



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างไบโอฟิล์มและ
ความรุนแรงในการก่อโรคของ *Burkholderia pseudomallei*

โดย รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์

มิถุนายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างไบโอฟิล์มและ
ความรุนแรงในการก่อโรคของ *Burkholderia pseudomallei*

ผู้วิจัย : รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยสุภพงษ์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นักวิจัยที่ปรึกษา : ศ. ดร. ทพ. สถิตย์ สิริสิงห

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลต่อไปนี้ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

ศ. ดร. ทพ. สถิตย์ สิริสิงห ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการรวมทั้งให้เชื้อบางส่วนที่ใช้ในการวิจัย

รศ. ชาญณรงค์ อรัญนารถ และ อาจารย์พิพัฒน์พงษ์ แคนลา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในกระบวนการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

Welcome Research Unit คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อบางส่วนที่ใช้ในการวิจัย

และขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ ทำให้โครงการวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

บทคัดย่อ

เมลิออยโคสิสเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* การระบาดของโรคนี้พบมากในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย เชื้อ *B. pseudomallei* ที่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ (Ara^+) มีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่าเชื้อที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose (Ara^-) และในปัจจุบันเชื้อ Ara^+ *B. pseudomallei* ได้ถูกจัดกลุ่มใหม่เป็น *B. thailandensis* แม้ว่าไบโอฟิล์มจะมีบทบาทในการต้านต่อยาปฏิชีวนะ แต่บทบาทของไบโอฟิล์มในพยาธิกำเนิดของโรคเมลิออยโคสิสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^+ 25 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับชนิด Ara^- 25 สายพันธุ์โดยใช้ modified microtiter plate test ผลการวิจัยพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^- มีปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มมากกว่าเชื้อชนิด Ara^+ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยเชื้อชนิด Ara^- (25 strains) และ Ara^+ (25 strains) มีอัตราส่วนการสร้างไบโอฟิล์มเฉลี่ย ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) เท่ากับ 2.54 ± 0.59 และ 0.55 ± 0.06 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5 ที่ใช้เป็น reference strain โดยที่เชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^- และ Ara^+ ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุดได้แก่ strains G207 และ E287 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ ชนิด Ara^- และ Ara^+ ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด ได้แก่ strains A2 และ E261 ตามลำดับ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^- strains G207 และ A2 มีลักษณะการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies ที่ยึดอยู่ด้วย intercellular slime matrix มากกว่าเชื้อชนิด Ara^+ strains E287 และ E261 แต่ในการศึกษานี้ไม่พบว่าปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งชนิด Ara^- และ Ara^+ มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เมื่อเปรียบเทียบ LD_{50} ของเชื้อแต่ละชนิด ผลของการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ต่างๆมีความแตกต่างกัน โดยเชื้อ Ara^- *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่มีปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มมากกว่าเชื้อชนิด Ara^+ อย่างไรก็ตามไม่พบว่าปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* มีความสัมพันธ์กับการเกิด lethal effect โดยดูจากค่า LD_{50} เมื่อทำการศึกษาในหนูทดลอง

Abstract

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. The disease is endemic in Southeast Asia and northern Australia. The Ara⁻ strains of *B. pseudomallei* are known to be virulent whereas Ara⁺ strains are non-virulent. The Ara⁺ strains are now reclassified as *B. thailandensis*. The pathogenesis mechanism of the disease is still unknown. It was found that the production of biofilm was involved in antimicrobial resistance. In the present study, we therefore quantified the biofilm formation of 25 Ara⁻ strains of *B. pseudomallei* compared to 25 Ara⁺ strains using the modified microtiter plate test. The results showed that most of Ara⁻ strains of *B. pseudomallei* produced more biofilm than Ara⁺ strains. The mean ratio of biofilm formation (mean $\pm$ SEM) by Ara⁻ and Ara⁺ strains of *B. pseudomallei* were 2.54 ± 0.59 and 0.55 ± 0.06 respectively. Statistical analysis showed significant difference between Ara⁻ and Ara⁺ strains biofilm formation ($p < 0.01$). Among the 25 Ara⁻ and Ara⁺ strains of *B. pseudomallei* analyzed, the strains G207 and E287 exhibited maximum biofilm production respectively, while the minimum biofilm producing strains of Ara⁻ and Ara⁺ strains of *B. pseudomallei* were A2 and E261 respectively. Transmission electron micrograph of the Ara⁻ *B. pseudomallei* strains G207 and A2 showed microcolony of bacterial cells surrounded by larger amounts of extracellular slime matrix than the Ara⁺ *B. pseudomallei* strains E287 and E261. However, no correlation between the amount of biofilm formation and virulence, judging from the LD₅₀ assay using BALB/c mice. These results indicate that although the ability of selected strains of *B. pseudomallei* to produce biofilm varies from strain to strain, it appears to have no influence on the degree of virulence, judging from LD₅₀.

Key words : *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, biofilm, virulence

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ.....	ii
Abstract.....	iii
สารบัญรูป.....	vi
บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
ระเบียบวิธีการวิจัยและอุปกรณ์การวิจัย.....	5
อุปกรณ์การวิจัย.....	5
เชื้อแบคทีเรียและสัตว์ทดลอง.....	5
วิธีการวิจัย.....	7
1. การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มโดยใช้ modified microtiter plate test...	7
2. การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	8
3. การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ด้วย	
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	8
4. การเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ที่สร้างไบโอฟิล์ม	
มากที่สุดและน้อยที่สุดในหนูทดลอง.....	9
4.1 การศึกษานำร่อง.....	9
4.2 การศึกษา LD ₅₀ ของเชื้อ Ara ⁻ <i>B. pseudomallei</i> strains G207 และ A2.....	9
4.3 การศึกษา LD ₅₀ ของเชื้อ Ara ⁺ <i>B. pseudomallei</i> strains E287 และ E261...	10
5. วิเคราะห์ทางสถิติ.....	10
ผลการวิจัย.....	11
• การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	
โดยใช้ modified microtiter plate test	11

	หน้า
● การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	11
● การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	18
● การเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด และน้อยที่สุดในหนูทดลอง.....	22
บทวิจารณ์.....	26
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก.....	32
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Vogel and Bonner's medium (MVBM) เพื่อกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์ม.....	33
ภาคผนวก ข. ผลงานที่นำเสนอในงานประชุม 6 th FIMSA Advanced Course and Conference	34
รายนามและสถานที่ทำงานของผู้วิจัยและนักวิจัยที่ปรึกษา.....	36

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 : ภาพแสดงอัตราส่วนปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ต่างๆ.....	13
รูปที่ 2 : PAS stain ของเชื้อ Ara ⁻ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (strain G207) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI และ MVBM broth	14
รูปที่ 3 : PAS stain ของเชื้อ Ara ⁻ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด (strain A2) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI และ MVBM broth.....	15
รูปที่ 4 : PAS stain ของเชื้อ Ara ⁺ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (strain E287) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI และ MVBM broth.....	16
รูปที่ 5 : PAS stain ของเชื้อ Ara ⁺ <i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด (strain E261) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI และ MVBM broth.....	17
รูปที่ 6 : ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ชนิด Ara ⁻ เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth	18
รูปที่ 7 : ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ชนิด Ara ⁺ เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth.....	19
รูปที่ 8 : ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ชนิด Ara ⁻ เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth.....	20
รูปที่ 9 : ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ชนิด Ara ⁺ เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth.....	21

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เมลิออยโดสิส เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่มีชื่อว่า *Burkholderia pseudomallei* โรคนี้พบได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรง ซึ่งบางครั้งอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยรายที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โรคดังกล่าวค้นพบครั้งแรกโดย Whitmore และ Krishnaswami ในปี ค.ศ. 1911 ที่เมืองย่างกุ้ง ประเทศพม่า⁽¹⁾ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อครั้งแรกพบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus mallei* ต่อมาได้มีการจัดกลุ่มเชื้อนี้เสียใหม่ โดยมีการเรียกชื่อต่างกันคือ *B. whitmorei*, *Pfeifferella whitmorei*, *P. pseudomallei*, *Actinobacillus pseudomallei*, *Loefflerella whitmorei*, *Malleomyces pseudomallei*, *Pseudomonas pseudomallei*⁽¹⁻⁴⁾ จนในที่สุดตั้งชื่อเชื้อดังกล่าวว่าเป็น *Burkholderia pseudomallei* ดังที่รู้จักในปัจจุบัน เชื้อนี้สามารถตรวจพบได้ในดิน บ่อน้ำนิ่ง ต่าง ๆ หลุมหรือบ่อเล็ก ๆ ที่มีน้ำขัง และในนาข้าว^(5, 6) จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานในน้ำประปา⁽⁷⁾

การระบาดของโรคนี้พบได้ทั่วโลกแต่จะพบมากในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มาร์ดาการาร์ กวม และ ประเทศออสเตรเลีย^(2, 3, 5, 8-12) นอกจากนั้นยังมีรายงานพบโรคนี้กระจายในหลายแห่งทั่วโลก เช่น เกาหลี, ฮองกง, ศรีลังกา, อินเดีย, อิหร่าน, ตุรกี, อังกฤษ, ฝรั่งเศส, แอฟริกา, อดีตสหภาพโซเวียต และสหรัฐอเมริกา^(2, 13-19) สาเหตุที่โรคนี้ได้รับความสนใจทางการแพทย์มากขึ้นเนื่องจากโรคนี้มักเกิดอาการที่รุนแรงอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็ว ตลอดจนได้มีผู้อพยพจากประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ไปสู่ประเทศอื่น ๆ ทั่วโลกมากขึ้นทำให้การระบาดของโรคแพร่กระจายไปได้ง่าย โดยที่แพทย์ในแต่ละประเทศยังไม่มีความชำนาญหรือคุ้นเคยกับโรคดังกล่าว⁽²⁰⁻²³⁾ นอกจากจะพบโรคนี้ในคนแล้วยังสามารถพบได้ในสัตว์พวก แพะ แกะและหมู แต่ยังไม่มียางานว่ามี การติดต่อจากสัตว์มาสู่คนได้^(3, 20) จากการรายงานในการประชุมระดับประเทศที่จัดขึ้นในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ.2531 พบว่าจำนวนผู้ป่วยโรคนี้มีมากขึ้นทุกปี จวบจน ปี พ.ศ.2529 มีผู้ป่วยจำนวน 1,000 ราย เมื่อเทียบกับ ปี พ.ศ.2506 ซึ่งมีเพียง 3 รายเท่านั้น⁽²⁴⁾ เฉพาะที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทย ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นพบว่ามีผู้ป่วยประมาณปีละ 60-80 ราย ในปัจจุบันนี้จากการสำรวจอย่าง ไม่เป็นทางการพบว่าจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในประเทศไทยมีประมาณ 2,000-3,000 ราย จากสถิติที่กล่าว มาแสดงให้เห็นว่าจำนวนผู้ป่วยได้ถูกพบมากขึ้นซึ่งบ่งชี้ว่าแพทย์และบุคลากรทางสาธารณสุขได้เริ่ม สนใจและระมัดระวังในการวินิจฉัยโรคนี้มากยิ่งขึ้น

จากการสำรวจในประเทศไทยโดยวิธีการตรวจจากระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยวิธี Indirect Hemagglutination พบว่า 29% ของประชากรที่ทำการสำรวจ (405 คน) มีแอนติบอดีต่อ เชื้อนี้⁽²⁵⁾ ในประเทศออสเตรเลียก็ได้มีการสำรวจหาระดับของแอนติบอดีได้เช่นกันพบว่าประชากร

ปกติมีระดับแอนติบอดีสูงถึงร้อยละ 5.7% (จากประชากรที่สำรวจทั้งหมด 9,047 ราย) ⁽²⁶⁾ แสดงว่าทั้งประเทศไทยและออสเตรเลียเป็นแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อนี้อย่างมาก

การติดเชื้อในคนเกิดจากการที่เชื้อผ่านเข้าทางผิวหนังที่มีรอย ขีดข่วน ถลอก หรือมีแผล โดยเชื่อนั้นอาจติดมาจากการปนเปื้อนของดินและน้ำหรืออาจเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจจากละอองฝุ่นซึ่งมีเชื้อปนอยู่ ⁽²⁷⁾ อาการของผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้นี้ไม่แน่นอน พบได้หลายแบบมีตั้งแต่แบบเฉียบพลัน (acute), เรื้อรัง (chronic) และแบบที่ไม่มีอาการแต่มีระดับของแอนติบอดีอยู่ (subclinical infection) ความรุนแรงของโรคที่เป็นก็พบได้หลายแบบเช่นกัน โดยมีตั้งแต่รุนแรงมากถึงขั้นเสียชีวิตหรือแบบเป็นแผลเรื้อรัง ตลอดจนแบบที่ไม่มีอาการแต่ระดับแอนติบอดีให้ผลบวก

จากการรายงานผู้ป่วยmelioidosis โคลิส จำนวน 686 ราย พบว่า 57.4% มีอาการเป็นแบบ septicemic melioidosis ⁽²⁸⁾ และในผู้ป่วยที่เป็น septicemia นี้มีอัตราการเสียชีวิตด้วย septic shock สูงถึง 80-90% ถึงแม้ว่าจะได้รับการวินิจฉัยและรักษาอย่างถูกต้องแล้วก็มีอัตราการตายสูงถึง 40% ส่วนในกรณีที่มีอาการแบบเรื้อรังนั้นอาจมีการลุกลามเข้าสู่อวัยวะต่าง ๆ ได้เช่น ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ ต่อม้ำเหลืองและสมอง (2, 9, 11, 12, 16-19, 21-23, 29) แสดงให้เห็นว่าโรคmelioidosis นี้มีความรุนแรงมากและควรได้รับการสนใจจากวงการแพทย์เป็นอย่างยิ่ง

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยmelioidosis คือการกลับเป็นซ้ำ (relapse) จากการศึกษาของวิภาดา เชาวกุลและคณะ พบว่าประมาณ 23% ของผู้ที่เคยเป็นmelioidosis จะกลับเป็นซ้ำอีก และพบว่ามีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ส่วนคือ ความรุนแรงของการติดเชื้อครั้งแรก และวิธีการและชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษา โดยพบว่าหากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรกเป็น septicemic melioidosis หรือ multifocal localized melioidosis จะมีโอกาสเป็นmelioidosis ได้มากกว่าในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรกเป็น localized melioidosis ประมาณ 5 เท่า ⁽³⁰⁾ นอกจากนี้ Desmarchelier และคณะ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งครั้ง โดยวิธี ribotyping พบว่าในผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ศึกษา เชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากการติดเชื้อครั้งแรกมักเป็นเชื้อที่มี ribotype เดียวกันกับเชื้อที่แยกได้ในผู้ป่วยรายเดียวกันเมื่อเป็นโรคmelioidosis ครั้งที่สอง ⁽³¹⁾

จากการศึกษาของ Vorachit และคณะ ⁽³²⁾ พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้าง exopolysaccharide glycocalyxes และเจริญเป็น glycocalyx enclosed microcolonies (biofilm) ได้ทั้งในงานเพาะเชื้อและในสัตว์ทดลองซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kapliev และคณะ ⁽³³⁾ นอกจากนี้ Vorachit และคณะ ยังพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เจริญขึ้นเป็นไบโอฟิล์มสามารถต่อต้านต่อยา ceftazidime และ co-trimoxazole ได้ ⁽³⁴⁾ ดังนั้นความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคแบบเรื้อรังและการกลับเป็นซ้ำของโรคmelioidosis เนื่องจากยาปฏิชีวนะไม่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด

มีรายงานการศึกษามากมายที่บ่งชี้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มและเจริญเติบโตอยู่ในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อแอนติบอดี (antibodies) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และ สารต้านเชื้อจุลชีพ (antibacterial agents) ต่างๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่แยกกันอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (planktonic cells) นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังสามารถปกป้องเชื้อแบคทีเรียจากระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้ เช่น ปกป้องเชื้อแบคทีเรียจาก complement activation และ phagocyte-mediated killing (27, 35-41)

อย่างไรก็ตามบทบาทของไบโอฟิล์มในพยาธิกำเนิดของโรคเมลิออยโดสิสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาบทบาทของไบโอฟิล์มในประเด็นดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่อาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการรักษาโรคเมลิออยโดสิสต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ต่างๆ ทั้งชนิด Ara⁺ และ Ara⁻
- 2 เปรียบเทียบความรุนแรงในการก่อโรกระหว่างเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุดและน้อยที่สุดในหนูทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษากลไกการเกิดโรคเมลิออยโดสิสต่อไป
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคเมลิออยโดสิสต่อไป

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ Smith และคณะ⁽⁴²⁾ พบว่า *B. pseudomallei* ชนิด nonvirulent สามารถแยกจากชนิด virulent ได้โดยอาศัยความสามารถในการใช้น้ำตาล L-arabinose โดยเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ (Ara^+) มีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่าเชื้อที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose (Ara^-)

Steinmetz และคณะ พบว่า monoclonal antibody (MAb) 3015 IgG1 ซึ่งจำเพาะต่อ exopolysaccharide ทางด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ *B. pseudomallei* จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเชื้อที่เป็น virulent strain ชนิด Ara^- เท่านั้นและ MAb 3015 นี้ได้มาจากการ immunization ในหนูทดลองโดยการให้เชื้อ *B. pseudomallei* ที่เป็น mucoid strain^(43, 44)

Ulett และคณะ (2001)⁽⁴⁵⁾ ซึ่งได้ศึกษาระดับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^- 42 strains และชนิด Ara^+ 2 strains ในหนูทดลอง (BALB/c) พบว่า ระดับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^- อยู่ระหว่าง < 10 CFU ถึง $> 10^7$ CFU ส่วนเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^+ มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคอยู่ระหว่าง 2×10^5 CFU ถึง 10^7 CFU ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Russell and Bell (2000)⁽⁴⁶⁾ ที่ได้รายงานค่า minimum lethal dose ของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara^+ ในหนูทดลอง (BALB/c) ว่ามีค่าเท่ากับ $>10^6$ CFU

มีรายงานการศึกษามากมายที่บ่งชี้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มและเจริญเติบโตอยู่ในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อแอนติบอดี (antibodies) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และ สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antibacterial agents) ต่างๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่แยกกันอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (planktonic cells) นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังสามารถปกป้องเชื้อแบคทีเรียจากระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้ เช่น ปกป้องเชื้อแบคทีเรียจาก complement activation และ phagocyte-mediated killing^(27, 35-41, 47, 48) ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่ในไบโอฟิล์มจึงมักเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคระยะเรื้อรัง (chronic phase), asymptomatic infection (dormant stage) และการกลับเป็นซ้ำ (relapse) ของโรค

รายงานของ Vorachit และคณะ⁽³²⁾ พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถสร้าง exopolysaccharide glycocalyxes และเจริญเป็น glycocalyx enclosed microcolonies (biofilm) ได้ทั้งในจานเพาะเชื้อและในสัตว์ทดลองซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kapliev และคณะ⁽³³⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ยา ceftazidime และ cotrimoxazole ได้⁽³⁴⁾ ดังนั้นความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคแบบเรื้อรังและการกลับเป็นซ้ำของโรคเมลิออยโดสิสเนื่องจากยาปฏิชีวนะไม่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด

ระเบียบวิธีการวิจัยและอุปกรณ์การวิจัย

อุปกรณ์การวิจัย

1. หลอดทดลอง (Test tube)
2. ปิเปตอัตโนมัติ ขนาดเล็ก (Semiautomatic micropipette)
3. แท่งแก้วกระจายเชื้อ (Spreader)
4. ตู้เพาะเชื้อ (Incubator)
5. จานเพาะเชื้อ (Petri dishes)
6. ปีกเกอร์ (Beaker)
7. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
8. Hot plate
9. Water bath
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Lamp)
11. ตู้อบไอน้ำ (Autoclave)
12. Sterile plastic tip
13. Vortex mixer
14. เครื่องชั่งสาร
15. Microtiter plate
16. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
17. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)
18. หลูป้ายเชื้อ
19. ตะเกียงนูนเลน
20. กล้องจุลทรรศน์
21. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
22. เครื่อง Spectrophotometer

เชื้อแบคทีเรียและสัตว์ทดลอง

- เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ เชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ 25 strains ซึ่งแยกได้จากดินและเชื้อชนิด Ara⁻ 25 strains ซึ่งแยกได้จากทั้งผู้ป่วยและดิน ข้อมูลของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงไว้ในตารางที่ 1
- หนูทดลองที่ใช้ในการวิจัย เป็นหนู inbred สายพันธุ์ BALB/c ซึ่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวประมาณ 30±5 กรัม

ตารางที่ 1 ข้อมูลของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ 25 strains และ Ara⁺ 25 strains

<i>B. pseudomallei</i> ชนิด Ara ⁻			<i>B. pseudomallei</i> ชนิด Ara ⁺		
Strain no.	Date of isolation (d/m/y)	Source	Strain no.	Date of isolation (d/m/y)	Source
A 2	-	Blood	E017	15/7/1990	Soil from northeast
3-139	10/8/2001	Pus	E018	15/7/1990	Soil from northeast
354	1997	Soil from northeast	E030	2/8/1990	Soil from northeast
466	1997	Soil from northeast	E042	27/9/1990	Soil from northeast
5-19	02/1/2001	Sputum	E111	25/3/1991	Soil from northeast
1-781	17/6/2001	Blood	E125	25/3/1991	Soil from northeast
1-197	05/6/2001	Blood	E185	18/6/1992	Soil from northeast
H 602	13/8/2001	Blood	E201	18/6/1992	Soil from northeast
H 1038	23/2/2001	Blood	E202	18/6/1992	Soil from northeast
1-184	04/11/2001	Blood	E207	18/6/1992	Soil from northeast
844	1997	Soil from northeast	E251	10/9/1992	Soil from central
H544	-	Blood	E256	10/9/1992	Soil from central
1-20	01/11/1997	Blood	E260	10/6/1993	Soil from central
5-307	16/6/2001	Sputum	E261	10/6/1993	Soil from central
3-190	13/8/2001	Pus	E267	15/6/1993	Soil from central
H777	14/2/2000	Blood	E273	19/6/1993	Soil from northeast
A20	-	Blood	E274	19/6/1993	Soil from northeast
SP340	20/8/2001	Sputum	E276	19/6/1993	Soil from northeast
745	1997	Soil from northeast	E285	13/7/1993	Soil from central
279	1997	Soil from northeast	E287	22/6/1994	Soil from central
SP278	15/4/2000	Sputum	E288	31/5/1994	Soil from central
A8	-	Brain	E290	31/5/1994	Soil from central
5-265	16/7/2001	Sputum	E295	31/5/1994	Soil from central
1219	1997	Soil from northeast	E346	08/9/1998	Soil from northeast
G207	28/1/1998	Sputum	UE5	-	Soil from northeast

วิธีการวิจัย

1. การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มโดยใช้ modified microtiter plate test

การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ 25 strains และ Ara⁺ 25 strains โดยการใช้ modified microtiter plate test ทำตามวิธีของ Stepanovic และคณะ⁽⁴⁹⁾ โดยในขั้นแรกทำการแบ่งเชื้อออกเป็น 10 กลุ่มๆละ 5 strains ในการทดลองแต่ละกลุ่มจะใช้เชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5 เป็นตัวเปรียบเทียบทุกกลุ่มเพื่อที่จะสามารถนำปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละตัวมาคำนวณเป็นอัตราส่วนของไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5 ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Vogel and Bonner's medium (MVBM) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้น⁽⁵⁰⁾ อาหารเลี้ยงเชื้อ MVBM ประกอบด้วย Citric acid, MgSO₄, NaNH₄HPO₄ และ K₂HPO₄ (ดูรายละเอียดวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวก ก) นำเชื้อแต่ละกลุ่มมาเพาะเลี้ยงใน MVBM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และปรับปริมาณเชื้อแต่ละชนิดให้มีปริมาณเท่ากันโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer วัดความขุ่นให้มีค่าประมาณ 0.9 ที่ 540 นาโนเมตร จากนั้นนำเชื้อใส่ลงใน sterile 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate ซึ่งมีฝาปิด โดยใส่เชื้อชนิดละ 8 หลุมในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร หลุมที่เป็น negative control ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ MVBM นำ plate เข้าในตู้เพาะเชื้อ (incubator) ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้น ดูดสารละลายในแต่ละหลุมออกเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่เกาะกับ plate แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MVBM ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เลี้ยงเชื้อต่อในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก แล้วล้างแต่ละหลุมด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (sterile deionized distilled water) ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่เกาะกับ plate ก่อนที่จะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MVBM ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เพาะเชื้อในตู้เพาะเชื้ออีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก แล้วล้างแต่ละหลุมด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร โดยล้างหลุมละ 3 ครั้งเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่เกาะกับ plate ส่วนเชื้อที่เกาะติดกับ plate จะถูก fixed ด้วย 99% methanol ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบ 15 นาทีแล้ว เท methanol ใน plate ออก ทิ้งไว้ให้ plate แห้ง จากนั้นนำ plate ไปย้อมด้วย 2% crystal violet ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาทีแล้ว ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา (running tap water) ทิ้งไว้ให้ plate แห้ง ละลายสีที่เกาะติดกับตัวเชื้อในแต่ละหลุมด้วย 33% (v/v) glacial acetic acid ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัด optical density (OD) ในแต่ละหลุมด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยวัดที่ 630 นาโนเมตร นำค่า OD₆₃₀ ที่ได้จากการทดสอบมาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณอัตราส่วนปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* strains ต่างๆเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5 ดังนี้

$$\text{Ratio of biofilm formation} = \text{mean OD}_{630} (\text{tested strain of } Burkholderia) / \text{mean OD}_{630} (\text{UE5})$$

2. การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำตามวิธีของ Vorachit และคณะ⁽³²⁾ โดยเลือกเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ และ Ara⁻ (จากข้อ 1) ที่ให้ค่า OD₆₃₀ มากที่สุดและน้อยที่สุด อย่างละ 1 ชนิด มาเพาะเลี้ยงใน MVBM และ brain heart infusion (BHI) broth (Difco Laboratories) โดยเพาะเชื้อใน shaker-incubator ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเชื้อ *B. pseudomallei* จาก MVBM และ BHI broth มากระจาย (subculture) บน nutrient agar plate แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบ 18 ชั่วโมงแล้ว ล้าง (washed off) เซลล์แบคทีเรียออกจาก agar plate โดยใช้ 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH7.2 จากนั้นนำไปย้อมด้วยวิธี Periodic acid-Schiff stain ตามวิธีของ McManus⁽⁵¹⁾ แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

3 การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำตามวิธีของ Vorachit และคณะ⁽³²⁾ โดยเลือกเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ และ Ara⁻ (จากข้อ 1) ที่ให้ค่า OD₆₃₀ มากที่สุดและน้อยที่สุด อย่างละ 1 ชนิด มาเพาะเลี้ยงใน MVBM และ BHI broth โดยเพาะเชื้อใน shaker-incubator ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียในหลอดทดลองไปทำปฏิกิริยากับ 100 ไมโครลิตร undiluted, decomplexed high-titer specific antiserum ซึ่งได้จากผู้ป่วยเมลิออยโดสิส ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดทดลองไป centrifuged แล้วล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย PBS จากนั้นทำการ fixed เซลล์แบคทีเรียด้วย 5% glutaraldehyde ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 M cacodylate (pH 7.2) ที่มี 0.15% ruthenium red ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบ 12 ชั่วโมงแล้ว ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย cacodylate buffer ที่มี 0.05% ruthenium red จากนั้น enrobed ใน 4% agar แล้วนำไปล้างด้วยสารละลาย buffered ruthenium red อีก 5 ครั้งๆละ 10 นาที แล้ว post-fixed ด้วย 2% OsO₄ ในสารละลาย buffered ruthenium red เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปล้างด้วย cacodylate buffer แล้ว dehydrated ใน 20, 30, 50, 70, 90, 100% acetone และ 100% propylene oxide (x2) แล้วนำไป embedded ใน SPURR resin (EMS) ขึ้นตัวอย่างจะถูกตัดเป็นชิ้นบาง (thin sections) แล้วย้อมด้วย 1% uranyl acetate aqueous solution (pH 4.8) และ lead citrate จากนั้นชิ้นตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Hitachi, H600, Japan)

4. การเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุดและน้อยที่สุดในหนูทดลอง

4.1 การศึกษานำร่อง

ทำการศึกษาโดยแบ่งหนูทดลอง BALB/c ออกเป็น 17 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว จากนั้นนำเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strain G207) และน้อยที่สุด (strain A2) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน MVBM broth มาฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลองกลุ่มที่ 1-8 โดยฉีดในปริมาณ 10, 10², 10³, 10⁴ CFU/mice ในแต่ละกลุ่มตามลำดับ หนูทดลองกลุ่มที่ 9-16 จะถูกฉีดด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strain E287) และน้อยที่สุด (strain E261) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน MVBM broth โดยฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาณ 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ CFU/mice ในแต่ละกลุ่มตามลำดับ ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ 17 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วย sterile normal saline เข้าทางช่องท้องในปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นสังเกตอาการของหนูทดลองเป็นระยะๆ เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกจำนวนหนูที่ตายเพื่อนำมาใช้คำนวณค่า LD₅₀ ตามวิธีของ Reed and Muench⁽⁵²⁾

ผลการศึกษานำร่อง

ค่า LD₅₀ ของเชื้อ *B. pseudomallei* strains G207, A2, E287 และ E261 มีดังนี้

G207 = < 10 CFU

A2 = 35.48 CFU

E287 = < 10⁶ CFU

E261 = 5.62 x 10⁶ CFU

4.2 การศึกษา LD₅₀ ของเชื้อ Ara⁻ *B. pseudomallei* strains G207 และ A2

ทำการศึกษาโดยแบ่งหนูทดลอง BALB/c ออกเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว จากนั้นนำเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strain G207) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน MVBM broth มาฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลองกลุ่มที่ 1-5 โดยฉีดในปริมาณ 3, 3², 3³, 3⁴, 3⁵ CFU/mice ในแต่ละกลุ่มตามลำดับ หนูทดลองกลุ่มที่ 6-10 จะถูกฉีดด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มน้อยที่สุด (strain A2) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน MVBM broth โดยฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาณ 3², 3³, 3⁴, 3⁵, 3⁶ CFU/mice ในแต่ละกลุ่มตามลำดับ ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ 11 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วย sterile normal saline เข้าทางช่องท้องในปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นสังเกตอาการของหนูทดลองเป็นระยะๆ เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกจำนวนหนูที่ตายและคำนวณค่า LD₅₀ ตามวิธีของ Reed and Muench⁽⁵²⁾

4.3 การศึกษา LD₅₀ ของเชื้อ Ara⁺ *B. pseudomallei* strains E287 และ E261

ทำการศึกษาโดยแบ่งหนูทดลอง BALB/c ออกเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว จากนั้นนำเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด (strain E287) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน MVBM broth มาฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลองกลุ่มที่ 1-5 โดยฉีดในปริมาณ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/mice ในแต่ละกลุ่มตามลำดับ หนูทดลองกลุ่มที่ 6-10 จะถูกฉีดด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มน้อยที่สุด (strain E261) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน MVBM broth โดยฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาณ 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mice ในแต่ละกลุ่มตามลำดับ หนูทดลองกลุ่มที่ 11 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วย sterile normal saline เข้าทางช่องท้อง ในปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นสังเกตอาการของหนูทดลองเป็นระยะๆ เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกจำนวนหนูที่ตายและคำนวณค่า LD₅₀ ตามวิธีของ Reed and Muench ⁽⁵²⁾

วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลและเปรียบเทียบอัตราส่วนปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มระหว่าง *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ และ Ara⁻ โดยใช้ Student's *t*-test

ผลการวิจัย

การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการใช้ modified microtiter plate test

ตารางที่ 2 และรูปที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณของไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ 25 strains และ Ara⁺ 25 strains จากตารางที่ 2 และ diagram พบว่าการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ strains G207 และ A2 มีปริมาณมากที่สุดและน้อยที่สุดตามลำดับ ส่วนเชื้อชนิด Ara⁺ ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุดและน้อยที่สุด ได้แก่ strains E287 และ E261 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ มีปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มมากกว่าเชื้อชนิด Ara⁺ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยพบว่าเชื้อชนิด Ara⁻ (25 strains) และ Ara⁺ (25 strains) มีอัตราส่วนการสร้างไบโอฟิล์มเฉลี่ย (mean $\pm$ SEM) เท่ากับ 2.54 ± 0.59 และ 0.55 ± 0.06 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5

การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* strains G207, A2, E287 และ E261 โดยการย้อมด้วยวิธี Periodic acid-Schiff (PAS) stain ตามวิธีของ McManus แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อตัวอย่างทั้ง 4 strains (Ara⁻ 2 strains และ Ara⁺ 2 strains) ให้ผลบวก (positive) ต่อ PAS stain (รูปที่ 2-5) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้ง 4 strains นี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเชื้อทั้ง 4 strains จะให้ผลบวกต่อ PAS stain แต่พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* strains G207 และ E287 มีการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth (รูปที่ 2ข และ 4ข) มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth (รูปที่ 2ก และ 4ก) ส่วนเชื้อ *B. pseudomallei* strains A2 และ E261 มีลักษณะการกระจายตัวที่คล้ายคลึงกันทั้งใน MVBM และ BHI broth และพบว่าเชื้อทั้ง 2 strains ดังกล่าวมีการติดสี PAS เข้มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth (รูปที่ 3 และ 5)

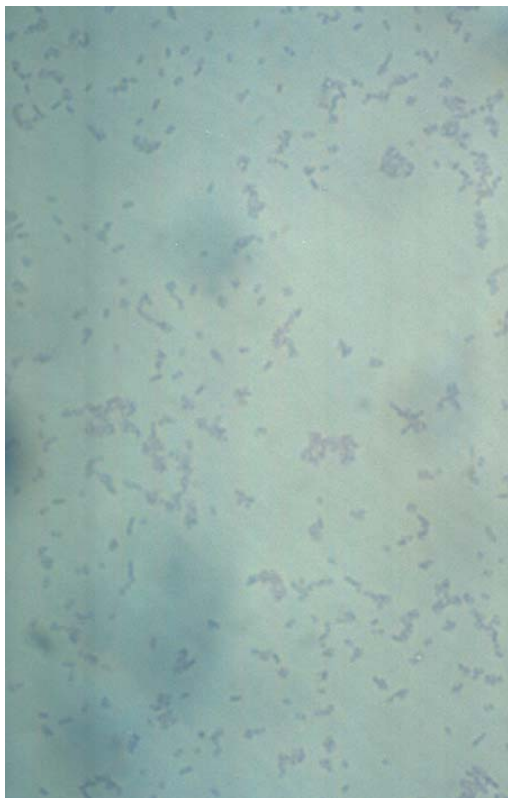
ตารางที่ 2 อัตราส่วนปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ต่างๆเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. pseudomallei* strain UE5

Strains of <i>B. pseudomallei</i> (Ara ⁺)	Relative quantity of biofilm formation (compare to UE5)	Strains of <i>B. pseudomallei</i> (Ara ⁻)	Relative quantity of biofilm formation (compare to UE5)
E 261	0.103	A2	0.569
E 260	0.108	3-139	0.693
E 290	0.120	354	0.701
E 201	0.146	466	0.772
E 018	0.236	5-19	0.810
E 267	0.266	1-781	0.851
E 276	0.294	1-197	0.911
E 285	0.363	H602	0.934
E 273	0.365	H1038	0.939
E 125	0.405	1-184	1.062
E 346	0.431	844	1.074
E 111	0.441	H544	1.174
E 017	0.471	1-20	1.179
E 295	0.531	5-307	1.404
E 288	0.559	3-190	1.570
E 251	0.670	H777	2.649
E 202	0.719	A20	2.809
E 274	0.757	SP340	2.940
E 256	0.829	745	2.943
E 185	0.849	279	3.113
E 207	0.872	SP278	3.322
E 030	0.924	A8	4.233
E 042	0.993	5-265	4.994
UE5	1.000	1219	7.808
E 287	1.224	G207	13.939

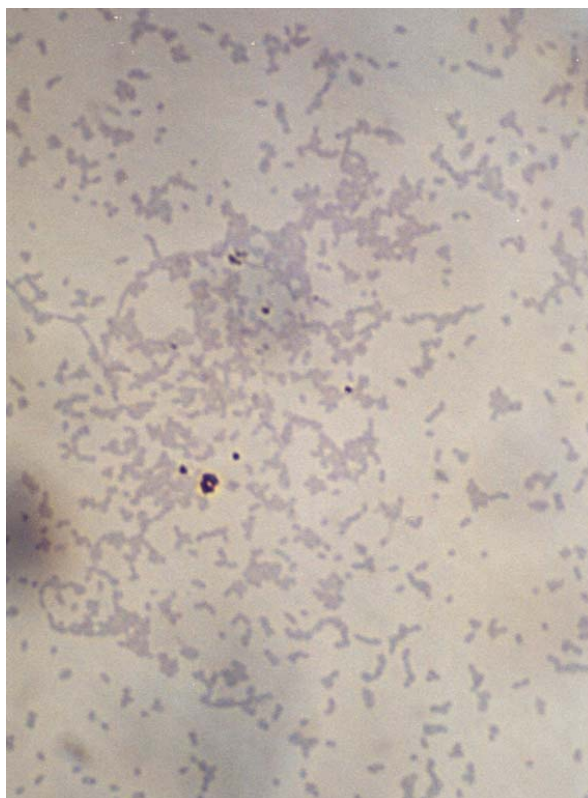


รูปที่ 1 แสดงอัตราส่วนปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* strains ต่างๆ

(ก)



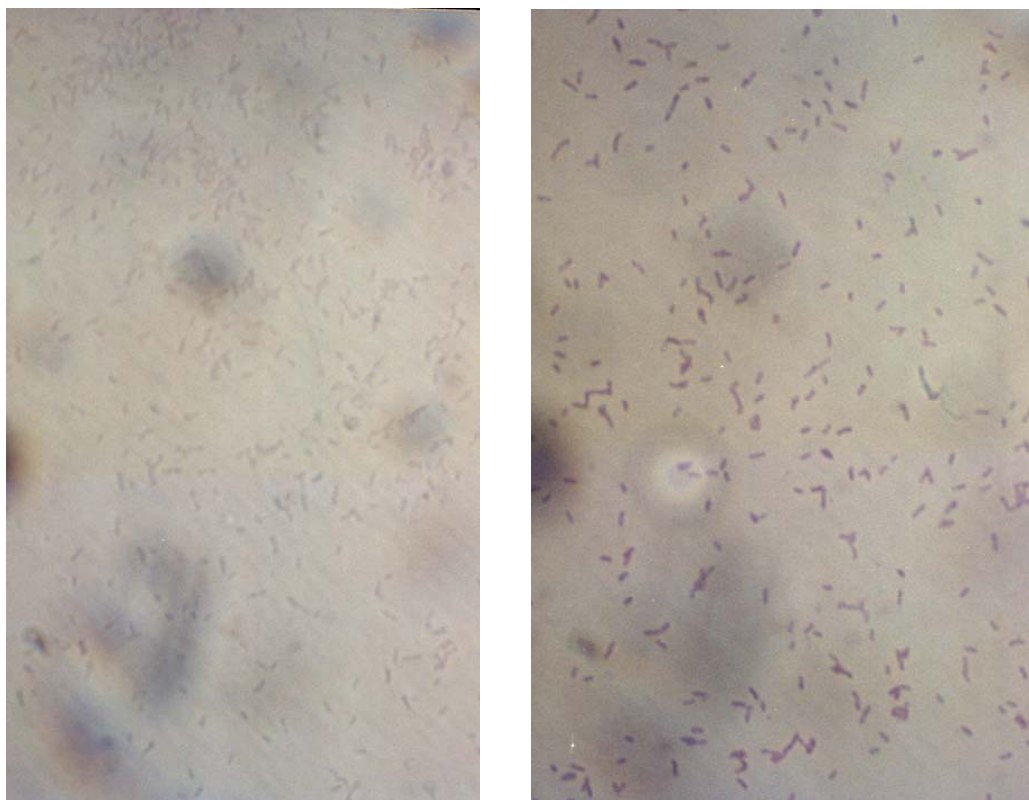
(ข)



รูปที่ 2 PAS stain ของเชื้อ Ara⁻ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (strain G207) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (ก) และ MVBM broth (ข) แสดงการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth (กำลังขยาย × 1,000)

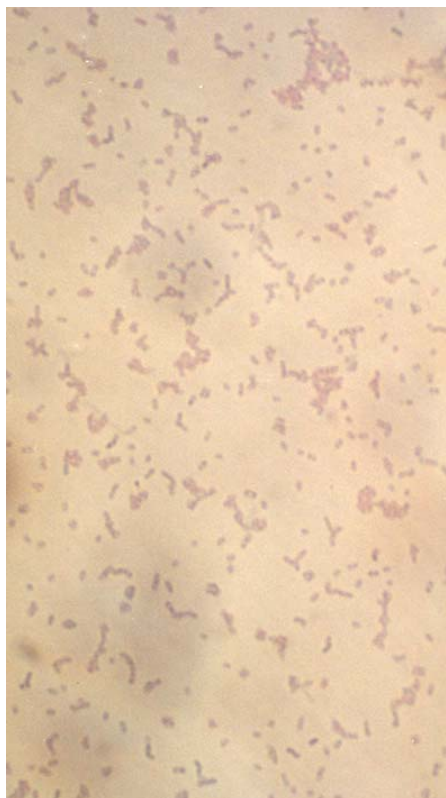
(ก)

(ข)

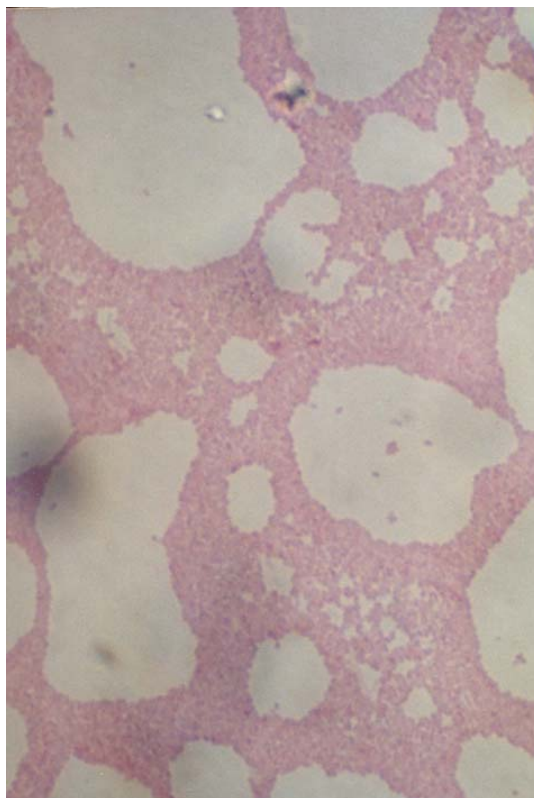


รูปที่ 3 PAS stain ของเชื้อ Ara⁻ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด (strain A2) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (ก) และ MVBM broth (ข) แสดงลักษณะการกระจายตัวที่คล้ายคลึงกันทั้งใน MVBM และ BHI broth ซึ่งในทั้งสองกรณีนี้ ไม่พบ microcolonies เลย (โปรดเปรียบเทียบกับรูปที่ 2) แต่การติดสี PAS เข้มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth ทำให้เห็นเซลล์ชัดกว่าใน BHI broth (กำลังขยาย × 1,000)

(ก)

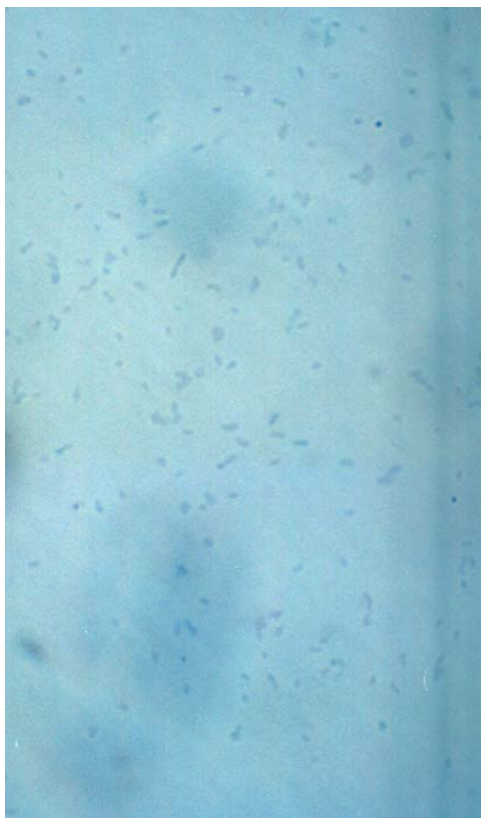


(ข)

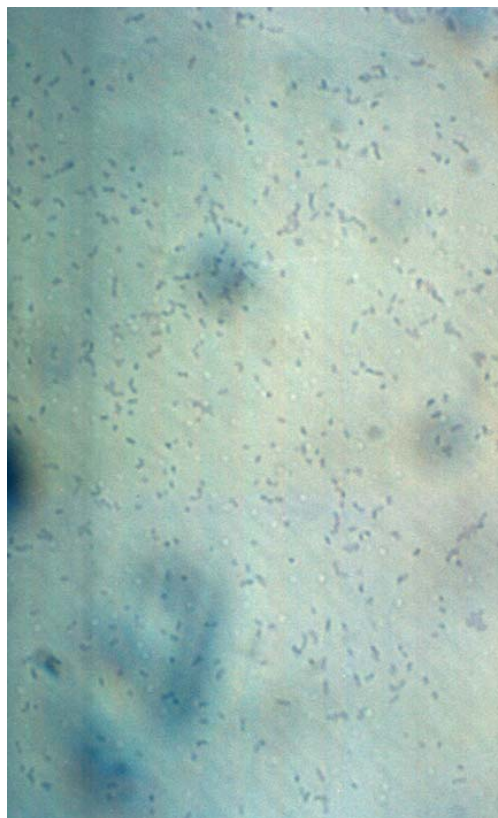


รูปที่ 4 PAS stain ของเชื้อ Ara⁺ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (strain E287) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (ก) และ MVBM broth (ข) แสดงการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies เมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth (กำลังขยาย × 1,000)

(ก)



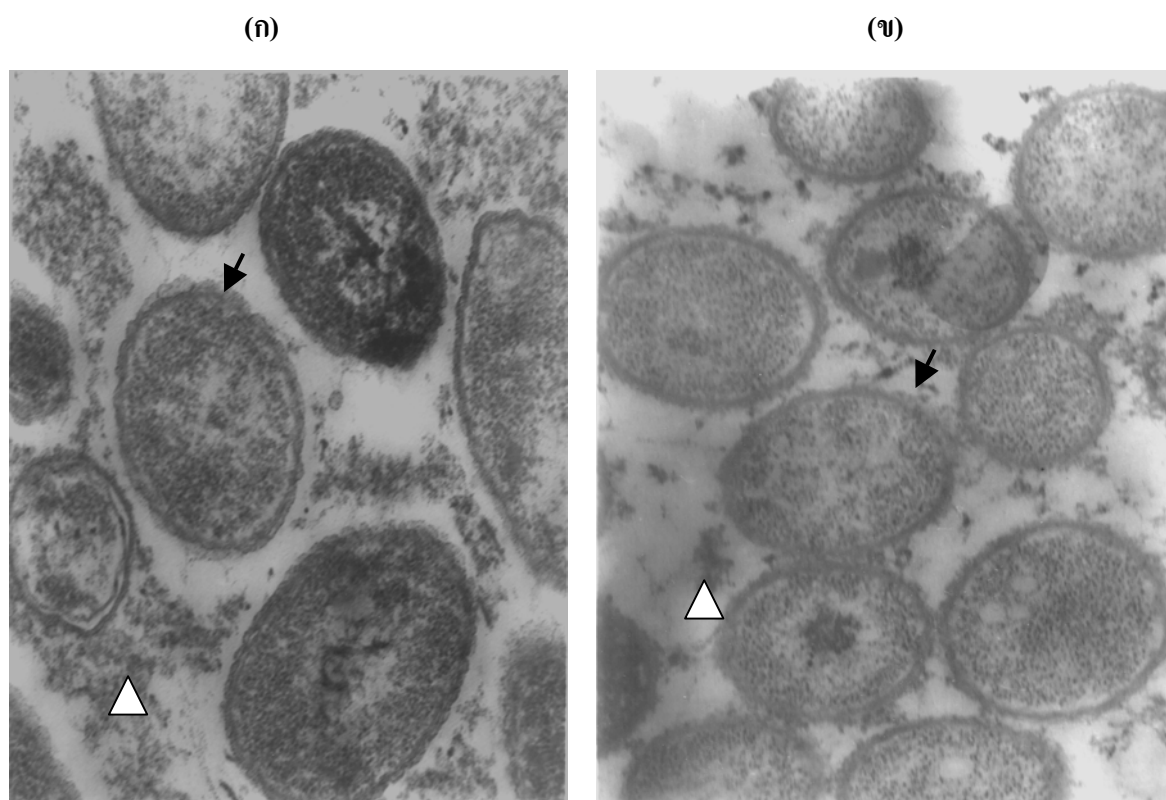
(ข)



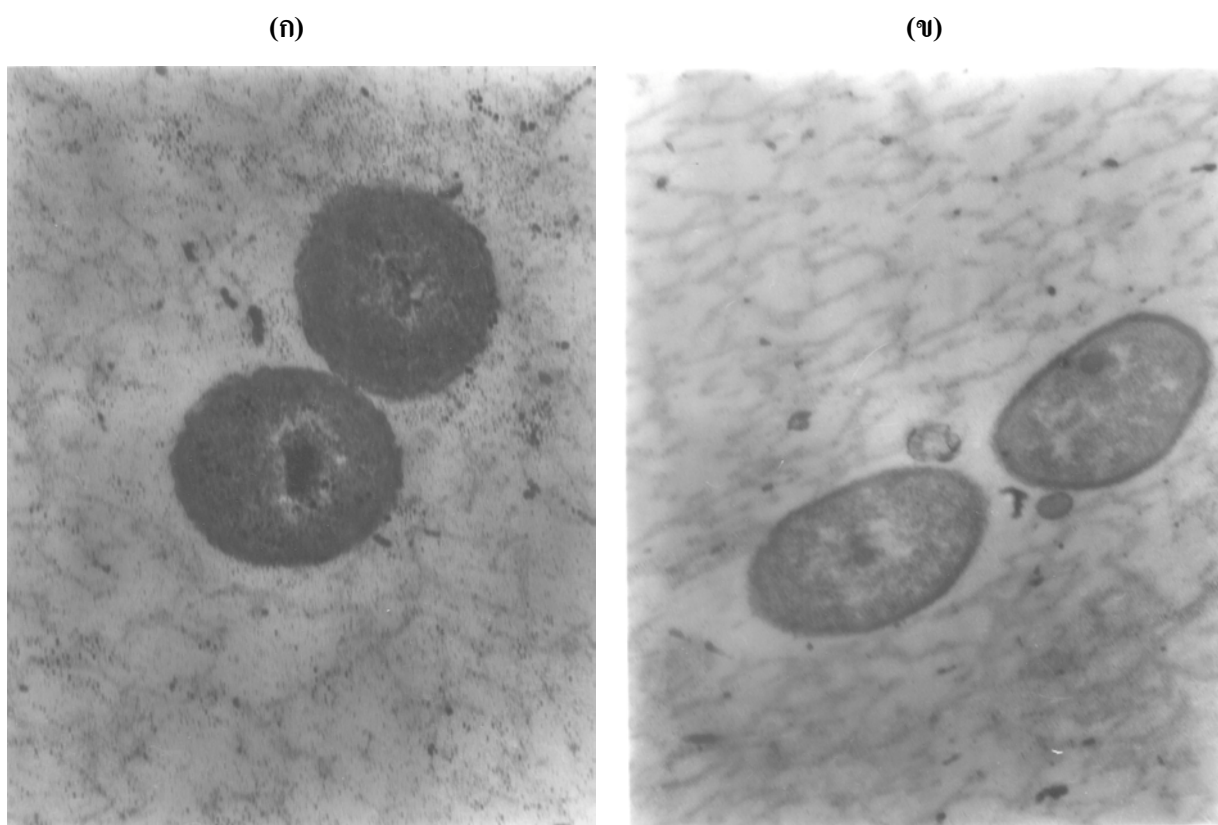
รูปที่ 5 PAS stain ของเชื้อ Ara⁺ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยที่สุด (strain E261) เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (ก) และ MVBM broth (ข) แสดงลักษณะการกระจายตัวที่คล้ายคลึงกันทั้งใน MVBM และ BHI broth โปรดสังเกตว่าเชื้อไม่มีการรวมกลุ่มเป็น microcolonies เลย แต่การติดสี PAS เข้มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงใน MVBM broth ทำให้เห็นเซลล์ชัดกว่าใน BHI broth (กำลังขยาย × 1,000)

การศึกษาไบโอฟิล์มของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ ทั้งสอง strains คือ G207 และ A2 มีลักษณะการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies โดยมี intercellular slime matrix (รูปที่ 6) มากกว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ ทั้งสอง strains คือ E287 และ E261 (รูปที่ 7) โดยเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI broth มักพบอยู่ด้วยกันเพียง 1-2 เซลล์และกระจายอยู่ห่างๆกัน และพบว่ามี intercellular slime matrix น้อย นอกจากนี้ glycocalyxes ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ ยังพบได้ชัดเจนกว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺



รูปที่ 6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (ก) strain G207 (ข) strain A2 พบ glycocalyxes อยู่ล้อมรอบเซลล์อย่างชัดเจน (ลูกศร) และพบลักษณะการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies โดยมี intercellular slime matrix (หัวลูกศร) หนาแน่นในกลุ่ม microcolony ของเชื้อ strain G207 มากกว่าเชื้อ strain A2 (กำลังขยาย $\times 40,000$)



รูปที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁺ เมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (ก) strain E287 (ข) strain E261 แสดงลักษณะเซลล์ที่มักพบอยู่ด้วยกันเพียง 1-2 เซลล์ และกระจายอยู่ห่างๆกัน มี intercellular slime matrix น้อยมากรวมทั้ง glycocalyxes ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ก็มีน้อยมากและไม่ชัดเจน (กำลังขยาย $\times 40,000$)

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ใน MVBM พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิด Ara⁻ strains G207 และ A2 (รูปที่ 8) มีการรวมกลุ่มกันเป็น microcolonies โดยมี intercellular slime matrix หนาแน่นมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BHI (รูปที่ 6) นอกจากนี้ intercellular slime matrix ของเชื้อ strain G207 (รูปที่ 8 ก) ยังเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนที่มีขนาดใหญ่กว่า intercellular slime matrix ของเชื้อ strain A2 (รูปที่ 8 ข)