



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ :

การทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลังอย่างมีหลัก
การสำหรับโรคmelioidosis

Construction of a rationally live attenuated
vaccine for melioidosis

โดย ผศ. ดร. ปรีชา หอมจำปา และคณะ

31 มกราคม 2547



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ :

**การทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลังอย่างมีหลัก
การสำหรับโรคmelioidosis**

**Construction of a rationally live attenuated
vaccine for melioidosis**

โดย ผศ. ดร. ปรีชา หอมจำปา และคณะ

31 มกราคม 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ :

การทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง อย่างมีหลักการสำหรับโรคเมลิออยโดซิส

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา หอมจำปา
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มยุรี ลุนช่วง
3. รองศาสตราจารย์ ศรีวิไล วโรภาสตระกูล
4. รองศาสตราจารย์ อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์

สังกัด

คณะเทคนิคการแพทย์ มข
คณะเทคนิคการแพทย์ มข
คณะเทคนิคการแพทย์ มข
คณะเทคนิคการแพทย์ มข

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ : เมลิออยโดซิส

บทคัดย่อ

การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการคุ้มกันโรคที่เกิดจากเชื้อที่สามารถอาศัยอยู่ได้ภายในเซลล์ (intracellular organism) เช่นเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคmelioidosis และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าวัคซีนเชื้อเป็นสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ได้ดี โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดลองผลิตวัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนกำลังลงอย่างมีหลักการสำหรับโรคmelioidosis และเพื่อที่จะประเมินศักยภาพในการที่จะนำมาใช้เป็นวัคซีน โดยใช้หนูเป็นโมเดลในการศึกษา การผลิตวัคซีนดังกล่าวจะอาศัยหลักการที่เรียกว่า rational attenuation โดยการกลาย (mutate) จิน *aroC* ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อในร่างกายของโฮสต์ การดำเนินการเริ่มจากการโคลนจिन *aroC* จากเชื้อ *B.pseudomallei* สายพันธุ์ PHB111 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย โดยอาศัยวิธีการ complement เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ที่จिन *aroC* ถูกทำให้กลายไป การโคลนจिन *aroC* ทำได้โดยการเตรียม partial Sau3AI DNA library ขนาด 2-4 Kb จากนั้นนำไป transform เข้าเชื้อ *E.coli aroC* mutant และคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยการเลี้ยงใน M9 minimal medium ได้ complementing clone จำนวน 3 โคลน เลือก plasmid clone ที่มีขนาดเล็กที่สุด คือ pPHE 146 เพื่อทำการศึกษาดำเนินตำแหน่งของ *aroC* gene โดยเทียบจาก genome sequence ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีรายงานไว้แล้ว ได้ทำการตัด *XhoI* fragment ขนาด 438 bp ซึ่งอยู่ภายใน *aroC* gene ออกไป โคลนที่ได้คือ pPHE149 จะสูญเสียความสามารถในการ complement *E.coli aroC* mutant จากนั้นได้ทำการโคลน *SmaI/HindIII* fragment ซึ่งมี $\Delta aroC$ จาก pPHE149 เข้าไปในเวกเตอร์ pEX19Tc ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่มี *sacB* gene ซึ่งใช้เป็น counterselectable marker โคลนที่ถูกตัดที่ได้คือ PHE 150 ถูกนำไป conjugated กับ เชื้อ *B.pseudomallei* PHB111 และเลือก transconjugants ที่ต้องการบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 5% sucrose เป็นส่วนผสม จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่ฟุ้งสาร aromix ซึ่งจะเป็นเชื้อ *B.pseudomallei* ที่ต้องการ คัดเลือกเชื้อที่ต้องการได้ 2 โคลน (PHB116 และ PHB117) และเลือกเชื้อ PHB117 เพื่อศึกษาต่อไป ผลการตรวจยืนยัน genotype โดยวิธี Southern blotting และวิธี PCR ได้ผลถูกต้องโดยไม่มีส่วนของเวกเตอร์แทรกอยู่ในโครโมโซมของเชื้อ PHB 117 ผลการศึกษาโดยการ immunize หนู Balb/c พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ PHB 116 มีความอ่อนแรงลงอย่างมากโดยมีค่า LD50 มากกว่า 1.96×10^6 cfu ทั้งทาง intraperitoneal และ nasal เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น PHB111 ซึ่งมีค่า LD50 น้อยกว่า 20 cfu ผลการศึกษาศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีน พบว่าการ immunize หนู Balb/c

ทาง intraperitoneal ด้วยเชื้อกลายพันธุ์ PHB 117 จำนวนประมาณ 4×10^7 cfu ครั้งเดียว หรือสองครั้ง ห่างกัน 2 อาทิตย์ จะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด protective immunity ในหนู เมื่อ challenge หนูดังกล่าวด้วยเชื้อตั้งต้น PHB111 ในจำนวนเชื้อประมาณ 10 เท่าของ จำนวน LD50 ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเพื่อดูว่า การ immunize หนู ทาง nasal จะคุ้มกันได้หรือไม่ รวมทั้งการศึกษาในหนูสายพันธุ์ชนิดเพื่อดูว่าจะแตกต่างจากหนูที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้หรือไม่

Abstract

The *aroC* gene from *Burkholderia pseudomallei* strain PHB111, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase (chorismate synthase) was cloned by complementation of the *aroC* mutation in *E. coli* after electroporation with a *Sau3AI* DNA library constructed in pUC18 which had been restricted with *Bam*HI. The *Xho*I fragment of 438 Kb internal of the cloned *aroC* gene was deleted and the resultant *aroC*-containing fragment was reintroduced by allelic exchange into the chromosome of the parental *B. pseudomallei* PHB111 via conjugation using pEX19Tc, a suicide vector containing a *sacB* gene as a counterselectable marker. Two independent Δ *aroC* mutants of *B. pseudomallei* designated PHB116 and PHB117 were isolated. The marker-free *aroC* mutant of *B. pseudomallei* was highly attenuated in a Balb/c mouse model. However, mice immunized intraperitoneally with either a single dose or two doses of the *B. pseudomallei aroC* mutant were not protected against a lethal parental strain challenge. Protection study via nasal inoculation is underway to determine if this route can induce protection.

Executive Summary

ปัญหาวิจัย

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคmelioidosis สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้สูง ถ้าไม่ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง นอกจากนี้เชื้อยังสามารถหลบซ่อนอยู่ในร่างกายและอาจก่อให้เกิด relapse ได้ ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันโรคนี้ วัคซีนที่น่าจะได้ผลดีสำหรับเชื้อนี้เป็นเชื้อชนิด intracellular bacteria น่าจะเป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง การทำให้อ่อนกำลังลงอย่างมีหลักการ น่าจะเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับ เพราะทำให้ทราบถึงหลักการที่ทำให้เชื้ออ่อนกำลังลง นอกจากนี้เชื้อต้องอ่อนกำลังโดยไม่ขึ้นกับว่าระบบภูมิคุ้มกันของผู้ได้รับวัคซีนจะดีหรือไม่ก็ตาม การศึกษาวิจัยทำให้ทราบว่า เชื้อที่มีการกลายของจีนใน pathway ที่ใช้สังเคราะห์สาร aromatic amino acids เช่น จีน *aroA*, *aroC* ฯ จะอ่อนกำลังลงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพราะไม่มี pathway ดังกล่าว ทำให้ไม่มีสารอาหารอย่างเพียงพอที่จะทำให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในร่างกายของโฮสต์ เชื้อจึงอ่อนกำลัง แต่น่าจะอยู่ในร่างกายได้ระยะเวลานานพอที่จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

วัตถุประสงค์

1. ผลิตเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีการกลายของจีน *aroC*
2. ทดสอบการอ่อนกำลังและประเมินศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนูทดลอง

ผลการศึกษา

ได้ทำการโคลนจีน *aroC* จากเชื้อ *B.pseudomallei* โดยวิธี complementation ของเชื้อ *E.coli* *aroC* mutant ทำ restriction map เพื่อทราบตำแหน่งของจีน *aroC* และได้ทำการตัดส่วนกลางของจีนออกไปจำนวน 438 bp จากนั้นได้นำจีน *aroC* ที่ทำให้กลายดังกล่าวแล้วเข้าไปแทนที่ จีน *aroC* ปกติบนโครโมโซมของเชื้อ *B.pseudomallei* ตั้งต้น โดยอาศัยคุณสมบัติของจีน *sacB* ทำให้สามารถผลิตเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีการกลายของจีน *aroC* โดยที่ใช้จีนดื้อยาในการคัดเลือก ผลการศึกษาในหนูทดลองพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตได้ มีความอ่อนแอลงอย่างเห็นได้ชัดตามที่คาดไว้ อย่างไรก็ตามผลการประเมินศักยภาพพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้น protective immunity ในหนู Balb/c เมื่อให้เชื้อเข้าทางช่องท้อง

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางที่ใกล้เคียงกับการติดเชื้อโดยธรรมชาติ เช่นทางช่องจมูก รวมทั้งทดลองในหนูที่มีพันธุกรรมต่างไปจากหนูสายพันธุ์ Balb/c

เนื้อหางานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1. การโคลน (clone) จีน *aroC** จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
2. การทำ restriction map ของจีนที่โคลนได้
3. การผลิต marker-free *aroC* mutant ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
4. การทดสอบระดับการการอ่อนกำลังของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei aroC* mutant
5. ประเมินศักยภาพของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตได้ ในการใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนู Balb/c

1. การโคลนจีน *aroC* จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

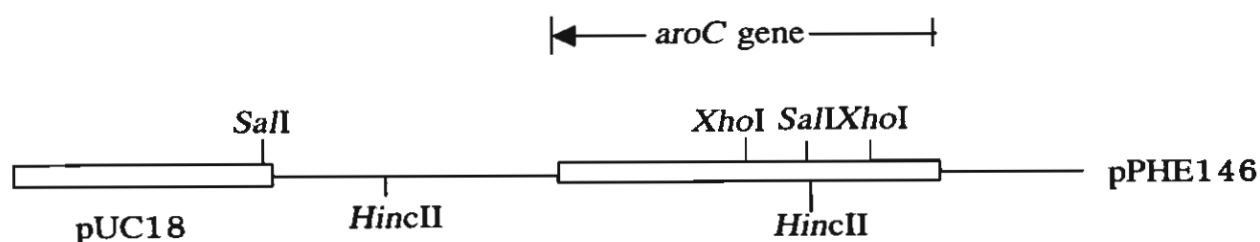
การโคลนจีน *aroC* จะเริ่มจากการเตรียม DNA library โดยสกัด genomic DNA จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* สายพันธุ์ PHB 111 จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แบบ partial แล้วนำมา run agarose gel electrophoresis ตัดชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 2-4 Kb แล้วนำมาสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น insert ซึ่งจะถูกนำไป ligate เข้ากับเวกเตอร์ pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ calf intestinal phosphatase และสกัดให้บริสุทธิ์แล้ว จากนั้นนำ ligated products ที่ได้ไป transform เข้าในเชื้อ *E.coli aroC* mutant (PHE106) เลือก complementing clones ที่ต้องการโดยการนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium ได้โคลนที่ต้องการจำนวน 3 โคลน ตั้งชื่อว่า PHE 145, PHE146 และ PHE147 ตามลำดับ

ทำการสกัด recombinant plasmid จากเชื้อทั้งสามโคลน แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของ plasmid โดย agarose electrophoresis พบว่า plasmid จากโคลน PHE146 มีขนาดเล็กสุด จึงเลือกโคลน PHE146 เพื่อทำการศึกษาต่อไป จากการตรวจสอบอีกครั้งพบว่าเพื่อนำ pPHE146 (ซึ่งเป็น plasmid ที่สกัดจากโคลน PHE146) ไป transform เข้าในเชื้อ *E.coli aroC* mutant พบว่าสามารถ complement เชื้อนี้ได้ แสดงว่า pPHE146 มี functional *aroC* จาก *B.pseudomallei* จริง

*กรุณาอ่านคำชี้แจงในภาคผนวก

2. การทำ restriction map ของ pPHE146

ได้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดในการตัด pPHE146 โดยพิจารณาจากฐานข้อมูลของ Sanger Institute ซึ่งได้ทำ genome sequencing ของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อทำ agarose gel electrophoresis แล้วได้ข้อมูลตรงกับของ Sanger Institute ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดง partial restriction map ของ pPHE146 แสดงเฉพาะ restriction sites ที่สำคัญ (ไม่ได้วาดให้ได้สัดส่วนจริง)

เพื่อยืนยันว่า pPHE146 เป็นโคลนที่มี *aroC* จริง ได้ทำ sequencing โดยทำการ subcloning ดังนี้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SalI* ในการตัด pPHE146 เพื่อ delete *SalI* fragment ออกไป จากนั้นทำ religation fragment ที่เหลือ เมื่อทำ cloning ได้โคลนที่ถูกต้องและตั้งชื่อว่า PHE154 จากนั้นได้ส่งโคลนนี้ไปทำ sequencing โดยใช้ forward primer ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลการทำ sequencing ยืนยันว่าเป็น *aroC* จริง ดังรูปที่ 2

```
3' GAGCGCGCT CATGTAGCCG CGCACCTCGA CGCCGAAGCG CTCGCGCAGC
CACTTCTTCG CGATCGCGCC GCGCGCGACG ACGGGCGCCG TCAGCCGCGC
GGACGAGCGG CCGCCGCCGC GATAGTCGCG CACGCCGTAC TTTTGCCAGT
AGGTGTAATC GGCATGGCCC GGGCGGAACG TCTCGGCGAT GTTGCCGTAG
TCCTTGCTGC GCTGGTCGGT GTTGCGGATC AGGAGCGCGA TCGGCGCGCC
GGTCGTCACG CCCTCGAACA CGCCGGACAG GATCTCGACC TGGTCGGGCT
CCTGGACGCT GCGTGACGTG GCGCGGACGT GCCGGGCTTG CGGCGGTCTGA
GCTCGAGCTG GACGTCGGCT TCCGTGAGCG CCATGCCCGG 5'
```

รูปที่ 2 แสดง partial sequence ของ *aroC* ถัดจาก *SalI* site เข้าไปซึ่งเป็นด้าน 3' end

3. การผลิต marker-free *aroC* mutant ของเชื้อ *B.pseudomallei*

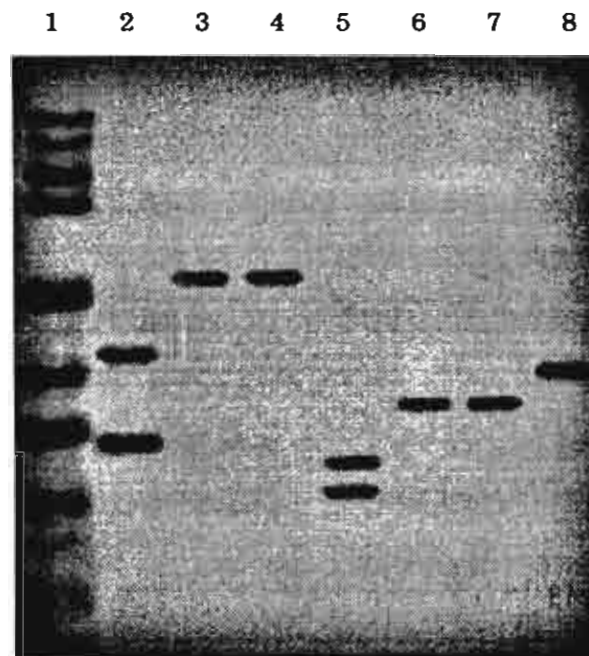
pEX19Tc เป็นเวกเตอร์ที่มีจีน *sacB* ซึ่งใช้เป็น counterselectable marker ซึ่งมีหลักการโดยย่อคือ ถ้าเลี้ยงเชื้อที่มีจีน *sacB* ในสภาวะที่มี 5% sucrose จะทำให้เชื้อตาย จากหลักการนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต marker-free *aroC* mutant ของเชื้อ *B.pseudomallei* ดังนี้

ในขั้นแรกได้ทำการ delete *XhoI* fragment ซึ่งมีขนาด 438 bp ซึ่งอยู่ภายในจีน *aroC* ออกจาก pPHE146 โคลนที่ได้ซึ่งมี mutated *aroC* ตั้งชื่อว่า PHE 149 จากนั้นได้ทำการตัด *SmaI/HindIII* fragment ซึ่งมี mutated *aroC* จาก PHE 149 และโคลนเข้าไปในเวกเตอร์ pEX19Tc โคลนที่ได้ซึ่งมี plasmid ที่ถูกต้องตั้งชื่อว่า PHE150 ในขั้นตอนที่สองจะเป็นการนำ mutated *aroC* เข้าไปแลกเปลี่ยนกับ *aroC* ปกติในโครโมโซมของเชื้อ *B.pseudomallei* PHB111 ซึ่งทำได้ดังนี้ ใช้เชื้อ PHE150 (*E.coli*) ไปทำการ conjugated กับเชื้อ PHB111 และเลือก transconjugants ที่ต้องการใน selective medium ที่มียาเตตราไซคลินและสเตรปโตมัยซิน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ใส่ยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 5 % sucrose โคลนีที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ถูกนำไปตรวจการไวต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และการพึงสาร aromix ในการเจริญเติบโต และจากจำนวนโคโลนีทั้งหมด 444 ที่ทำการตรวจสอบพบโคโลนีที่ไวต่อยาเตตราไซคลิน 6 โคลนี และจากจำนวนนี้มี 2 โคลนีที่แสดงการพึ่งต่อสาร aromix และตั้งชื่อว่า PHB116 และ PHB117 ตามลำดับ

เชื้อที่พึงสาร aromix ในการเจริญเติบโตจะไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium เพราะไม่สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นเช่น 2,3-dihydroxybenzoic acid, สาร PABA รวมทั้งสาร aromatic amino acid ได้เอง ต้องเติมสารเหล่านี้ ซึ่งเป็นส่วนผสมที่เรียกว่า “aromix” ลงไปใน M9 minimal medium จึงจะทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ aromix-dependent colonies ทั้งสามที่แยกได้จึงเป็น candidates ที่จะใช้ *aroC* mutant ที่ต้องการ จึงต้องตรวจยืนยัน genetic profile ด้วยวิธี Southern blotting

ได้นำโคลน PHB116 และ PHB117 ไปทำการทดสอบด้วยวิธีการดังกล่าว โดยการสกัด genomic DNA จากเชื้อทั้งสอง และจากเชื้อตั้งต้น (PHB 111) เดิมเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SaII* และ *HincII* ซึ่งสามารถตัดในส่วน *XhoI* fragment ในจีน *aroC* อย่างละ 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อใช้ fragment ที่มี complete *aroC* gene เป็น probe จะต้องได้ profile แตกต่างกันระหว่างเชื้อตั้งต้นที่มีจีน *aroC* ปกติ และเชื้อ *aroC* mutant ที่ส่วน *XhoI* fragment ถูก deleted ทิ้งไปแล้ว โดยเชื้อตั้งต้นจะพบ 2

bands ในขณะที่เชื้อ *aroC* mutant จะพบเพียง 1 band ซึ่งผลการตรวจสอบยืนยันได้ profile ถูกต้องตามที่คาดไว้ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดง Southern blotting profile เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อ *B.pseudomallei* ตั้งต้น (PHB111) และ เชื้อ *B.pseudomallei aroC* mutant ที่ผลิตขึ้น (PHB116 และ PHB117) (lane 1: 1 Kb ladder (NEB), lane 2 : genomic DNA จากเชื้อ PHB111 ย่อยด้วย *SalI*, lane 3: genomic DNA จากเชื้อ PHB116 ย่อยด้วย *SalI*, lane 4: genomic DNA จากเชื้อ PHB117 ย่อยด้วย *SalI*, lane 5: genomic DNA จากเชื้อ PHB111 ย่อยด้วย *HincII*, lane 6: genomic DNA จากเชื้อ PHB116 ย่อยด้วย *HincII*, , lane 7: genomic DNA จากเชื้อ PHB117 ย่อยด้วย *HincII*, lane 8: *aroC* probe control)

ผลการตรวจโดยใช้ทั้งโมเลกุลของเวกเตอร์ (pEX19Tc) ที่ linearized ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* เป็น probe ไม่พบ signal แต่อย่างใด แสดงว่าไม่พบว่ามีส่วนของเวกเตอร์แทรกอยู่ในส่วนของโครโมโซมของเชื้อ *aroC* mutant แต่อย่างใด ข้อมูลทั้งสองสามารถสรุปได้อย่างมั่นใจว่าเชื้อกลายพันธุ์ทั้งสองที่ผลิตได้เป็นชนิด marker-free *aroC* mutant

ได้เลือกโคลน PHB117 เพื่อทำการศึกษาต่อไป

4. การทดสอบระดับการอ่อนกำลังของเชื้อ *aroC* mutant PHB117

เนื่องจากกว่าจะผลิตเชื้อ PHB117 ได้สำเร็จ เชื้อได้ผ่านขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาหลายครั้ง จึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจสูญเสียความรุนแรงไปบ้างแล้ว ดังนั้นก่อนที่จะนำเชื่อนี้มาใช้ในการทดสอบระดับการอ่อนกำลังในหนูทดลอง จึงได้ทำการฉีดเชื้อดังกล่าวเข้าไปในหนูทางเส้นเลือดที่หาง แล้วทำการเพาะเชื้อจากม้ามภายหลังฉีดเชื้อไปแล้วเป็นเวลาประมาณ 8 ชม (ก่อนหน้านี้ได้ทดลองเพาะแยกเชื้อหลังฉีดไปแล้วเป็นเวลาประมาณ 16 ชม จะตรวจไม่พบเชื้อ) และเก็บเชื้อที่แยกได้จากม้ามไว้ การศึกษาในหนูทดลองทุกครั้งต่อจากนี้ไปจะใช้เชื้อที่แยกได้จากม้ามของหนูเท่านั้น

ได้นำเชื้อ PHB117 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนอยู่ในช่วง log phase มาทำการเจือจางเป็น 10 fold dilution ด้วย PBS pH 7.2 แล้วนำไปฉีดเข้าหนู Balb/c ทางช่องท้อง 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว อีก 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัวเช่นกัน จะให้เชื้อเข้าทางช่องจุมก กลุ่มควบคุมจะได้รับเฉพาะ PBS pH 7.2 จากนั้นตรวจสอบดูอาการของหนู และบันทึกจำนวนหนูที่แสดงอาการติดเชื้อ หรือตาย ผลการทดลองพบว่า เชื้อกลายพันธุ์ PHB117 มีความอ่อนแอลงอย่างมาก เพราะปริมาณเชื้อ 1.96×10^6 cfu ที่ฉีดให้แก่หนูทางช่องท้องไม่สามารถก่อให้เกิดอาการแสดงของโรคในหนู และตลอดระยะเวลา 3 อาทิตย์ไม่พบว่ามีหนูป่วยหรือตาย เช่นเดียวกันกับเมื่อให้เชื้อทางช่องจุมกก็ไม่พบว่ามีหนูที่ได้รับเชื้อ 4.24×10^6 cfu หรือน้อยกว่าแสดงอาการป่วยหรือตายแต่อย่างใด ดังแสดงในตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการฉีดเชื้อ *aroC* mutant (PHB117) เข้าในช่องท้องของหนู Balb/c เพศผู้ อายุอยู่ช่วง 5-6 อาทิตย์

หนูกลุ่มที่	จำนวน (ตัว)	จำนวนเชื้อ PHB117 (cfu)	จำนวนหนูที่ตาย
1	5	1.96×10^6	0
2	5	1.96×10^5	0
3	5	1.96×10^4	0
4	5	1.96×10^3	0
5 (ควบคุม)	5	PBS pH 7.2 (100 ul)	0

ตารางที่ 2 แสดงผลการฉีดเชื้อ *aroC* mutant (PHB117) เข้าในช่องจมูกของหนู Balb/c เพศผู้ อายุอยู่ช่วง 5-6 อาทิตย์

หนูกลุ่มที่	จำนวน (ตัว)	จำนวนเชื้อ PHB117 (cfu)	จำนวนหนูที่ตาย
1	5	4.24×10^6	0
2	5	4.24×10^5	0
3	5	4.24×10^4	0
4	5	4.24×10^3	0
5 (ควบคุม)	5	PBS pH 7.2 (100 ul)	0

เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B.pseudomallei* (PHB 111) ตั้งต้น ซึ่งมีค่า LD50 สำหรับเมื่อให้ทางช่องท้อง น้อยกว่า 20 cfu และ ทางช่องจมูกน้อยกว่า 48 cfu แล้วจะเห็นว่า *aroC* mutant ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่ผลิตได้มีความอ่อนแอลงอย่างเห็นได้ชัด

5. การประเมินศักยภาพของเชื้อ *B.pseudomallei aroC* mutant (PHB117) ในการนำมาใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนู Balb/c

ได้วางแผนการทดลองเพื่อเปรียบเทียบระหว่างการ immunize หนูด้วยเชื้อวัคซีน 1 dose และ 2 doses ซึ่งแต่ละ dose ห่างกัน 2 อาทิตย์ ว่าจะมีความแตกต่างกันในความสามารถที่จะกระตุ้นให้เกิด protective immunity หรือไม่ โดยกลุ่มที่ได้รับ 2 doses นั้นจะได้รับเชื้อวัคซีน PHB117 dose แรกในปริมาณ 4×10^7 cfu ทางช่องท้อง และได้รับ dose ที่สองในปริมาณเชื้อ 4.5×10^7 cfu ทางช่องท้อง ห่างจาก dose แรกเป็นเวลา 2 อาทิตย์ หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่สองเป็นเวลา 2 อาทิตย์จะทำการ challenge หนูด้วยเชื้อ *B.pseudomallei* (PHB111) ด้วย dose ต่างกัน 3 doses โดยฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องเช่นกัน ผลการศึกษาปรากฏว่ากลุ่มหนูที่ได้รับวัคซีนทั้ง 1 และ 2 doses ไม่เกิดภูมิคุ้มกันเพียงพอที่จะคุ้มกันการ challenge ด้วยเชื้อ *B.pseudomallei* (PHB111) ในทุก dose ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการประเมินศักยภาพของเชื้อ *B.pseudomallei aroC* mutant ในการใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนู Balb/c เพศผู้ โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง และ challenge ด้วยเชื้อ *B.pseudomallei aroC* ตั้งต้นทางช่องท้อง

กลุ่มที่	จำนวน หนู	จำนวนเชื้อ dose ที่ 1 (cfu)	จำนวนเชื้อ dose ที่ 2 (cfu)	Challenge dose (cfu)	จำนวนหนูที่ รอดชีวิต
1	5	4×10^7	-	600	0
2	5	4×10^7	-	6000	0
3	5	4×10^7	-	60000	0
4	5	4×10^7	4.5×10^7	600	0
5	5	4×10^7	4.5×10^7	6000	0
6	5	4×10^7	4.5×10^7	60000	0
7	5	กลุ่มควบคุม (ได้รับ PBS)	กลุ่มควบคุม (ได้รับ PBS)	600	0

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีการกลายของจีน *aroC* จะมีความอ่อนกำลังลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้นซึ่งมีความรุนแรงในหนู Balb/c ค่อนข้างสูงมาก แต่อย่างไรก็ตามผลการประเมินศักยภาพในการนำมาทดลองใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนู Balb/c เพศผู้ ปรากฏว่าในปริมาณเชื้อวัคซีน และ regimen ที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่สามารถกระตุ้นให้หนูเกิด immunity ในระดับที่สามารถป้องกันการ challenge ด้วยเชื้อตั้งต้นตั้งแต่ 600 cfu (ประมาณ 30 เท่าของค่า LD50) ขึ้นไป

ผู้วิจัยได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าเป็นไปได้ที่หนูสายพันธุ์นี้ซึ่งมีความไวต่อเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้มาก อาจจะมี background genetic ที่ทำให้ไม่สามารถสร้าง protective immunity ได้อย่างเพียงพอ ต่อการ challenge โดยทาง intraperitoneal ซึ่งเป็นทางที่ไม่ใช่ธรรมชาติของการติดเชื้อ ในขณะที่ regimen ที่เลือกใช้ครั้งนี้ก็อาจจะยังไม่ใช่ regimen ที่เหมาะสมที่สุดก็ได้ นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่า เชื้อกลายพันธุ์นี้อาจจะมีความอ่อนแรงมากเกินไป ทำให้ไม่สามารถอยู่ในร่างกายของหนูได้นานเพียงพอที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังจะเห็นได้จากการที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อวัคซีนได้จากม้ามของหนูภายหลังที่ฉีดเชื้อเข้าทางเส้นเลือดไปแล้วเป็นเวลา 16 ชม แต่สามารถเพาะเชื้อได้จากม้ามภายหลัง

ในระยะเวลา 8 ชม หลังฉีดเชื้อเข้าไป อย่างก็ตาม นี่ถือเป็นเพียงข้อมูลในเบื้องต้นเท่านั้น จะต้องทำการศึกษาย่างละเอียดต่อไปจึงจะสามารถสรุปได้อย่างแน่ชัด

เนื่องจากหนูสายพันธุ์นี้ไวต่อการติดเชื้อ *B.pseudomallei* ที่ให้ทางจมูกโดยมีค่า LD50 ใกล้เคียงกับทางช่องท้อง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่า การ immunize หนูทางช่องจมูกซึ่งถือว่าใกล้เคียงกับการติดเชื้อโดยธรรมชาติ จะสามารถกระตุ้นให้เกิด protective immunity ได้หรือไม่ ขณะนี้ กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาคำถามในประเด็นนี้

ประเด็นที่ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาเพิ่มเติมซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาในเบื้องต้นก็คือ การศึกษาในหนูทดลองที่มีพันธุกรรมต่างจากหนูสายพันธุ์ Balb/c ถ้าผลการศึกษาในเบื้องต้นชี้ว่าให้ผลแตกต่างไปจากเดิม ก็จะเริ่มทำการศึกษาย่างละเอียดต่อไป

Output ที่ได้จากโครงการ

ด้านความรู้ทางวิชาการ

แม้จากผลการทดลองจะชี้ว่าเชื้อกลายพันธุ์ *B.pseudomallei aroC mutant* ที่ผลิตขึ้น จะไม่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัคซีนเชื้อเป็นในหนู Balb/c เมื่อให้ทางช่องท้อง แต่ก็ถือว่านี่คือความรู้ทางวิชาการใหม่ที่ได้รับ เพราะยังไม่มีใครศึกษาวิจัยเรื่องนี้มาก่อน นอกจากจะรู้ว่าเชื้อ *B.pseudomallei aroC mutant* มีความอ่อนกำลังลงอย่างมากตามที่คาดไว้ในทางทฤษฎี การทำให้เชื้อกลายพันธุ์โดยการ knock out จีน *aroC* ซึ่งเป็นจีนในขั้นตอนสุดท้ายของ pathway ที่ใช้ในการสังเคราะห์ aromatic amino acid อาจจะมีผลทำให้เชื้ออ่อนกำลังลงมากเกินไปจนกว่าที่จะสามารถนำมาใช้เป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ ซึ่งประเด็นนี้ได้กระตุ้นให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบกับ knock out จีน *aroB* ซึ่งเป็นจีนในขั้นตอนแรกของ pathway ว่าจะแตกต่างกันหรือไม่ จีนทั้งสองอาจจะอยู่ในลักษณะ operon กับจีนอื่นๆ ที่แตกต่างกัน ซึ่งจีนดังกล่าวอาจจะสำคัญต่อการกระตุ้น protective immunity หรือไม่ก็ได้

การผลิตนักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา

ปัจจุบันโครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยของนักศึกษาในระดับปริญญาเอก ซึ่งได้แก่ ผศ.มยุรี ศรีลุนช่วง ซึ่งถือว่าโครงการนี้มีส่วนช่วยในการผลิตนักวิจัยที่มีความรู้ในระดับลึก ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของการวิจัยทั้งในระดับคณะ มหาวิทยาลัย และ ประเทศต่อไปในอนาคต

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

แม้ว่าข้อมูลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้อาจจะเพียงพอต่อการตีพิมพ์ก็ตาม แต่เนื่องจากผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์เดิมของโครงการมีผลออกมาในเชิงลบ ผู้วิจัยจึงเห็นว่ามีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลกว้างไปกว่าเดิม ที่กำลังอยู่ในระหว่างศึกษาเพิ่มเติมได้แก่ การทดลอง immunize ทางช่องจมูก (กำลังอยู่ในระหว่างการรอหนูที่ส่งจากสำนักสัตว์ทดลอง ซึ่งกำหนดจะส่งหนูในวันที่ 27 กพ ศกนี้) และ การศึกษาในหนูสายพันธุ์ที่ต่างไปจากสายพันธุ์เดิม (ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาในเบื้องต้น) ซึ่งมั่นใจว่าข้อมูลทั้งหมดจะเพียงพอที่จะสามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor ในระดับที่สูงพอสมควรได้ ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript

ภาคผนวก

กำลังอยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript (อ่านคำชี้แจงข้างบน)

* ตามวัตถุประสงค์ของโครงการเดิม จะเป็นการผลิตเชื้อ *B.pseudomallei* ที่มีการกลายของจีน *aroA* ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการโคลนจีนดังกล่าวได้และได้นำเสนอผลงานในคราวประชุมเสนอผลงานที่จังหวัดกาญจนบุรี ปี พศ. 2544 เนื่องจากอยู่ในช่วงที่รออุปกรณ์การทำวิจัย (เครื่อง electroporation) และเป็นช่วงที่ถูกขอให้ไปช่วยงานรองคณบดีฝ่ายวิชาการ ซึ่งในระยะแรกมีงานค่อนข้างหนักมาก จึงหยุดพักงานวิจัยไปชั่วคราว เมื่อได้อุปกรณ์แล้วจึงได้ทราบในภายหลังว่า เชื้อโคลน *aroA* gene ที่เก็บไว้ตาย จึงต้องทำการโคลนใหม่ โดยทำการโคลนทั้ง *aroA* และ *aroC* gene แต่โคลนได้เฉพาะ *aroC* gene จึงได้ตัดสินใจทำการผลิตเชื้อ *aroC* mutant แทนเพราะพิจารณาแล้วเห็นว่าไม่น่าจะแตกต่างกันเพราะเป็นจีนอยู่ใน pathway เดียวกันและอยู่ต่อเนื่องกันโดย *aroC* gene เป็นขั้นสุดท้าย ส่วน *aroA* gene จะอยู่ถัดขึ้นไปอีกชั้นเดียว
