, J. M. Billy and P. T. P. Kaumaya. 1997. Relative immunogenicity and efficacy of two synthetic chimeric peptides of fimbrin as vaccinogens against nasopharyngeal colonization by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla. *Vaccine* 15(9): 955-61.
- Bonifacio da Silva, M. E. and J. M. Martin. 2001. An epidemiology study of *Haemophilus influenzae* at a Brazilian day care center. *Brazilian J Infect Dis* 5(5): 260-8.
- Campos, J., M. Hernando, F. Roman, M. Perez-Vazquez, B. Aracil, J. Oteo, E. Lazaro and F. de Abajo Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid. 2004. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J Clin Microbiol* 42(2): 524-9.
- Chen, M. K., C. C. Wang, M. L. Chu and T. M. Pan. 1999. Prospective surveillance of children with invasive *Haemophilus influenzae* disease in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 32(4): 257-60.
- El-Adhami, W., J. M. Kyd, D. A. Bastin and A. W. Cripps. 1999. Characterization of the gene encoding a 26-kilodalton protein (OMP26) from nontypeable *Haemophilus influenzae* and immune responses to the recombinant protein. *Infect Immun* 67(4): 1935-42.
- Falla TJ, D. W. Crook, L. N. Brophy, D. Maskell, J. S. Kroll and E. R. Moxon. 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 32(10): 2382-6.
- Foxwell, A. R., J. M. Kyd and A. w. Cripps. 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and Prevention. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 294-308.
- Gratten, M., H. Gratten, A. Poli, E. Carrad, M. Raymer and G. Koki. 1986. Colonisation of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of neonates in Papua New Guinea: primary acquisition, duration of carriage, and relationship to carriage in mothers. *Biol Neonate* 50(2): 114-20.
- Green, A., J. Farley, T. Quinn-Dey, R. Deich and G. Zlotnick. 1991. The e (P4) outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* biologic activity of anti-e-serum and cloning and sequencing of the structural gene. *Infect Immun* 59: 3191-8.
- Greisen, K., M. Loeffelholz, A. Purohit and D. Leong. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 32(2): 335-351.
- Hardy, G. G., S. M. Tudor and J. W. R. St Geme. 2003. The pathogenesis of disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Methods Mol Med* 71: 1-28.
- Kilian, M. 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 93: 9-62.
- Kuklinska, D. and M. Kilian. 1984. Relative proportions of *Haemophilus* species in the throat of healthy children and adults. *Eur J Clin Microbiol* 3(3): 249-252.

- Kyd, J. M. and A. W. Cripps. 1998. Potential of a novel protein, OMP26, from nontypeable *Haemophilus influenzae* to enhance pulmonary clearance in a rat model. *Infect Immun* 66(5): 2272-2278.
- Kyd, J. M., A. W. Cripps, L. Novotny and L. Bakaletz. 2003. Efficacy of the 26-kilodalton outer membrane protein and two P5 fimbrin-derived immunogens to induce clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from the rat middle ear and lungs as well as from the chinchilla middle ear and nasopharynx. *Infect Immun* 71(8): 4691-9.
- LaClaire, L. L., M. L. Tondella, D. S. Beall, C. A. Noble, P. L. Raghunathan, N. E. Rosenstein and T. Popovic; Active Bacterial Core Surveillance Team Members. 2003. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol* 41(1): 393-6.
- Luong, D. C., N. Ishiwada, N. Takeda and Y. Kohno. 2004. Serotypes of *Haemophilus influenzae* strains isolated from pediatric patients with respiratory tract infections. *Tohoku J Exp Med* 202(4): 245-54.
- Moor, P. E., P. C. Collignon and G. L. Gilbert. 1999. Pulsed-field gel electrophoresis used to investigate genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b isolates in Australia shows differences between aboriginal and non-aboriginal isolates. *J Clin Microbiol.* 37: 1524-1531.
- Munson, R. S., Jr. 1990. *Haemophilus influenzae*: surface antigens and aspects of virulence. *Can J Vet Res* 54 Suppl: S63-S67.
- Murphy, T. F. 2003. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis* 16(2): 129-34.
- Murphy, T. F. and L. C. Bartos. 1988. Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 56(10): 2673-9.
- Murphy, T. F., K. C. Dudas, J. M. Mylotte and M. A. Apicella . 1993. A subtyping system for non-typeable *Haemophilus influenzae* based on outer membrane proteins. *J Infect Dis* 147: 838-846.
- Neary, J. M., K. Yi, R. J. Karalus and T. F. Murphy. 2001. Antibodies to loop 6 of the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* are bactericidal against multiple strains. *Infect Immun* 69(2): 773-8.
- O'Neill, J. M., J. W. r. St Geme, D. Cutter, E. E. Adderson, J. Anyanwu, R. F. Jacobs and G. E. Schutze. 2003. Invasive disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae* among children in Arkansas. *J Clin Microbiol* 41(7): 3064-9.
- Shann, F. 1999. *Haemophilus influenzae* pneumonia: type b or non-type b?. *Lancet* 354: 1488-1490.
- Smith-Vaughan, H. C., A. J. Leach, T. M. Shelby-James, K. Kemp, D. J. Kemp and J. D. Mathews. 1996. Carriage of multiple ribotypes of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* in Aboriginal infants with otitis media. *Epidemiol Infect* 116: 177-83.

- Smith-Vaughan, H. C., K. S. Sriprakash, J. D. Mathews and D. J. Kemp. 1997. Nonencapsulated *Haemophilus influenzae* in aboriginal infants with otitis media: prolonged carriage of P2 porin variants and evidence for horizontal P2 gene transfer. *Infect Immun* 65(4): 1468-74.
- Straus, W. L., S. A. Qazi, Z. Kundi, N. K. Normani and B. Schwartz. 1998. Antimicrobial resistance and clinical effectiveness of co-trimoxazole versus amoxicillin for pneumonia among children in Pakistan: randomized controlled trial. *Lancet* 352: 270-74.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing and B. Swanminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 41: 63-68.
- Turnak, M. R., S. I. Bandak, S. K. Bouchillon, B. S. Allen and D. J. Hoban. 2001. Antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected during 1999-2000 from 13 countries. *Clin Microbiol Infect* 7(12): 671-7.
- Webb, D. C. and A. W. Cripps. 2000. A P5 peptide that is homologous to peptide 10 of OprF from *Pseudomonas aeruginosa* enhances clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from acutely infected rat lung in the absence of detectable peptide-specific antibody. *Infect Immun* 68(1): 377-81.
- Weinberg, G. A., D. Lehmann, T. T. Tupasi and D. M. Granoff. 1990. Diversity of outer membrane protein profiles of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from children from Papua New Guinea and the Philippines. *Rev Infect Dis.* 12 (suppl 8): S1017-20.
- Yi, K. and T. F. Murphy. 1994. Mapping of strain-specific bactericidal epitope to the surface-exposed loop 5 on the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Microbial Pathogenesis* 71(4): 277-282.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตามที่ได้คาดหวังของโครงการวิจัย

- โดยอาศัยเทคนิค PCR ซึ่งมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูงกว่า conventional serotyping โครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความชุกในอัตราที่สูงของเชื้อ nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) โดยคิดเป็นร้อยละ 92.16 ของเชื้อ *H. influenzae* ที่แยกได้ทั้งหมดจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ของเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง และเป็นที่น่าสังเกตว่าการติดเชื้อ NTHi มีเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่า *H. influenzae* serotype b (2.94%) มาก และการติดเชื้อ NTHi ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศูนย์ดังกล่าว ไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีเหมือนการติดเชื้อจาก *H. influenzae* type b แต่พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ NTHi มีอายุตั้งแต่ 1 ปี ถึง 105 ปี โดยพบการติดเชื้อในอัตราสูงในผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 46 ปีขึ้นไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยสูงอายุ อายุระหว่าง 66-75 ปี และที่น่าสนใจคือ พบเชื้อดังกล่าวก่อโรคในผู้ป่วย invasive infection ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *H. influenzae* serotype b

- การศึกษาคุณสมบัติทาง phenotype ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยเหล่านี้ พบว่าส่วนใหญ่เป็น biotype III ที่เหลือส่วนน้อยเป็น biotype อื่น ๆ แต่ไม่พบ biotype IV จากการศึกษาดังนี้ เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่ามีอัตราการดื้อยาสูงมาก และพบ multidrug resistant strains ในอัตราที่สูงเช่นกัน นอกจากนั้นเชื้อ NTHi ที่แยกได้ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ในอัตราที่สูงเช่นกัน

- การศึกษา outer membrane protein (OMP) profile ของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยไทย โดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีความหลากหลายมาก ทั้งชนิดของ major OMP bands และระดับการแสดงออก (levels of expression) ของ OMP แต่ละชนิด และไม่มีรูปแบบใดที่พบเป็น dominant OMP pattern ของ OMP พบว่าเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยที่ศึกษาเหล่านี้มีการแสดงออกของ major outer membrane proteins ที่ molecular weight ระหว่าง 37-42 kDa และ 26-32 kDa ผลการศึกษานี้จะเป็นความรู้พื้นฐานเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยถึงกลไก และ/หรือบทบาทในการก่อโรค ตลอดจนการพัฒนาวัคซีนในอนาคต

- การศึกษาทาง genotype โดยอาศัยเทคนิค PFGE ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ NTHi strain ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยไทย แม้จะเป็นการศึกษาจากโรงพยาบาลศูนย์เพียงแห่งเดียวก็ตาม อย่างไรก็ตามจากการศึกษาดังกล่าวใช้ศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ NTHi สายพันธุ์ไทยได้ และผลจาก PFGE สามารถยังสามารถบอกถึง NTHi strain ที่ circulate อยู่ในชุมชนนั้นๆ ได้ด้วย

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Kunthalert D. Kamklon P and Pruksakorn S. Isolation and characterization of the clinical nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from Thai patients. บทคัดย่อ การเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ หน้า 234 การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 12-14 ตุลาคม 2549.
2. Anchalee Rawangkarn, Parichart Kamklon and Dungkamol Kunthalert. PCR-based identification and characterization of the clinical nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated at Buddhachinaraj hospital, Phitsanulok. Poster Presentation. 2006. การประกวดโครงการรางวัลนวัตกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 6 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วันที่ 17-19 สิงหาคม 2549
3. Duangkamol Kunthalert. Whole-cell polypeptide profiles and biotype analysis of the clinical nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from Thai patients. Proceedings: Naresuan Research Conference. 2006, 427-433.
4. Kunthalert D. Kamklon P and Pruksakorn S. Genetic and phenotypic characterization of the clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* in Thai patients. การเสนอผลงานวิจัยด้วยวาจา การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 11-13 ตุลาคม 2550.

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ในเชิงวิชาการ: โครงการวิจัยนี้เป็นการเพิ่มประสบการณ์ในการทำงานวิจัยให้แก่นักวิจัยผู้รับทุน ทั้งยังเพิ่มประสบการณ์การเรียนรู้การบริหารงานวิจัยหลังปริญญาเอก เป็นการเพิ่มศักยภาพทางด้านงานวิจัยแก่นักวิจัยผู้รับทุน และสามารถสร้างพื้นฐานทางด้านการวิจัยแก่นิสิตปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ 4 คน

ภาคผนวก

Reprint หรือ manuscript และบทความสำหรับการเผยแพร่

ในขณะนี้ กำลังอยู่ในขั้นตอนการเตรียม Manuscript เพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Kunthalert D. Kamklon P and Pruksakorn S. Isolation and characterization of the clinical nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from Thai patients. บทคัดย่อ การเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ หน้า 234 การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 12-14 ตุลาคม 2549. (เอกสารแนบ)
2. Anchalee Rawangkarn, Parichart Kamklon and Dungkamol Kunthalert. PCR-based identification and characterization of the clinical nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated at Buddhachinaraj hospital, Phitsanulok. Poster Presentation. 2006. การประกวดโครงการรางวัลนวัตกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 6 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วันที่ 17-19 สิงหาคม 2549 (No abstract book)
3. Duangkamol Kunthalert. Whole-cell polypeptide profiles and biotype analysis of the clinical nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from Thai patients. Proceedings: Naresuan Research Conference. 2006, 427-433. (เอกสารแนบ)
5. Kunthalert D. Kamklon P and Pruksakorn S. Genetic and phenotypic characterization of the clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* in Thai patients. การเสนอผลงานวิจัยด้วยวาจา การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 11-13 ตุลาคม 2550. (เอกสารแนบ)