



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างเครือข่ายงานวิจัยโรคmelioidosis (Meliodosis)
และชีววิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

โดย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. สติติย์ สิริสิงห และคณะ

31 ธันวาคม 2548



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างเครือข่ายงานวิจัยโรคmelioidosis (Melioidosis)

และชีววิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

โดย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. สกิตต์ สิริสิงห และคณะ

31 ธันวาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างเครือข่ายงานวิจัยโรคmelioidosis (Melioidosis) และ ชีววิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1. ศ.เกียรติคุณ ดร. สถิตย์ สิริสิงห์ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. รศ.ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. รศ.ดร. ศุภธิดา อุบล | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 5. รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 6. รศ.ดร. สุนีย์ กอรรพศรีเศรษฐ์ | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 7. รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 8. ดร. สาธิต พิษยางกูร | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS) |

สนับสนุนโดย

เครือข่ายวิจัยสุขภาพ สกว. โดยมูลนิธิสาธารณสุขแห่งชาติ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

EXECUTIVE SUMMARY

The aim of this research project is to encourage an integrated basic research on melioidosis and its causative agent, *Burkholderia pseudomallei*, at the Faculty of Science, Mahidol University. Three strategic approaches were selected including providing an infrastructure for a safe and efficient research to meet an international standard for a category B agent (one with potential for bioterrorism), recruiting young investigators and graduate students for research in melioidosis and gathering original research data sufficient for future research support from granting agencies. To achieve the first commitment, the Faculty of Science at Mahidol University has allocated funding for constructing a fully equipped biosafety laboratory P3 level with a total budget of almost 20 million bath. Additional accessory facilities including a fully equipped tissue culture room and a modern molecular biology and immunology laboratory were established in the Central Research Facilities section. The number of investigators grew from the initial 8 members to more than 20 by the end of the 3 year period. In addition, more than 15-20 graduate students at either Ph.D. or M.Sc. level were attracted to work in the projects on melioidosis and *B. pseudomallei* for their thesis requirement. The network itself has expanded from 4 institutes initially involved to over 10 by the end of the period. A large number of young staff at various institutes were able to obtain different types of research grants of their own to supplement some of the work being carried out in the network. Several doctoral candidates received Royal Golden Jubilee Ph.D. scholarships to carry on their research in the laboratories of investigators within the network.

The last objective of the research project is to carry on research work concerning largely with the pathogenesis of the disease melioidosis. It was arbitrarily subdivided into 5 subprojects. Some of these were a continuation of the ongoing work in the laboratory of some members within the network. Some are new areas that were initiated because we felt that it was crucial for the understanding on pathogenesis (e.g., subproject no. 4) and that preliminary data to be obtained should provide significant insight to which future research direction should be attended and new research proposals submitted and approved. It should be mentioned that the group was fortunate enough to receive a new research grant from NSTDA to work on melioidosis for the next 3 years beginning in September 2005. We were also proud at our achievement as the existing project has already generated 15 original research papers published in reputed journals and with 5 more are in progress. Members of the network were invited to give plenary and symposium presentation at different international and local scientific conferences. A total of at least 38 oral and poster presentation of original research work were given by staff and students in the network. In summary, we feel that we have achieved the original goal agreed upon by the TRF granting agency and the Faculty of Science, Mahidol University. Research data generated by our group from this 3 years program provide significant insights into our understanding on the pathogenesis of melioidosis.

ABSTRACT

The main objective of this research project is to establish an integrated research program on melioidosis and *Burkholderia pseudomallei* at the Faculty of Science, Mahidol University. To accomplish this goal, the faculty agreed to construct a fully equipped biosafety laboratory P3 level to meet an international standard for working on the Category B agents (i.e. those with potential for bioterrorism). Accessory facilities including for example tissue culture and molecular biology-immunology laboratories were also provided. During the 3 years of operation, the initial group of 8 investigators had expanded to almost 40 individuals with different levels of research experience in melioidosis and this included almost 20 graduate students. The main theme of the research within the program was largely geared at investigation on pathogenesis of melioidosis and virulence of *B. pseudomallei*. The 5 subprojects had generated data that were published in respectable international journals. All in all, 15 original papers have been published, with 5 more are in different stages of preparation and to be subsequently submitted in the near future. Research results were presented in both oral and poster forms in several scientific conferences in different countries. At the end, some members in the original network group got together and, based on the preliminary data generated from the current project, applied for a new research grant from NSTDA. The research idea was accepted and the application was granted for a 3-year period starting from September 2005 onward.

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง “การสร้างเครือข่ายงานวิจัยโรคmelioidosis และชีววิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*” นี้ มีวัตถุประสงค์หลักคือการสร้างเครือข่ายงานวิจัยแบบบูรณาการเพื่อให้มีการวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานของโรคmelioidosisและเชื้อ *B. pseudomallei* เกิดขึ้นในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยที่คณะวิทยาศาสตร์ จะสร้าง infrastructure เพื่อให้กลุ่มวิจัยสามารถทำงานวิจัยได้อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ ซึ่งทางคณะฯ ได้ใช้งบประมาณจากหลายส่วนรวมแล้วประมาณเกือบ 20 ล้านบาทในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ (biosafety level P3) ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องปฏิบัติการสำหรับงานวิจัยทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลและอิมมูโนวิทยาให้กับกลุ่มวิจัย ในช่วงเวลา 3 ปี กลุ่มวิจัยซึ่งเริ่มต้นจากนักวิจัย 8 คนจาก 4 สถาบัน ได้เพิ่มจำนวนรวมเกือบ 40 คน ที่ทำวิจัยกระจายอยู่ในสิบกว่าสถาบัน เมื่อสิ้นสุดโครงการ ในจำนวนนี้มีประมาณเกือบ 20 คนที่เป็นนักศึกษาระดับบัณฑิตและบางคนได้รับทุน คปก. และทุนอื่นๆ อยู่ด้วย กลุ่มวิจัยของเรามีหลายคนที่เป็นนักวิจัยรุ่นใหม่ที่ได้รับทุนส่งเสริมและพัฒนาจากหลายองค์กรให้ทำงานวิจัยที่เกี่ยวกับโรคmelioidosis และชีววิทยาของเชื้อ *B. pseudomallei* งานวิจัยหลักของกลุ่มเป็นในด้านที่เกี่ยวกับพยาธิวิทยาของการเกิดโรค และการวิจัยส่วนใหญ่เป็นการทำงานในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เจ้าบ้านและเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยแบ่งออกเป็นโครงการย่อย 5 โครงการ ที่มีนักวิจัยหลักและนักวิจัยร่วมรับผิดชอบในแต่ละโครงการ เมื่อจบโครงการแล้ว เราได้ผลงานวิจัยที่สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้รวม 15 เรื่อง และมีอยู่อีก 5 เรื่อง ที่อยู่ในขั้นตอนต่างๆ เพื่อจะนำลงตีพิมพ์ต่อไป ได้มีการนำผลงานวิจัยรวม 38 เรื่อง ไปเสนอในที่ประชุมวิชาการ ทั้งในต่างประเทศ (เช่น ประเทศแคนาดา จีน สิงคโปร์ และไต้หวัน) และในประเทศ ผลงานวิจัยบางส่วนสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการนำไปเสนอเพื่อของบประมาณสนับสนุนการทำงานวิจัยต่อเนื่อง และได้รับอนุมัติทุนจาก สวทช. ให้เริ่มโครงการใหม่ได้ตั้งแต่เดือนกันยายน 2548 เป็นต้นไป เป็นเวลารวม 3 ปี

โรคmelioidosis เป็นโรคติดเชื้อประจำถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุข ซึ่งรวมไปถึงการที่ผู้ป่วยยังมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง ยาปฏิชีวนะที่มีในปัจจุบันยังให้ผลในการรักษาได้ไม่สมบูรณ์และมีราคาแพง การวินิจฉัยในลักษณะของ rapid diagnosis ยังให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควร และผู้ที่เคยเป็นโรคมมาแล้ว มีอัตราการกลับมาเป็นโรคอีกครั้ง (relapse) ยังสูง ปัญหาต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วนี้ ไม่ใช่เป็นปัญหาของประเทศไทยแต่ประเทศเดียว แต่พบได้ในประเทศที่จัดอยู่ในถิ่นระบาดของโรคทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศออสเตรเลีย (1-3)

แม้ว่าโรคmelioidosis จะเป็นโรคที่มีความชุกไม่สูงเหมือนกับโรคติดเชื้ออื่นอีกหลายชนิดก็ตาม แต่ก็ยังเป็นโรคที่ต้องจับตาระมัดระวัง เช่น ในปี ค.ศ. 2004 ประเทศสิงคโปร์ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยสูงกว่าในหลายๆ ปีที่ผ่านมาเกือบสองเท่าตัว มีการพบผู้ป่วยในประเทศอีกหลายๆ ประเทศที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน เช่น ประเทศบราซิล และอีกหลายประเทศในแถบทะเลแคริบเบียน (4) นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่ามีรายงานการพบผู้ป่วยในผู้ที่ประสบภัยคลื่นยักษ์สึนามิ เมื่อปลายปี ค.ศ. 2004 ที่ผ่านมานี้ โดยเฉพาะมีรายงานพบผู้ป่วยถึง 6 รายจากประเทศไทย (5) และมีรายงานเพิ่มเติมอีกในประเทศที่ได้รับผลกระทบจากคลื่นยักษ์คือประเทศอินโดนีเซีย และศรีลังกา เป็นต้น ตามรายงานของ Program for Monitoring Emerging Diseases (6)

งานวิจัยเกี่ยวกับโรคmelioidosis และเชื้อก่อโรคคือเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* นั้นในอดีตที่ผ่านมาไม่ทำกันอยู่ในวงจำกัด โดยเฉพาะในประเทศที่อยู่ในถิ่นระบาดของเชื้อเท่านั้น กลุ่มวิจัยกลุ่มอื่นๆ นอกถิ่นระบาดที่ทำมีอยู่เพียง 3-4 กลุ่มเท่านั้น เช่น กลุ่มในประเทศแคนาดา สหราชอาณาจักร และเยอรมนี หลังจากประเทศสหรัฐอเมริกาถูกผู้ก่อการร้ายใช้อาวุธชีวภาพในการก่ออุบัติภัย และเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาขึ้นมาเป็นอาวุธชีวภาพได้เหมือนกัน (Category B ของ CDS) นักวิจัยในประเทศสหรัฐอเมริกาและอังกฤษจึงให้ความสำคัญกับเชื้อนี้เพิ่มขึ้น เช่น ในการร่วมมือกับกลุ่มอื่นๆ ในการหา genome ของเชื้อ (7) การพัฒนาวัคซีนในการป้องกันเชื้อใกล้เคียง (เช่น *B. mallei*) และจัดประชุมพิเศษเกี่ยวกับความก้าวหน้าของเรื่องนี้โดยเฉพาะเมื่อปี ค.ศ. 2004 ที่ NIH (NIAID/ORD) “International Conference on *Burkholderia* Pathogenesis: Approaches and Opportunities for Research on Glanders and Melioidosis” (8)

การวิจัยเกี่ยวกับโรคmelioidosis และ *B. pseudomallei* ในประเทศไทย มีทำโดยกระจายกันหลายสถาบัน แต่ที่รวมกลุ่มกันได้คือกลุ่มวิจัยของ Professor Dr. Nick White ของ Wellcome Research Unit ที่ตั้งอยู่ในคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และมีหน่วยวิจัยภาคสนามอยู่ที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ดังนั้น เพื่อที่จะกระตุ้นให้มีความวิจัยเพิ่มขึ้นในสถาบันอื่นๆ อีก และทำงานวิจัยที่มีความร่วมมือกันอย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพมากขึ้น คณะผู้วิจัยจึงได้เสนอให้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นศูนย์กลางการวิจัยที่มีห้องปฏิบัติการวิจัยที่สมบูรณ์และปลอดภัย โดยได้รับความกรุณาจาก สกว. ที่สนับสนุนให้ทุนวิจัยเบื้องต้น เพื่อสร้างเครือข่ายดังกล่าว และได้เริ่มปฏิบัติการตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2545 เป็นต้นมา

สรุป

ผลสำเร็จของโครงการ

เกณฑ์การประเมิน (ในสัญญาฯ รับทุน)	ผลสำเร็จ
1. พัฒนาห้องปฏิบัติการที่เปิดโอกาสให้นักวิจัยที่สนใจโรคเมลิออยโดสิส และเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> สามารถเข้ามาใช้ facilities ได้อย่างสะดวก และปลอดภัย โดยมีครุภัณฑ์หลักที่จำเป็นไว้อย่างครบถ้วน	ก. คณะวิทยาศาสตร์สร้างห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ (P3 level) ที่มีครุภัณฑ์ครบถ้วนสำหรับงานวิจัย ข. คณะวิทยาศาสตร์จัดสร้างห้องเลี้ยงเซลล์ส่วนกลาง (Cell culture laboratory) ที่มีครุภัณฑ์ครบถ้วน ค. เพื่อความสะดวกคณะวิทยาศาสตร์จัดหาห้องปฏิบัติการที่มีครุภัณฑ์โดยมี infrastructure พร้อมสำหรับงานวิจัยทางด้าน molecular biology และ immunology ไว้อย่างพอเพียง ห้อง P3 เพื่อให้กลุ่มวิจัยของเครือข่ายใช้เป็นศูนย์การวิจัยเกี่ยวกับ <i>B. pseudomallei</i> ง. กลุ่มวิจัยจัดหาครุภัณฑ์มาเสริม (สกว.) เพื่อให้งานวิจัยทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. ได้ผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานทั้งในด้านการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติและการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการในระดับนานาชาติ โดยหวังว่าจะได้ผลงานดังกล่าวอย่างน้อยปีละ 1 เรื่องโดยเฉลี่ย (เนื่องจากเวลาบางส่วนในปีแรกจำเป็นต้องใช้ในการพัฒนาห้องปฏิบัติการให้สมบูรณ์ จึงอาจทำให้ได้เนื้องานวิจัยน้อยกว่าที่ควรจะเป็น) อย่างไรก็ตาม ปริมาณงานดังกล่าวคงเป็นเพียงการคาดการณ์อย่างต่ำเท่านั้น ตามความเป็นจริงแล้วจากประสบการณ์ส่วนตัวของผู้เสนอ มีความแน่ใจว่าจะต้องทำได้มากกว่าที่เขียนไว้เบื้องต้น	ก. ได้ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติในระดับดีถึงดีมากแล้ว 15 เรื่อง และอยู่ในขั้นตอนอื่นอีก 5 เรื่อง ข. นำผลงานวิจัยไปเสนอในการประชุมระดับนานาชาติรวม 28 เรื่อง และการประชุมในประเทศรวม 10 เรื่อง
3. เริ่มต้นสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ นักศึกษาระดับปริญญาโทและนักศึกษาระดับปริญญาเอก และนักวิจัยหลังปริญญา เพื่อเป็นกำลังคนที่จะสร้างองค์ความรู้ใหม่ในเรื่องดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์และต่อเนื่องในอนาคต	สามารถกระตุ้นให้อาจารย์รุ่นใหม่ และนักศึกษบัณฑิต (ทั้งระดับปริญญาโทและเอก) กับนักศึกษาระดับปริญญาตรี (senior project) เข้ามาร่วมทำวิจัยในแง่มุมต่างๆ ของโครงการ รวมประมาณ 30 คน และเมื่อรวมกับคณะวิจัยเมื่อเริ่มโครงการแล้ว ทำให้กลุ่มมีขนาดประมาณ 40 คน

เกณฑ์การประเมิน (ในสัญญาเงินทุน)	ผลสำเร็จ
4. นำผลงานวิจัยที่จะได้ในช่วงเวลาดังกล่าว ไปพัฒนาต่อ เพื่อประยุกต์ใช้ได้ต่อไป และนักวิจัยในกลุ่มสามารถนำข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากโครงการวิจัยนำร่องนี้ไปเขียนเพื่อให้ได้โครงการวิจัยเพื่อขอทุนวิจัยจาก ส.ก.ว. หรือ แหล่งเงินทุนวิจัยอื่นต่อไป	ก. กลุ่มวิจัยของเราบางส่วนได้ร่วมกันขอทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สวทช. เพื่อทำงานต่อเนื่องเป็นเวลา 3 ปี และได้รับอนุมัติและดำเนินการแล้ว ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2548 ข. นักวิจัยรุ่นใหม่ สามารถขอทุนวิจัยจากแหล่งทุนหลายแห่งให้ทำงานวิจัยในเรื่องนี้ เช่น จาก สกว. ทบวงมหาวิทยาลัย ทุน คปภ. และทุนของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลเอง ค. สามารถกระตุ้นให้มีหน่วยงานที่สนับสนุนการวิจัยในเรื่องนี้โดยตรง คือการจัดตั้งศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิสขึ้นในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ง. ได้พัฒนาการเตรียม MAb และ latex agglutination kit สำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสให้ดีขึ้นและมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. สามารถโน้มน้าวให้นักวิจัยระดับนานาชาติให้โอกาสประเทศไทยเป็นเจ้าภาพในการจัดการประชุมวิชาการระดับนานาชาติครั้งต่อไป คือ 5th World Melioidosis Congress ที่จังหวัดขอนแก่น ในปลายปี พ.ศ. 2550

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาความพร้อมในการสร้างห้องปฏิบัติการเพื่อให้คณะวิทยาศาสตร์เป็นศูนย์กลางการศึกษาวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสและชีววิทยาของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
2. สร้างกลุ่มงานวิจัยเพื่อให้งานวิจัยพื้นฐานของโรคเมลิออยโดสิสขึ้นที่คณะวิทยาศาสตร์โดยเน้นงานวิจัยเกี่ยวกับ host cell-bacteria interaction (มีโครงการย่อย 5 โครงการ)
3. เพื่อหาพันธมิตรที่สังกัดอยู่ในสถาบันอื่น พร้อมทั้งสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ให้สามารถทำงานวิจัยในเรื่องนี้อย่างต่อเนื่องและมีคุณภาพสูงต่อไป

ผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงาน

พัฒนาความพร้อมในการสร้างห้องปฏิบัติการ

ก่อนที่จะเริ่มเขียนขอทุนวิจัยสำหรับโครงการวิจัยนี้ งานวิจัยเกี่ยวกับโรคmelioidosis และเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มีทำกันเพียงประปรายคือที่ห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล ในภาควิชาชีวเคมี และห้องปฏิบัติการในภาควิชาจุลชีววิทยาซึ่งในขณะนี้อยู่ในความดูแลของ รศ.ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์ ส่วนคณะผู้วิจัยอีก 2 ท่านคือ ศ.ดร. สติชัย สิริสิงห์ และ ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ มีงานวิจัยเกี่ยวกับโรคmelioidosis และเชื้อ *B. pseudomallei* ก่อนหน้าที่จะมารวมกลุ่มขอทุนวิจัยนี้จาก สกว. โดยใช้ห้องปฏิบัติการเก่าที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ดังนั้นเพื่อที่จะให้มีการสร้างกลุ่มวิจัยที่เข้มแข็งขึ้น คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์ จึงให้ความเห็นชอบให้มีการสร้างห้องปฏิบัติการซึ่งจะทำงานวิจัยหลักเกี่ยวกับเรื่องนี้โดยตรง โดยกรุณาให้ห้องปฏิบัติการ K603 ที่ชั้น 6 ของตึกเฉลิมพระเกียรติ ซึ่งเป็นห้องวิจัยที่เป็นส่วนของ Central Research Facilities (CRF) พร้อมกับให้จัดตั้งห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อกลาง (Tissue Culture Lab) ขึ้นที่ห้อง K616

เนื่องจากเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่ CDC ของสหรัฐอเมริกาจัดไว้เป็นเชื้อใน Category B คือเชื้อกลุ่มที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นอาวุธชีวภาพได้ และก่อนหน้าที่จะเริ่มต้นเขียนโครงการวิจัยเรื่องนี้ ได้มีการโจมตีประเทศสหรัฐอเมริกาโดยใช้อาวุธชีวภาพ คือเอาเชื้อ *Bacillus anthracis* ใส่ลงในซองจดหมายส่งกันทางไปรษณีย์ จึงมีผลให้ต้องมีการระวังในการวิจัยเกี่ยวกับเชื้ออันตรายประเภทเหล่านี้มากยิ่งขึ้น ดังนั้น ในการเสนอขอทุนวิจัยดังกล่าว สกว. ซึ่งเป็นเจ้าของทุน จึงขอให้คณะวิทยาศาสตร์จัดตั้งห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Biosafety level P 3) ขึ้นมาเพื่อให้คณะผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยได้อย่างปลอดภัยมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การสร้าง Biosafety lab นั้น อยู่ในแผนการจัดตั้งของคณะฯ อยู่แล้ว และคณะฯ ก็ได้กันสถานที่เตรียมไว้แล้วที่ชั้น 6 ของตึกเฉลิมพระเกียรติ โดยจัดให้เป็นส่วนหนึ่งของ CRF ของคณะฯ ดังนั้น ข้อตกลงข้อนี้จึงอยู่ในวิสัยที่คณะฯ จะทำได้ ผมจะสรุปขั้นตอนของการพัฒนาความพร้อมในการสร้างห้องปฏิบัติการเพื่อให้คณะวิทยาศาสตร์เป็นศูนย์กลางการศึกษาวินิจฉัยโรคmelioidosis ดังนี้คือ

1. การจัดหาสถานที่สำหรับงานวิจัยทาง molecular biology และ immunology ของเชื้อ

B. pseudomallei

1.1 เนื่องจากแผนการสร้างห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ (P3) ใหม่ของคณะฯ นั้น คณะฯ ได้เตรียมสถานที่ไว้ที่ชั้น 6 ของตึกเฉลิมพระเกียรติ ดังนั้น ห้องวิจัยทางด้าน molecular biology ของเชื้อ จึงได้ถูกจัดตั้งขึ้นที่ชั้น 6 ในบริเวณใกล้เคียงกันคือห้อง K603 และสามารถเริ่มปฏิบัติงานได้ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2545 (1 เดือนหลังจากที่ สกว. มีมติอนุมัติและสนับสนุนโครงการวิจัยคือวันที่ 1

กันยายน 2545) อย่างไรก็ตามในช่วงเวลาดังกล่าวห้องปฏิบัติการ P3 ยังอยู่ในขั้นตอนการออกแบบและจัดจ้าง ดังนั้น เพื่อให้จะทำให้การวิจัยสามารถดำเนินการไปได้ก่อนอย่างปลอดภัย คณะฯ จึงอนุมัติให้ใช้ห้องปฏิบัติการ K614 ซึ่งเป็นห้องที่มีประตู 2 ชั้น และ biosafety hood สำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้ทดลองไปก่อนจนกว่าห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อจะสร้างเสร็จ

1.2 เนื่องจากลักษณะของงานวิจัยของเครือข่ายส่วนใหญ่จะต้องใช้ tissue culture เพื่อศึกษาทางด้านกลไกในการก่อโรค ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องมี infrastructure สำหรับ tissue culture เพิ่มเติม และทางคณะฯ มีแผนการที่จะจัดตั้งให้มี tissue culture laboratory ขึ้นใน CRF อยู่แล้วสำหรับสนับสนุนงานวิจัยอื่นๆ ของอาจารย์ในคณะฯ ดังนั้น คณะฯ จึงขอให้กลุ่มวิจัยของเราช่วยจัดตั้งห้อง tissue culture ขึ้นมา และห้องที่เหมาะสมที่สุดคือห้อง K616 ซึ่งอยู่ติดกับห้อง *B. pseudomallei* ห้องปฏิบัติการนี้ในปัจจุบันมีการใช้งานเต็มเวลาโดยกลุ่มนักวิจัยจากหลายหน่วยงานในคณะฯ ในอนาคตทาง CRF มีแผนที่จะขยายห้องนี้ให้กว้างขึ้น สามารถใช้งานสะดวกขึ้น โดยจะเปลี่ยนห้องวิจัยที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* มาเป็นห้อง tissue culture เพิ่มเติม เมื่อห้องปฏิบัติการ P3 เสร็จสมบูรณ์และกลุ่มวิจัยสามารถย้ายไปปฏิบัติงานได้ 100%

2. **การจัดสร้างห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ (biosafety level P3)** การก่อสร้างห้อง P3 นี้อยู่ในแผนของคณะฯ ตั้งแต่เริ่มจัดตั้ง CRF โดยเตรียมไว้ในบริเวณห้อง K 404 และ 406 ดังนั้น กลุ่มวิจัยของเราจึงถูกขอร้องให้เตรียมการจัดตั้งห้อง P3 โดยมีข้อกำหนดว่าให้มีบริเวณสำหรับให้กลุ่มวิจัยที่ทำงานวิจัยกับเชื้อที่มีอันตรายอื่นๆ สามารถทำงานไปพร้อมๆ กันได้อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ ดังนั้น ในการเขียนแบบห้องปฏิบัติการดังกล่าวซึ่งจะมีเนื้อที่รวมทั้งหมดประมาณ 100 ตารางเมตรนั้น เราจึงจัดให้มี common area และ specific area 3 ห้องเล็กที่จะให้นักวิจัยที่ทำงานเกี่ยวกับเชื้อต่างๆ กัน

3 กลุ่มสามารถทำงานได้พร้อมๆ กันอย่างปลอดภัยและสะดวก

กลุ่มวิจัยของเราได้ติดต่อให้บริษัทคลีนแอร์โปรดักซ์ จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทเดียวในประเทศไทยในขณะนั้นที่มีประสบการณ์ในการสร้างห้องปฏิบัติในลักษณะนี้มาก่อน เป็นทั้งผู้ออกแบบและรับเหมาก่อสร้าง ในการออกแบบวางแผนเพื่อเตรียมการก่อสร้างนั้น มีอุปสรรคพอสมควร เพราะที่ว่างเหนือฝ้าเพดานมีที่ๆ จำกัด เนื่องจากในการก่อสร้างตึกเฉลิมพระเกียรติ สถาปนิกของตึกไม่มีประสบการณ์เกี่ยวกับการสร้างห้องในลักษณะนี้มาก่อน จึงไม่ได้เตรียมเนื้อที่เหนือฝ้าเพดานไว้เพียงพอสำหรับการก่อสร้างทางเดินของอากาศเข้าออก โดยเฉพาะในการก่อสร้างห้อง P3 นี้ นักวิจัยของคณะฯ ต้องให้มีการถ่ายเทอากาศเข้าและออก 100% แทนที่จะเป็น 90 กว่าเปอร์เซ็นต์ตามที่ใช้กันส่วนมาก เพราะเชื้อชนิดที่กลุ่มวิจัยประสงค์จะใช้ทำการวิจัยในอนาคตในห้องนี้ เป็นเชื้ออันตรายที่ติดต่อกันได้ง่ายทางระบบหายใจ เช่น เชื้อวัณโรคตัวอย่างหลายๆ ชนิดที่พบในประเทศไทยในขณะนี้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเอดส์ คุณสมบัติพิเศษที่กล่าวมานี้ ทางบริษัทฯ เองยังไม่เคยทำมาก่อน แต่หลังจากให้เวลาเพียงพอ เขาก็สามารถเขียนโปรแกรมออกมาและแจ้งให้ทราบว่ามีความเป็นไปได้

งบประมาณในการสร้างห้อง P3 ซึ่งมีห้องย่อย 3 ห้องตามที่บรรยายไว้ คณะวิทยาศาสตร์ใช้ งบประมาณทั้งสิ้นประมาณ 7 ล้านบาท โดยใช้งบประมาณจากเงินรายได้ของคณะฯ ทั้งสิ้น และใช้เวลาก่อสร้างประมาณ 2 ปีตั้งแต่เริ่มวางแผนจนกระทั่งวันรับมอบงาน หลังจากนั้นก็ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของห้องและระบบการทำงานทั้งหมดโดยหน่วยตรวจสอบจากภายนอก และผลสุดท้ายจึงผ่านกระบวนการตรวจสอบอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากห้องที่สร้างขึ้นมาเพื่อใช้สำหรับงานวิจัยกับเชื้อซึ่งค่อนข้างจะอันตราย เช่น เชื้อ *B. pseudomallei* ของกลุ่มเราเอง เชื้อวัณโรค ตื้อยาหลายๆ ชนิด และ ไวรัสไข้หวัดนก เราจึงต้องมีความแน่ใจว่าระบบมีความสมบูรณ์จริงๆ ก่อนนำเชื้อเข้าไปใช้จริง หลังจากทดสอบระบบอยู่หลายเดือน ปรากฏว่ามีไอน้ำเกาะอยู่ในบริเวณ hood และรอบๆ หน้าต่างกระจก 2 ชั้น ซึ่งหากทิ้งไว้นานๆ จะสะสมและมีปริมาณมากขึ้น และหากไม่มีการปรับปรุง อาจทำให้มีการเจริญของเชื้อราและจะเป็นปัญหาหากใช้ทำงานกับเชื้อจริง ดังนั้น เราจึงต้องแก้ไขปัญหานี้ ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเป็นสิ่งที่ไม่ได้คาดการณ์เอาไว้เพราะอากาศในกรุงเทพมหานครมีความร้อนและความชื้นสูง ดังนั้น การที่เราต้องดึงเอาอากาศจากภายนอกเข้ามา 100% จึงทำให้เกิด condensation เกิดขึ้น เมื่อเป็นดังนั้น เราจึงต้องของบประมาณเพิ่มเติมเพื่อแก้ไขข้อบกพร่องดังกล่าว และต้องใช้งบประมาณจากรายได้ของคณะฯ อีกประมาณ 7 แสนบาทกว่า และบัดนี้ได้จัดการแก้ไขเรียบร้อยแล้ว

3. การจัดหาครุภัณฑ์หลัก เพื่อให้กลุ่มวิจัยของเราสามารถทำการวิจัยได้ทันที หลังจากที่ได้โครงการวิจัยได้รับอนุมัติจาก สกว. คณะฯ จึงอนุมัติให้ใช้งบประมาณรัฐบาลประจำปี 2545 บางส่วนที่เป็นของ CRF และงบประมาณจากเงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์เองเพื่อจัดซื้อครุภัณฑ์ในขั้นแรกสำหรับห้องปฏิบัติการ 3 ห้องคือ K603 (molecular biology and immunology ของเชื้อ *B. pseudomallei*) ห้อง K614 (ห้องเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* จนกว่าห้อง P3 ใช้ได้) และห้อง K16 (ห้อง tissue culture) หลังจากนั้นจึงใช้งบประมาณรัฐบาลปี 2546 บางส่วนของ CRF โดยที่ครุภัณฑ์ดังกล่าวนี้เกือบทั้งหมด คณะฯ ขอให้กลุ่มวิจัยเราเป็นผู้ดูแลและนักวิจัยกลุ่มอื่นสามารถจะมาใช้ได้เช่นกัน รวมงบประมาณ ที่ใช้จัดหาครุภัณฑ์เหล่านี้รวมแล้วเกือบ 10 ล้านบาท นอกจากการอนุมัติให้จัดซื้อครุภัณฑ์ดังกล่าวแล้ว ยังต้องมีการจัดหาครุภัณฑ์เพื่อนำเข้าไปใช้ในห้อง P3 อีกประมาณ 10 ล้านบาท ซึ่งกว่าครึ่งหนึ่งของงบประมาณนี้ใช้เป็นค่าจัดซื้อและติดตั้ง autoclave ชนิดเปิดประตูได้ทั้งสองข้าง ครุภัณฑ์ทั้งหมดที่ทางกลุ่มของเราช่วยจัดหาให้นี้เป็นส่วนของ CRF และนักวิจัยอื่นที่มีความประสงค์จะใช้สามารถเข้ามาใช้ได้ โดยที่กลุ่มวิจัยของเราถูกขอให้เป็นผู้ดูแลให้เท่านั้น

ด้วยเหตุที่คณะฯ สามารถกันงบประมาณไว้ให้จัดซื้อครุภัณฑ์เหล่านี้ได้อย่างรวดเร็วและค่อนข้างจะสมบูรณ์ ทางคณะวิจัยของเราจึงไม่ได้ใช้งบประมาณครุภัณฑ์ของโครงการตามที่ตั้งเอาไว้ล่วงหน้าในขณะที่เขียนโครงการฯ ดังนั้น เมื่อเสร็จสิ้นโครงการในวันที่ 31 สิงหาคม 2548 จึงมีงบใน

ส่วนนี้เหลือจ่าย และทำให้เราสามารถขอต่อเวลาและได้รับอนุมัติให้ทำงานวิจัยต่อไปอีก 4 เดือน เพื่อให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์ได้ตามแผน จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2548

รายละเอียดของรายการครุภัณฑ์ที่จัดหาซื้อจากงบประมาณของคณะฯ (งบรัฐบาลและรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์) มีระบุไว้ในรายงานความก้าวหน้าในแต่ละครั้งแล้ว และได้สรุปรวบรวมรายการทั้งหมดไว้ในภาคผนวกของรายงานครั้งนี้

สำหรับครุภัณฑ์อื่นที่ทางคณะฯ ไม่สามารถจัดซื้อมาให้ได้ คณะผู้วิจัยจึงใช้งบประมาณครุภัณฑ์ของโครงการจัดหาตามรายละเอียดสรุปไว้ในภาคผนวก โดยใช้งบประมาณของโครงการทั้งสิ้น 1,125,194.64 บาท

การตีพิมพ์ผลงานวิจัยและเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ

ในช่วงระยะเวลาที่ได้รับทุนวิจัย กลุ่มวิจัยของเราสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีคุณภาพแล้วหลายเรื่อง และนำเสนอผลงานในการประชุมในระดับนานาชาติ และในประเทศ ทั้งในรูปแบบของการเป็น invited guest speakers, การนำเสนอแบบ oral presentation และ poster presentation หลายครั้ง ในช่วง 6 เดือนสุดท้ายของโครงการวิจัยนี้ กลุ่มวิจัยของเรามีงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการแล้วเพิ่มขึ้นอีก 5 เรื่อง กำลังรอตีพิมพ์ 2-3 เรื่อง และกำลังเตรียม manuscript อีก 2-3 เรื่อง (ตารางที่ 1) ดังนั้นหากรวมผลงานทั้งหมดที่คาดว่าจะได้คือ 16-20 เรื่อง และงานวิจัยทั้งหมดนั้น เราลงในวารสารที่มี journal impact factor อยู่ในอันดับที่นั้น (โปรดดูรายละเอียดในตารางที่ 1 และในภาคผนวก) สำหรับผลงานวิจัยและบทความวิชาการที่ได้นำไปเสนอในที่ประชุมวิชาการทั้งในต่างประเทศและในประเทศเองนั้น ใน 3 ปีที่ผ่านมากลุ่มวิจัยได้นำเสนอหลายครั้ง สำหรับในช่วง 6 เดือนสุดท้ายของโครงการวิจัยนี้ เราได้นำเสนอทั้งในรูปแบบของ oral และ poster presentation ประมาณ 10 เรื่อง ดังนั้น เมื่อรวมการนำเสนอผลงานทั้งหมดตั้งแต่เริ่มโครงการจึงมีประมาณ 40 เรื่อง การนำเสนอผลงานวิจัยดังกล่าว ส่วนใหญ่จะเป็นการนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ คือประเทศแคนาดา สหรัฐอเมริกา สิงคโปร์ ศรีลังกา สาธารณรัฐประชาชนจีน และไต้หวัน รายละเอียดของการเสนอผลงานมีอยู่ในภาคผนวกท้ายรายงานการวิจัยนี้

ตารางที่ 1 สรุปผลงานที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการแล้ว (เรียงตามตัวอักษร)

จำนวนเรื่อง	วารสาร	Journal impact factor (2004)
1	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	2.013
4	Clinical Experimental Immunology	2.318
1	Clinical Microbiology and Infection	2.361
1	FEMS Microbiology Letter	1.840
3	Infection and Immunity	4.033
1	Journal of Bacteriology	4.146
3	Microbial Pathogenesis	2.047

การสร้างพันธมิตรและขยายกลุ่มวิจัยไปยังนักวิจัยรุ่นใหม่

วัตถุประสงค์สุดท้ายซึ่งมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าวัตถุประสงค์ 2 ข้อแรกที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คือการกระตุ้นนักวิจัยรุ่นใหม่ ๆ ให้หันมาสนใจเกี่ยวกับความสำคัญของโรคmelioidosis และต้องการที่จะทำงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ และการเตรียมนักศึกษาระดับปริญญาโทและเอกให้เห็นถึงความสำคัญของการวิจัยเกี่ยวกับอิมมูโนวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อ *B. pseudomallei* และกลไกในการเกิดโรคmelioidosis นั้น มีความก้าวหน้าพอสมควรดังต่อไปนี้คือ

นอกจากหัวหน้าโครงการวิจัยแล้ว คณะนักวิจัยที่ร่วมในโครงการนี้ตั้งแต่เริ่มแรก เป็นนักวิจัยที่มีงานวิจัยหลักที่เกี่ยวกับโรคmelioidosis เพียง 3 คน คือ รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล, ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ และ รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ที่เหลืออีก 4 ท่านมีงานวิจัยหลักด้านอื่นๆ แต่ได้เข้าร่วมในโครงการ เพราะแต่ละท่านมีความสามารถเป็นพิเศษที่ในกลุ่มของพวกเราไม่มี เช่น เทคโนโลยีทาง macroarray และ microarray และ immunomodulation เมื่อทางคณะผู้วิจัยหลักมีความประสงค์จะนำเทคโนโลยีเหล่านี้มาใช้ เพื่อที่จะให้ได้ผลงานวิจัยเบื้องต้นสำหรับเป็นฐานที่จะนำไปใช้ได้กับโครงการวิจัยที่จะมีเพิ่มเติมในอนาคต เราจึงขอร้องให้อาจารย์เหล่านี้เข้าร่วมกลุ่มวิจัย เมื่อเราได้สร้างทีมวิจัยและได้รับการสนับสนุนจาก สกว. แล้ว และหลังจากที่ได้เริ่มต้นงานวิจัยได้พักใหญ่ๆ เราก็ได้อาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ นักวิทยาศาสตร์หลังปริญญา (post doctoral) และนักศึกษบัณฑิตเข้ามาแสดงความสนใจและต้องการทำวิจัยร่วมกันกับเราเป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 2) ซึ่งรายละเอียดของชื่อนักวิจัยและสถาบันของแต่ละคนที่เข้าร่วมกลุ่มและสถานะภาพของแต่ละคนมีแสดงไว้ในภาคผนวก

ตารางที่ 2 จำนวนนักวิจัยและสถาบันในประเทศที่ร่วมงานวิจัยของเครือข่าย

จำนวนนักวิจัย	สถาบันของนักวิจัยเข้าร่วมในโครงการ
14	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
1	คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
1	Wellcome Research unit คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
2	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
1	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
1	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
1	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
1	สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร
1	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS)

นอกจากนี้ ยังมีนักศึกษาที่ได้จบการศึกษาไปแล้ว และที่กำลังศึกษาและทำงานวิจัย หรือ กำลังจะเข้าร่วมงานวิจัยโดยมีอาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์ในกลุ่มของนักวิจัยของโครงการนี้อีก ประมาณ 10-15 คน มีนักวิจัยในสถาบันต่างประเทศที่ร่วมงานในลักษณะต่างๆ อีกหลายคน เช่น Dr. B. Currie (Menzies School of Health Research, Australia), Dr. N.J. White (University of Oxford, United Kingdom), Dr. A.M. Krieg (Coley Pharmaceutical Group, USA), Dr. Paul Keim (Northern Arizona University, USA), Dr. D. Woods (University of Calgary, Canada) และ Dr. R.E. Kinoshita (Ocean Park, Hong Kong)

จากรายละเอียดในภาคผนวก จะเห็นได้ว่ามีอาจารย์ที่มีอาวุโสระดับกลางๆ เช่น รศ.ดร. รศนา วงศ์รัตนชีวิน และ รศ.นพ.มงคล คุณากร ที่เข้าร่วม เป็นผู้ที่มีผลงานวิจัยทางด้านนี้มาแล้วก่อนหน้านี้ และเคยมีทุนวิจัยของตนเองมาก่อนแล้ว ส่วนอาจารย์ระดับต้นๆ เช่น ดร.นพ. ภัทรชัย กิรติสิน และ ดร.พญ. ดวงจิต กนิษฐานนท์ ที่เข้าร่วมกลุ่มในภายหลัง ก็ได้ขอทุนวิจัยจากแหล่งทุนอื่น เพื่อทำวิจัยที่เกี่ยวกับโรคเมลิออยโดสิส และได้รับอนุมัติทุนเรียบร้อยแล้ว นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยรุ่นใหม่ที่ได้ทุนวิจัย post doctoral จาก สกว. ให้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับโรคนี้ก็มีหลายคน เช่น รศ.ดร.พญ. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ ดร.พญ. สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ ดร.ธิษฏา เล่งเวลาสถิตย์ และ นสพ. นริศร นางาม ที่เข้าร่วมงานใน ลักษณะใดลักษณะหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีนักศึกษาคณะทันตแพทย์ที่ม้งงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ที่มีอาจารย์ในกลุ่มของเราเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลายคน ทั้งในระดับปริญญาเอก ปริญญาโท มีบางคนก็ได้จบการศึกษา ไปแล้ว และในปัจจุบันยังมีนักศึกษาในระดับต่างๆ (ปริญญาเอก ปริญญาโท และปริญญาตรี) ที่กำลัง ศึกษาอยู่ในสถาบันต่างๆ ประมาณ 10 คน

จะเห็นได้ว่าภายในระยะเวลา 3 ปีที่เครือข่ายงานวิจัยของเราได้จัดตั้งขึ้นมา กลุ่มวิจัยของเราได้ขยายเครือข่ายกระจายออกไปจากที่มีเพียง 2-3 สถาบันภายในประเทศ ไปเป็นจำนวนมากทั้งภายในประเทศเองและสถาบันในต่างประเทศ จำนวนนักวิจัยที่มีก็ได้เพิ่มจำนวนจากที่มีอยู่กันเพียง 8 คน ไปจนเกือบ 40 คน และแต่ละคนมีการพัฒนาความรู้ความสามารถที่ระดับต่างๆ กัน นักวิจัยรุ่นใหม่ในกลุ่มนี้สามารถขอทุนวิจัยจากหน่วยงานหลายหน่วยงาน เพื่อนำมาเป็นค่าใช้จ่ายเสริมในการวิจัยเกี่ยวกับโรคmelioidosis เช่น

1. ดร. นพ. ภัทรชัย กิรติสิน (คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล) ได้รับทุนวิจัยจาก สกว. เรื่อง “การพิสูจน์หายีน *bpsR* และการสืบบทบาทของยีนนี้ในระบบ quorum sensing ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*” และทุนวิจัยเพื่อพัฒนาการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เรื่อง “Identification and characterization of the quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei*”
2. รศ.ทพญ. ดร. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ (คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ได้รับทุนพัฒนานักวิจัย สกว. เรื่อง “The relationship between biofilm formation and virulence in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*”
3. พญ.ดร. สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ (สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร) ได้รับทุนพัฒนานักวิจัย สกว. เรื่อง “การแสดงออกของ interleukin-17 ของ T cell ต่อการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*”
4. ดร. อธิภา เล่งเวลาสฤติย์ (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ได้รับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (ทบวงฯ-สกว.) เรื่อง “หน้าที่ของไมโทคอนเดรียจากเซลล์ที่ติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*”
5. นสพ. นริศร นางาม (คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ได้รับทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. เรื่อง “การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคmelioidosis โดยใช้เทคนิค T7 phage display”
6. ดร.พญ. ดวงจิต กนิษฐานนท์ (คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล) ได้รับทุนพัฒนาการวิจัย ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เรื่อง “Differential gene expression of lung epithelial cells exposed to *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*”

นอกจากตัวอย่างโครงการวิจัยเพิ่มเติมใหม่ๆ ที่ได้รับไปแล้ว คณะวิจัยของเครือข่ายยังสามารถขอทุนวิจัยในโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สกว. เพื่อให้เป็นทุนการศึกษาของนักศึกษาระดับปริญญาเอกที่ม้งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับmelioidosisอีกหลายโครงการ (คาดว่าจะอย่างต่ำๆ จะประมาณ

5-6 โครงการ เป็นต้นว่าโครงการของ รศ.ดร.สุมาลี ตั้งประดับกุล, รศ.ดร.สุนีย์ กอปรศรีเศรษฐ์, รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน และ ศ.ดร. สถิตย์ สิริสิงห

ผลงานที่ได้จากการวิจัยของเครือข่ายในช่วง 3 ปีที่ได้ดำเนินการมา ทำให้เราได้สร้างเครือข่ายงานวิจัยต่อเนื่องได้ในหลายรูปแบบ เป็นต้นว่า

1. การก่อตั้งและสร้างศูนย์วิจัยโรคmelioidosisในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ขอนแก่น หลังจากที่คณะวิจัยของเราได้ทำงานมาได้ปีกว่าๆ รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน และผู้ร่วมงานที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น หลายท่านได้ปรึกษากันว่า เพื่อที่จะให้งานวิจัยสามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง น่าจะมีการตั้งองค์กรที่บริหารงานวิจัยและทำงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ให้เข้มแข็งยิ่งขึ้นไป โดยมีแกนนำที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเป็นเขตอยู่ในเขตระบาดของโรค และก็เป็นที่น่ายินดีที่ผู้บริหารมหาวิทยาลัยขอนแก่นได้มองเห็นความสำคัญของโรคmelioidosis และเพื่อที่จะให้มีกลุ่มวิจัยทั้งทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุล และทางด้านคลินิกและการดูแลผู้ป่วยสามารถเข้ามารวมกลุ่มทำงานวิจัยร่วมกัน มหาวิทยาลัยขอนแก่นจึงได้อนุมัติให้มีการจัดตั้งศูนย์วิจัยโรคmelioidosis (Meliodosis Research Center) โดยให้เป็นศูนย์วิจัยเฉพาะทาง ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีงบการดำเนินการปีละประมาณ 5 ล้านบาท และมี รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน เป็นผู้อำนวยการศูนย์ และมี ศ.ดร. สถิตย์ สิริสิงห เป็นที่ปรึกษาและกรรมการบริหารฯ และนักวิจัยของศูนย์ประกอบด้วยนักวิจัยจากหลายสาขาวิชา ทั้งจากวิทยาศาสตร์พื้นฐานและจากภาควิชาทางคลินิก

2. สืบเนื่องจากการตั้งศูนย์วิจัยดังกล่าว คณะผู้วิจัยของศูนย์ฯ และนักวิจัยของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รวมตัวกันขอทุนสนับสนุนการวิจัยร่วมกัน เพื่อสานงานวิจัยต่อจากที่ทำอยู่ในปัจจุบัน โครงการวิจัยดังกล่าว (กลไกการเกิดโรคในระดับโมเลกุลและหาแนวทางป้องกันต่อการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*) ได้ถูกนำเสนอต่อสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ) โครงการนี้มี รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน เป็นหัวหน้าโครงการ และมีผู้ร่วมโครงการหลายท่านซึ่งประกอบด้วย ศ. ดร. สถิตย์ สิริสิงห รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล และ ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ รศ.ดร. รศนา วงศ์รัตนชีวิน กับ ผศ.ดร. โสรัจศิริ เจริญสุดใจ จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นนักวิจัยร่วมด้วย โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติให้เริ่มดำเนินการได้ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2548 เป็นเวลา 3 ปี โดยมีงบประมาณทั้งสิ้น 3,954,478 บาท นอกจากโครงการวิจัยโครงการนี้ รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ยังเป็นแกนในการเขียนโครงการอีก 1 โครงการร่วมกับนักวิจัยทางคลินิกจาก 4 โรงพยาบาลของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและของมหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดรวมกันในการดูแลรักษาผู้ป่วย ซึ่งโครงการวิจัยที่กำลังวางแผนอยู่จะเป็นโครง

การวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากหน่วยวิจัยเมลิออยโดสิสของกลุ่มวิจัย **Welcome Medical Research Unit** (นำโดย Dr. N. Day and Dr. S. Peacock) และกำลังเจรจาขอให้ สกว. สนับสนุนในส่วนที่ยังขาดอยู่

นอกจากการร่วมมือในโครงการวิจัยใหม่ๆ ที่เพิ่มขึ้นจากทุนวิจัยภายในประเทศแล้ว นักวิจัยในศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส ยังมีงานวิจัยร่วมกันกับนักวิจัยในต่างประเทศ คือ Dr. Paul Keim และ Dr. James Schupp ของ Northern Arizona University ในสหรัฐอเมริกา โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับ Molecular genetics and epidemiology ของเชื้อ และจากผลการศึกษาเบื้องต้นที่ได้จากโครงการวิจัยของเครือข่ายในปัจจุบัน คณะผู้วิจัยจึงมีแผนการที่จะขอทุนวิจัยจากแหล่งทุนในประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้ในการวิจัยเรื่องดังกล่าวต่อไปอีกด้วย

3. ศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิสได้ร่วมกับหน่วยงานอื่นๆ ในประเทศไทย (เช่น เครือข่ายงานวิจัยโรคเมลิออยโดสิสฯ ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์) ได้ร่วมกันเสนอให้ประเทศไทยเป็นเจ้าภาพในการจัดประชุม **5th World Melioidosis Congress** ซึ่งคณะกรรมการระดับนานาชาติที่ประชุมร่วมกัน ณ ประเทศสิงคโปร์ ระหว่างวันที่ 16-18 กันยายน 2547 ได้รับข้อเสนอของประเทศไทย และสนับสนุนให้ประเทศไทยเป็นเจ้าภาพจัดการประชุมดังกล่าวในช่วงเวลาประมาณเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน ของปี พ.ศ. 2550 การที่กลุ่มวิจัยโรคเมลิออยโดสิสได้รับเกียรติจากนักวิจัยระดับนานาชาติในการยอมให้ประเทศไทย เป็นเจ้าภาพในการจัดการประชุมวิชาการครั้งนี้ นอกจากจะทำให้งานวิจัยโรคเมลิออยโดสิสในประเทศไทยเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางมากขึ้นแล้ว การประชุมยังเปิดโอกาสให้นักวิจัยไทย มีโอกาสแลกเปลี่ยนความรู้และความคิดเห็นกันกับนักวิจัยจากทั่วโลก ซึ่งจะเสริมให้งานวิจัยของเราเองมีคุณภาพมากขึ้น และอาจนำไปถึงความร่วมมือในภายหน้า ที่จะเขียนขอทุนวิจัยร่วมกันและทำงานร่วมกันใกล้ชิดมากขึ้นอีกด้วย

วัตถุประสงค์หลักของโครงการย่อยเรื่องนี้ คือการหาความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการตอบสนองของ host cell ที่มีต่อเชื้อ *B. pseudomallei*/*B. thailandensis* ว่าเป็นอย่างไร เพื่อให้เราเข้าใจเกี่ยวกับกลไกของการเกิดโรคได้ดีขึ้น ซึ่งรวมไปถึงอาจทำให้มีคำอธิบายเกี่ยวกับ latency state ของเชื้อและการเกิด relapse ในผู้ป่วย สาเหตุที่กลุ่มวิจัยต้องการคำตอบนี้ เพราะเราสันนิษฐานว่า diverse clinical manifestations ที่พบในผู้ป่วยนั้น น่าจะเกี่ยวข้องกับลักษณะและระดับของการตอบสนองของเซลล์เหล่านี้ในระยะเริ่มแรกที่ได้รับเชื้อ เช่น ในผู้ป่วยบางคน เซลล์เหล่านี้อาจสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้ได้ และมีการตอบสนองที่ไม่รุนแรงเกินไป ทำให้มีอาการไม่รุนแรง ไม่ถึงกับมีอาการของ septicemia และ shock ข้อมูลในปัจจุบันที่ได้จากการใช้สัตว์ทดลองยังขัดแย้งกันอยู่และยังไม่สามารถสรุปได้ ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ (in vitro) ที่ใช้ mouse macrophage cell line ก็ยังไม่สมบูรณ์และสามารถตอบคำถามเหล่านี้ได้ระดับหนึ่งเท่านั้น ดังนั้น เพื่อให้ตรงเป้าที่สุด เราจึงหันมาใช้ primary human DC และ MØ cell cultures แทน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะดูการตอบสนองของเซลล์เมื่อได้รับเชื้อทั้ง 2 ชนิด และดูว่า DC กับ MØ จะสามารถกำจัดเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้หรือไม่ ต่างกันอย่างไรบ้าง และหากไม่สามารถทำลายเชื้อได้ การกระตุ้นเซลล์ด้วย interferon gamma จะมีผลอย่างไรบ้างในการเพิ่มขีดความสามารถในการกำจัดเชื้อ นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวยังอาจทำให้เราเข้าใจเกี่ยวกับ adaptive immunity ที่เกี่ยวกับโรคนี้ดีขึ้น และอาจนำไปสู่การที่เราจะสามารถ immunomodulate การตอบสนองของร่างกาย และอาจนำไปสู่การดูแลรักษาผู้ป่วยให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น พร้อมทั้งยังเป็นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนอีกด้วย

เนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ทาง CDC ของสหรัฐอเมริกาจัดเป็นเชื้อที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นอาวุธชีวภาพได้ โดยจัดอยู่ในกลุ่ม Category B (เชื้อ *Bacillus anthracis* ซึ่งผู้ก่อการร้ายเคยใช้กับ

สหรัฐอเมริกาเมื่อ 3-4 ปีที่ผ่านมา เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงกว่าและอยู่ในกลุ่ม Category A) ดังนั้นหลายประเทศจึงมีนโยบายที่จะพัฒนาวัคซีนสำหรับใช้กับเชื้ออันตรายเหล่านี้ และ *B. pseudomallei* vaccine ก็ยังถูกจัดให้มีความสำคัญระดับต้นๆ เหมือนกัน ดังนั้น ความรู้เกี่ยวกับการตอบสนองของ dendritic cells จึงมีความสำคัญเพราะเป็นเซลล์ที่ควบคุมชนิดและระดับของการตอบสนองของร่างกาย งานวิจัยในโครงการย่อยนี้ก้าวหน้าไปได้ช้ากว่าที่เราคาดการณ์ไว้ตั้งแต่ต้น เพราะเรามีปัญหาทางด้านเทคนิคของการเตรียมและเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้คือ

1. การเตรียม peripheral blood mononuclear cells ให้ได้ในปริมาณมากพอที่จะให้ได้เป็นแหล่งของ monocytes สำหรับใช้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด ที่จะพัฒนาและเลี้ยงต่อไปให้เป็น DC และ MØ ที่สมบูรณ์

2. ปัญหาในข้อ 1 ที่กล่าวมาข้างต้นสืบเนื่องมาจากคุณภาพของเซลล์ที่เตรียมได้ ซึ่งมีความแตกต่างกันพอสมควรจากคนหนึ่งไปอีกคนหนึ่ง และทำให้ไม่สามารถที่จะหา optimal conditions ได้ง่าย ๆ

3. เมื่อได้ monocytes มาแล้ว และเลี้ยงได้ 3-4 วัน เพื่อให้เปลี่ยนไปเป็น immature DC พบว่า DC ของคนบางคนจะติดกับ microtiter plate ไม่ค่อยจะดีและหลุดออกง่ายมาก ทำให้ผลของการทดลองไม่ค่อยจะเที่ยงตรง และไม่สมบูรณ์เท่าที่คาดหวังเอาไว้

4. ทั้ง DC และ MØ ของคน ดูเหมือนจะมีความคงทนไม่เท่ากับ mouse macrophage cell line (J744) ที่เราเคยมีประสบการณ์มา ดังนั้น เมื่อเราเอาเซลล์เหล่านี้มา exposed กับเชื้อตามที่เคยใช้กับเซลล์ของหนู เซลล์ของคนจะตายง่ายและเร็ว และส่วนใหญ่จะตายไปก่อนที่การทดลองจะเสร็จสิ้นลง ดังนั้น เราจึงต้องปรับ condition ใหม่บ่อยครั้ง (เช่น multiplicity of infection --- MOI) ซึ่งทำให้ต้องใช้เวลาพอสมควรกว่าจะได้ผลที่พอยอมรับได้

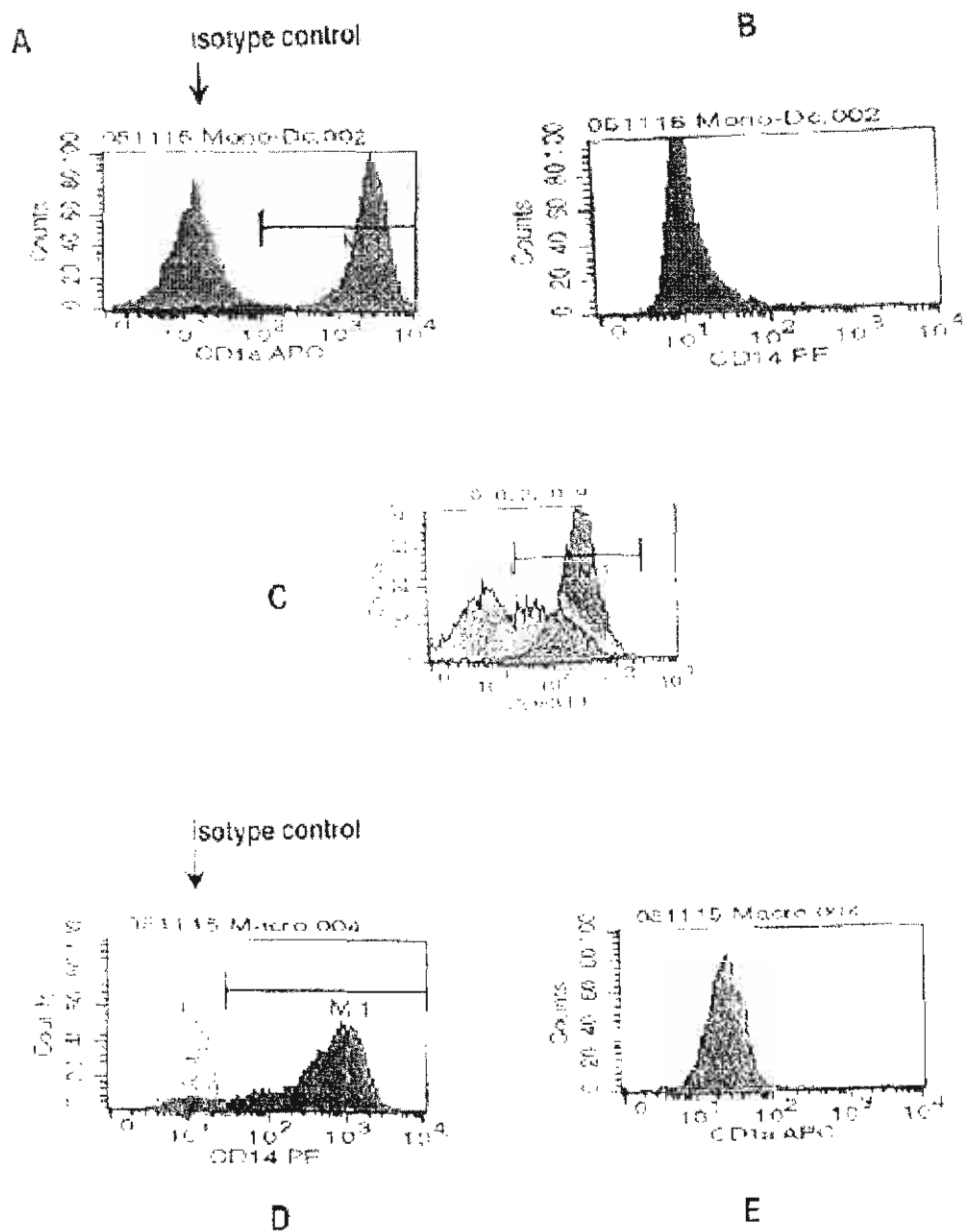
นอกจากปัญหาที่กล่าวมานี้ เรายังมีปัญหาเล็กๆ น้อยๆ เกี่ยวกับ technical skill ของบุคลากรที่รับผิดชอบเกี่ยวกับงานวิจัยเรื่องนี้ กล่าวคือเรามีความเชื่อว่าการใช้ primary human cell monolayer น่าที่จะให้ผลตรงตามความเป็นจริงมากกว่าการใช้ cell line หรือจากการเตรียมเซลล์โดยตรงจากหนู mouse ดังนั้น จึงได้ขอทุนสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกของ สกว. โดยทำการคัดเลือกนักศึกษาที่มีพื้นฐานความรู้ทางการแพทย์โดยเฉพาะ และโชคดีที่มีนักศึกษาที่จบแพทยศาสตรบัณฑิตมาร่วมในโครงการนี้ ถึงแม้ว่านักศึกษานี้มีความคิดและสามารถตั้งคำถามวิจัยที่ดีๆ แต่ไม่มีพื้นฐานทางด้านการทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการมาเลย ดังนั้น ในระยะแรกๆ จึงมีปัญหามาก และต้องฝึกการทำงานเกือบจะพูดได้ว่าเริ่มต้นจากศูนย์เลยก็ได้ อย่างไรก็ตามในขณะนี้ นักศึกษาค้นนี้มีความสามารถพอที่จะทำงานให้มีผลที่เป็นที่ยอมรับได้ และจากผลเบื้องต้นที่ค่อยๆ ท่อยอดได้มาก็เป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง

หลังจากที่ได้เปลี่ยน culturing conditions ไปหลายครั้ง ผลสุดท้ายเราก็ได้ condition ที่ทำให้เราได้ทั้ง dendritic cells (DC) และ macrophage (MØ) ที่เป็นเซลล์ที่ดูสมบูรณ์พอที่จะนำมาทดสอบได้ โดยสรุปคือ เราเตรียม peripheral blood mononuclear cells (PBMC) จาก blood donor โดยใช้ Lymphoprep ตามรายละเอียดของ protocol ที่เคยกล่าวไว้แล้วในรายงานความก้าวหน้าก่อนๆ (9) หลังจากนั้นจึงเตรียม monocytes จาก PBMC โดยใช้ magnetic bead conjugated specific antibody to CD14 (Mitenyi Biotec, Germany) โดยใช้ protocol ที่บริษัทแนะนำ หลังจากผสม PBMC suspension กับ antibody แล้วให้ผ่าน magnetic column เซลล์ที่มี CD14 จะติดอยู่บน column และหลุดออกมาเมื่อปล่อยให้ PBS ผ่านเข้าไป นำเอา monocyte ที่ได้ไปปั่นล้าง และทำเป็น cell suspension ใน RPMI 1640 culture medium แล้วนำไปนับโดย hemacytometer แล้วนำไปแบ่งเพื่อเตรียม DC และ MØ ดังต่อไปนี้คือ

1. **การเตรียม DC** นำ monocytes ที่เตรียมได้ไปเลี้ยงใน complete medium ซึ่งประกอบด้วย RPMI 1640 ที่มี 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 0.1% mercaptoethanol และ 10% fetal calf serum (ที่ได้ผ่านการทดสอบล่วงหน้าแล้วว่าเป็น batch ที่ support DC differentiation) และใส่ cytokines เพื่อให้เซลล์ monocyte เปลี่ยนไปเป็น DC คือ GM-CSF (50 µg/ml) และ IL-4 (50 µg/ml) นำ cell suspension ที่อยู่ใน differential medium ใส่ลงไปใน 96-well plate และแต่ละหลุมมีเซลล์ 2×10^5 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ในตู้บัพที่มี CO₂ 5% เป็นเวลานาน 6-7 วัน (เปลี่ยน medium ทุกๆ 2 วัน) เซลล์จึงเปลี่ยนเป็น DC โดยดูจากนำไปวิเคราะห์โดยใช้ flow cytometer และพบว่า immature DC ที่ได้เป็นเซลล์ที่มี CD83⁻ CD1a⁺ และ CD14⁻ (รูปที่ 1) ข้อที่ต้องระวังในการเลี้ยง DC คือมันเป็นเซลล์ที่เป็น non-adherent cells ดังนั้นในการเปลี่ยน medium เข้าออกต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ เพื่อไม่ให้มันถูก activated ก่อนที่จะนำมาใช้

2. **การเตรียม MØ** complete medium ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ MØ ประกอบด้วย ISCOVES' MDM culture medium ที่มี 10% pooled human AB serum เป็น supplement นำเซลล์ suspension (200 µl) ใส่ลงไปในหลุมของ 96-well plate โดยแต่ละหลุมจะมีจำนวนเซลล์ 1×10^4 เซลล์ และเปลี่ยน medium ทุกๆ 2 วันเหมือนๆ กับที่ทำกับ DC เลี้ยงเซลล์ไว้ประมาณ 6-7 จึงจะนำมาใช้ทดลอง เซลล์ที่ได้จะเป็น adherent cells ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้ flow cytometer จะพบว่า เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติของ MØ คือเป็น DC1₂⁻ และ CD14⁺ (รูปที่ 1)

เซลล์ทั้งสองชนิดที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป คือนำมา infected ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* และเชื้อ *B. thailandensis* โดยมีสัดส่วน (multiplicity of infection) ระหว่าง 1:1 – 2:1 เมื่อนำเชื้อมาใส่บน cell monolayers เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงฆ่าเชื้อที่อยู่ใน culture medium และที่เกาะติดอยู่นอกเซลล์ตามวิธีที่เคยตีพิมพ์ไว้แล้ว (10) และนำ infected cells ไปเลี้ยงต่อตามเวลาที่ต้องการ หลังจากนั้นจึงนำเซลล์พวกนี้มา lyse ก่อนเพื่อนับจำนวนเชื้อที่เป็น intracellular bacteria

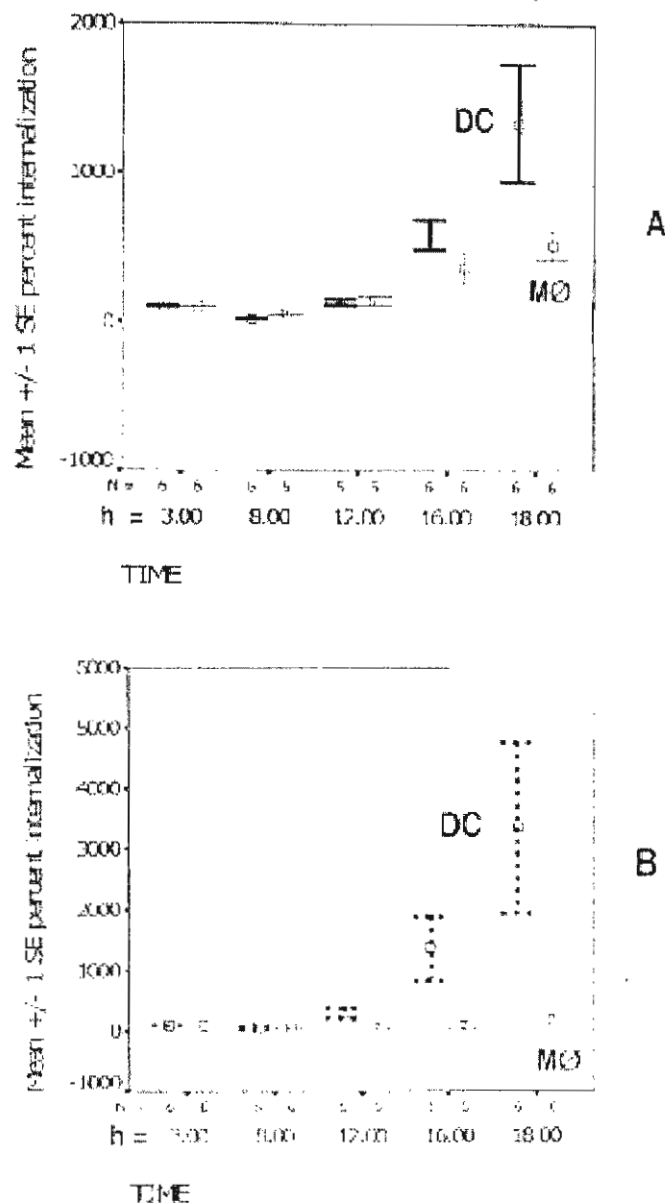


รูปที่ 1 Flow cytometric analysis ของ DC (A-C) และ MØ (D และ E) ที่ใช้ในการทดลองเมื่อนำ monocytes มาเลี้ยงใน medium ที่มี GM-CSF และ IL-4 เป็นเวลา 5-7 วัน และได้เซลล์ที่เป็น CD14⁺ (A) CD14⁻ (B) (immature DC) และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะเปลี่ยนไปเป็น mature DC ซึ่งเป็น CD83⁺ (C) หากนำเอา monocytes มาเลี้ยงโดยไม่มี cytokines จะได้เซลล์ที่ยังคงเป็น CD14⁺ (D) และ CD14⁻ (E) ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์ MØ

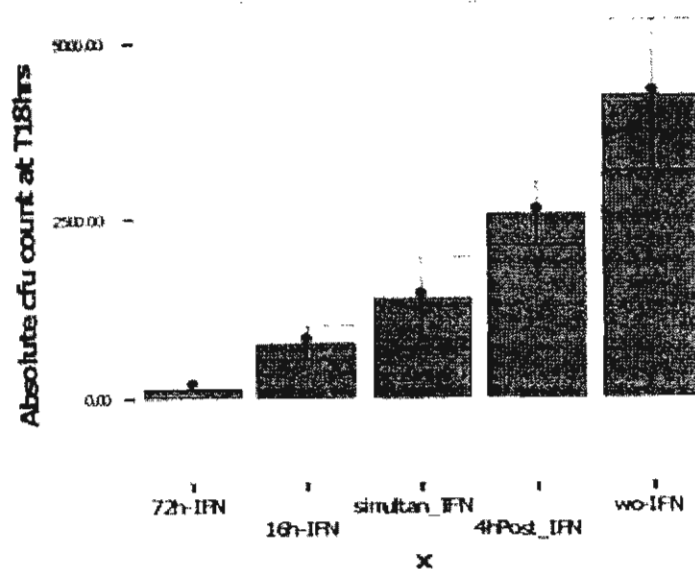
โดยปริมาณของเชื้อที่นับหลังจากเริ่ม infect ได้ 3 ชม. จะถือว่าเป็นเชื้อที่ถูก internalized เข้าไป และเชื้อที่นับได้ในช่วงหลังๆ เช่น 8, 12 และ 16 ชั่วโมง จะถือว่าเป็นเชื้อที่ survived และสามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตได้

ผลการทดลอง infect เซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วยเชื้อที่มีความรุนแรงคือ *B. pseudomallei* และเชื้อที่ไม่มีความรุนแรงและไม่ก่อให้เกิดโรคคือ *B. thailandensis* ที่ได้สรุปมาข้างต้น บอกอะไรเราได้บ้างเกี่ยวกับกลไกของการเกิดโรค จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ในกลุ่มของเราเอง เราพบว่าเมื่อใช้ mouse macrophage cell line (J744) และ human epithelial cell line (A549) เชื้อทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากในด้านของความสามารถที่จะ modulate host cell response และการคงชีวิตอยู่ได้ในภายในเซลล์ (11, 12) ดังนั้นคุณสมบัติเหล่านี้จึงไม่สามารถอธิบายเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคได้ ผลของการวิจัยเบื้องต้นโดยใช้ primary human DC และ MØ ในงานวิจัยปัจจุบันชี้แนะสิ่งสำคัญบางอย่างคือ เชื้อทั้งสองมีความคงทนและเจริญเติบโตได้ใน MØ ในอัตราที่ต่างกัน กล่าวคือเชื้อ *B. pseudomallei* เท่านั้น ที่จะ replicate ต่อใน MØ สำหรับเชื้อ *B. thailandensis* นั้นไม่สามารถ multiply ได้ (รูปที่ 2) เพราะเมื่อดูจากกราฟของการเติบโตของเชื้อ (วัดโดยคำนวณจากปริมาณของ intracellular bacteria ณ เวลาใดเวลาหนึ่ง) จะพบว่าจำนวน *B. thailandensis* ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนของเชื้อที่เข้าไปในตอนแรก แต่การเข้าไปในเซลล์และเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้คล้ายกันมากใน DC กล่าวคือ DC ไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อทั้ง 2 ได้เลย ไม่ว่าจะเป็นเชื้อที่มีความรุนแรง (*B. pseudomallei*) หรือไม่มีความรุนแรงคือเชื้อ *B. thailandensis* (รูปที่ 2B) ซึ่งจากรูปจะเห็นว่าปริมาณของเชื้อทั้งสองจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลา และหลังจาก 18 ชั่วโมง DC จะถูกทำลายเกือบหมด (ไม่ได้แสดงในรูป)

ผลการทดลองในขั้นตอนต่อมาคือดูว่าหากเรา activate เซลล์ MØ เพื่อเพิ่ม antimicrobial activity แล้ว MØ จะสามารถกำจัดและฆ่า *B. pseudomallei* ได้หรือไม่ ในการทดลองนี้ เราจึงนำเอา human interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) ใส่ลงไปใน MØ monolayer ในเวลาต่างๆ กัน โดยใช้ความเข้มข้นที่ 1, 10 และ 100 ng/ml (13) ในชุดการทดลองบางชุด MØ จะถูกกระตุ้นก่อน (preincubate) หรืออาจถูกกระตุ้นไปพร้อมๆ กับใส่เชื้อ (simultaneous) หรือกระตุ้นหลัง (post-infected) จากใส่เชื้อ *B. pseudomallei* ลงไป ผลการทดลองดังปรากฏในรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่า preactivated MØ สามารถที่จะฆ่า intracellular *B. pseudomallei* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และความสามารถในการฆ่าเชื้อนี้จะลดน้อยลงเมื่อระยะเวลาระหว่างการ expose ต่อ $\text{IFN-}\gamma$ และ challenging time สั้นลง อย่างไรก็ตาม เราไม่พบว่า preactivated MØ จะสามารถ phagocytose เชื้อได้ดีกว่า unactivated MØ ผลของ $\text{IFN-}\gamma$ ที่กล่าวมานี้ สอดคล้องกับผลของงานวิจัยในโครงการวิจัยย่อยที่ 2 ที่จะอธิบายในภายหลัง



รูปที่ 2 การเข้าและเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* (A) และ *B. thailandensis* (B) ใน DC and MOI ผลที่ได้ (แกน Y) เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้จำนวนเชื้อที่ 3 ซม. (h = 3.00) ของแต่ละชุด การทดลองเป็น 100% เพราะจำนวน CFU ของแต่ละชุดการทดลองจะไม่เท่ากัน เนื่องจากค่า MOI ที่ใช้ไม่เท่ากันทั้งหมด โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 1:2 ถึง 1:1



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพของ 10 ng/ml interferon gamma (IFN) ในการกระตุ้นเซลล์ และฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* ของ MØ ใส่ IFN ไปบน monolayer 72 และ 16 ชั่วโมงก่อน หรือใส่พร้อมๆ (simultan) หรือ 4 ชั่วโมง หลัง (post) จากใส่เชื้อแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับจำนวนของเชื้อใน monolayer ที่ไม่ถูกกระตุ้น (WO-IFN) จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เซลล์ถูกกระตุ้นก่อนหรือหลังจากที่จะได้รับเชื้อแล้ว

แม้ว่า MØ จะฆ่าเชื้อได้เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ แต่ในความเป็นจริง เชื้อนี้อาจสามารถหลบอยู่ในร่างกายของเราเป็นเวลานานหลายปี ในปัจจุบันเรายังไม่มีคำตอบว่าเชื้ออยู่ได้อย่างไรหรือซ่อนตัวอยู่ในเซลล์อะไร มีข้อมูลจากนักวิจัยหลายๆ กลุ่มที่บ่งชี้ว่าอาจจะไม่ใช่เซลล์ MØ เพราะเซลล์นี้จะถูกเชื้อทำลายได้ง่ายหากมันไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ก่อน มีความเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจจะหลบซ่อนอยู่ในเซลล์อื่นๆ เช่น epithelial cells และมันสามารถที่จะบุกรุกจากเซลล์หนึ่งเข้าไปหลบซ่อนอยู่ในเซลล์ใกล้เคียงได้โดยไม่ต้องออกจากเซลล์แรกเลย (14) นอกจากนี้ผลของงานวิจัยในโครงการวิจัยย่อยที่ 3 และ 5 ยังบ่งชี้ว่าเชื้ออาจเปลี่ยนแปลง phenotype และทำให้กลไกของร่างกายตรวจเจอได้ยาก เช่น กลุ่มวิจัยของเราเองเคยแสดงว่าเชื้ออาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยการสร้างเกราะขึ้นมาป้องกันตัวของมันเอง (biofilm formation) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเชื้อที่มีเกราะป้องกันตัวของมัน จะมีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคไม่แตกต่างไปจากเชื้อที่ไม่สร้างเกราะป้องกัน (15) แต่มันอาจสามารถหลบซ่อนตัวอยู่อย่างเงียบๆ โดยที่กลไกของร่างกายและยาปฏิชีวนะเข้าไปไม่ถึง และวันดีคืนดีเมื่อความ

ด้านทานของเราลดลง เชื้อก็อาจจะปรากฏตัวออกมาได้อีกครั้ง และทำให้เกิดเป็น relapse infection ขึ้นได้

ในขณะนี้โครงการวิจัยย่อยที่เกี่ยวกับ DC และ MD ยังไม่สมบูรณ์ และต้องทำการทดลองเพิ่มเติม โดยจะใช้งบประมาณวิจัยจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก และคาดว่าจะได้ผลที่สมบูรณ์ระดับหนึ่งที่สามารถจะนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการได้ นอกจากนี้ก็จะเห็นได้ว่าโครงการวิจัยย่อยเรื่องนี้ ยังเกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยย่อยอื่นๆ และองค์ความรู้ที่ได้จะถูกนำไปประกอบในการวางแผนวิจัยต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การใช้ immunomodulator CpG oligodeoxynucleotide (ODN) เพื่อควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis*

นักวิจัยหลัก: รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน

ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ

ศ.ดร. สถิตย์ สิริสิงห์

ดร. สาธิต พิษยางกูร

ระยะเวลา: 3 ปี

งบประมาณ (วัสดุ): 500,000 บาท

ผลงานตีพิมพ์: 3 เรื่อง (publication no. 1, 2 และ 7)

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้คือทดสอบทางห้องปฏิบัติการในเซลล์ MØ และในสัตว์ทดลองว่า CpG จะสามารถ immunomodulate การตอบสนองต่อเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ได้ดีไม่น้อยเท่าใด และสามารถป้องกันการเกิดโรคเมลิอยโดสิสได้หรือไม่ ซึ่งผลการทดลองในโครงการย่อยนี้ได้ผลดีกว่าที่คาดการณ์ไว้มาก และได้รายงานไว้เป็นระยะๆ ในรายงานความก้าวหน้าแต่ละครั้ง และทยอยตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการได้อย่างสม่ำเสมอ ตลอดระยะเวลา 3 ปีที่ผ่านมา โดยพอจะสรุปได้ดังนี้คือ CpG ODN 1826 ที่นำมาทดสอบนั้น สามารถที่จะกระตุ้นเซลล์ MØ ซึ่งในกรณีนี้ใช้ mouse macrophage cell line (RAW 264.7) เป็นตัวทดสอบ โดยที่เซลล์ดังกล่าวจะมี Toll-like receptor (TLR 9) เป็นตัวจับกับ CpG เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นก็จะมีการตอบสนองโดยสร้าง iNOS และ NO (publication no. 1) และเมื่อทดสอบต่อจึงพบว่า activated cells มีความสามารถที่จะฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ดีขึ้น (publication no. 2) และเมื่อนำเอา CpG ไปทดสอบต่อในหนู Balb/c mice พบว่าหากฉีดสาร CpG ไประหว่าง 2-10 วันก่อนที่จะฉีดเชื้อ *B. pseudomallei* เข้าไปในหนู สารนี้จะสามารถป้องกันการเกิดโรคเมลิอยโดสิสได้มากถึง 90% (publication no. 7) ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจะลดลง หากเราฉีดสาร CpG ไปพร้อมๆ กับฉีดเชื้อ หรือฉีด CpG หลังจากที่ได้รับเชื้อไปแล้ว ซึ่งหมายความว่า CpG สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ แต่ไม่มีผลในการรักษาผู้ป่วย ในช่วงท้ายของการวิจัยนี้ คณะวิจัยของเราพยายามที่จะหาทางที่จะทำให้ CpG ที่ฉีดเข้าไปถูกปล่อยออกช้าๆ เพื่อให้สามารถอยู่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้นานขึ้น และเพื่อทดสอบในส่วนนี้ทางเรานึกถึงการใส่ liposome และในการทดสอบเบื้องต้น เมื่อเรา incorporate เอา CpG ใส่ลงไปใน liposome แล้วฉีดเข้าไปในสัตว์ประมาณ 30 วันก่อนที่จะฉีดเชื้อ *B. pseudomallei* เข้าไปตาม protocol ที่อธิบายไว้ใน publication no. 7 ผลการทดสอบปรากฏว่าหนูเหล่านี้จะมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นและมีชีวิตอยู่ได้นานกว่ากลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ถูกฉีด CpG แต่เพียงอย่างเดียว สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้ liposome นี้ กลุ่มวิจัยของเราจะต้องปรับปรุงเพิ่มเติมให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เป็นต้นว่าอาจเปลี่ยนองค์

ประกอบของสารที่จะนำมาทำ liposome และขนาดของ liposome ที่ใช้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ กลุ่มวิจัยของเรายังขาดประสบการณ์ ดังนั้น เราจึงมีแผนที่จะส่งนักศึกษาโครงการ คปท. ที่อยู่ในความดูแลของ ศ.ดร. สถิตย์ สิริสิงห์ ไปเรียนรู้ศาสตร์ของการเตรียม liposome จาก Professor Gert Storm ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งเป็นผู้ที่มีประสบการณ์ในการพัฒนา liposome ชนิดต่างๆ สำหรับใช้เป็นตัวนำส่งยาหรือวัคซีนเข้าไปในร่างกาย และในขณะเดียวกันกลุ่มวิจัยของเราซึ่งมี รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ก็ได้ใช้งานวิจัยส่วนนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยใหม่ที่ทางกลุ่มวิจัยนำเสนอและได้รับอนุมัติแล้วจาก สวทช.

วัตถุประสงค์รองของโครงการวิจัยนี้คือดูความเป็นไปได้ที่จะใช้ CpG เป็นตัว adjuvant ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีน ในรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 5 เราได้สรุปไว้ว่าการใช้ paraformaldehyde-killed whole cell *B. pseudomallei* เป็นวัคซีนต้นแบบ และเมื่อผสมกับ CpG ที่ใช้เป็น adjuvant แล้วนั้น การป้องกันให้หนูมีชีวิตอยู่ดีกว่าการใช้วัคซีนโดยไม่มี adjuvant แต่ผลที่เราพบตามมาก็คือ หนูที่ฉีดวัคซีนที่มี CpG เป็น adjuvant นั้น มีเพียง 10% เท่านั้นที่มี bacteremia ซึ่งหมายความว่าเราสามารถลด acute symptom ลงได้มาก เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับวัคซีนแต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งในหนูกลุ่มหลังนี้จำนวนมาก (ประมาณ 50%) ยังมีแบคทีเรียในกระแสเลือดสูง 2 วันหลัง challenge อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าหนูบางตัวที่ได้รับวัคซีนและ adjuvant และที่ไม่พบ bacteremia บางตัวก็ยังตายลงในภายหลัง ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าอาจเกิดมี “cytokine storm” ในหนูเหล่านี้ แต่ข้อมูลเบื้องต้นที่มีอยู่คือระดับของ IFN- γ ในเลือดของหนูกลุ่มนี้ก็ไม่ได้สูงมากกว่ากลุ่มอื่นๆ ดังนั้น การตายอาจมาจากสาเหตุอื่น ซึ่งทำให้ต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมต่อไป และกำลังดำเนินอยู่ตามแผนของโครงการวิจัยใหม่ที่ได้จาก สวทช.

ด้วยเหตุผลข้างต้น จึงทำให้เราต้องพยายามหาคำอธิบายให้กับ data ที่ได้ เป็นต้นว่ามีความเป็นไปได้ว่าวัคซีนและ adjuvant มีประสิทธิภาพในการป้องกัน acute infection แต่ไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อให้หมดไปได้ และเชื้อที่หลงเหลืออยู่อาจเป็นสาเหตุที่นำไปสู่ localized chronic infection ที่อวัยวะใดอวัยวะหนึ่งและทำให้หนูบางตัวต้องตายไปในที่สุด ดังนั้น ในระยะสุดท้ายของโครงการวิจัยนี้ เราจึงพยายามจะศึกษาผลของ CpG ในการป้องกันการเกิด chronic infection แต่ก่อนที่จะทำการทดสอบดังกล่าว มีความจำเป็นที่เราต้องหาวิธีการที่จะ induce chronic infection ในหนูให้ได้ก่อน และต้องหา parameter ที่จะใช้ในการตรวจจับว่ามี chronic infection เกิดขึ้นจริง ซึ่งหากเราจะวัดจากระดับของแอนติบอดีก็ได้ แต่มันก็เพียงบอกว่าหนูเหล่านี้เคยมี infection มาแล้วเท่านั้น และเชื่ออาจถูกฆ่าตายหมดไปแล้วก็ได้ ทำให้เราไม่สามารถตรวจหาเชื้อไม่ว่าจะในกระแสเลือดหรือในม้าม ตับ และปอดของหนูเลย ดังนั้น เราต้องทดสอบต่อไปว่าจะใช้วิธีอื่นอะไรได้บ้าง และวิธีการหนึ่งซึ่งมีการนำไปใช้กับ model อื่นๆ คือการฉีด steroid เข้าไปให้นานพอที่จะไปกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (วันละ 1 ครั้งๆ ละ 3 mg เป็นเวลานาน 7 วัน) และหากมี chronic infection หรือมีเชื้อหลบซ่อนอยู่

เชื้อก็จะเจริญเติบโตและทำให้เราตรวจพบได้ในที่สุด แต่แม้จะใช้วิธีการนี้แล้วเราก็คงไม่ประสบผลสำเร็จ และไม่สามารถตรวจพบเชื้อออกมาในกระแสเลือดตามที่คาดหวังเอาไว้

การทดลองท้ายสุด กลุ่มวิจัยของเราฉีดหนูด้วย CpG และตามด้วยการฉีดเชื้อ *B.pseudomallei* ในปริมาณที่เคยใช้ตาม publication no. 7 เลี้ยงหนูที่มีชีวิตอยู่ได้ไปจนถึงวันที่ 45 แล้วจึงฉีดหนูเหล่านี้ด้วย anti-interferon gamma (ATCC hybridoma HB170) ในปริมาณที่ calibrated ไว้แล้ว หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดเป็นระยะๆ แล้วนับจำนวนเชื้อและเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ anti-interferon จากผลการศึกษาในเบื้องต้น เราพบว่าเชื้อปรากฏในกระแสเลือดเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการฉีด anti-interferon เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แม้ว่า CpG สามารถป้องกันไม่ให้หนูตายจาก acute infection และ septicemia ได้ แต่เชื้อไม่ได้ถูกกำจัดออกไปหมด และเมื่อความต้านทานของหนูลดลง (จากการฉีด anti-interferon) ก็จะทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตขึ้นมา และทำให้เกิด relapse ขึ้นได้ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับในกรณีของการเกิด relapse ในผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษาโดยยาปฏิชีวนะจนอาการเบื้องต้นหายแล้ว แต่ก็มีความเสี่ยงที่จะมี relapse ตามมาได้ในภายหลัง โดยเฉพาะ เมื่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีปัญหา

ผลต่างๆ ที่ได้จากการวิจัยในโครงการย่อยนี้ ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ถึงระดับหนึ่ง แต่ผลบางส่วนก็เป็นเพียงผลเบื้องต้นและควรต้องมีการวิจัยต่อไป เพื่อจะได้มีความสมบูรณ์มากขึ้น และอาจนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้ ดังนั้น การวิจัยที่ใช้ CpG จึงยังเป็นส่วนของงานวิจัยในโครงการวิจัยใหม่ที่กลุ่มวิจัยของเราได้รับทุนสนับสนุนจาก สวทช.

โครงการวิจัยย่อยที่ 3: การศึกษา virulence ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในห้องปฏิบัติการ

นักวิจัยหลัก: ศ.ดร. สติชัย สิริสิงห
รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล
ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ
รศ. ดร. สุนัย กอรัปศรีเศรษฐ์

ระยะเวลา: 3 ปี

งบประมาณ (วัสดุ): 600,000 บาท

ผลงานตีพิมพ์ 9 เรื่อง (publication no. 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 และ 12)
1 เรื่อง (accepted for publication, no. 15)
3 เรื่อง (submitted no. 16, 17 และ 18)
1 เรื่อง (under preparation no. 19)

สำหรับโครงการวิจัยย่อยเรื่องนี้ คณะวิจัยของเราศึกษาโดยใช้วิธีการทดลอง 2 แนวทางคือ

1. เปรียบเทียบความเหมือนกันและความแตกต่างระหว่างเชื้อที่มีความรุนแรงและทำให้เกิดโรค (virulent *B. pseudomallei*) และเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดโรค (avirulent *B. thailandensis*)
2. อาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมศาสตร์และข้อมูลของ DNA ในฐานะข้อมูล genome of *B. pseudomallei* (7) ค้นหาชิ้นที่น่าจะมีส่วนในการก่อความรุนแรง (virulence factors) และพยาธิสภาพของโรค แล้วเอามาประกอบในการสร้าง mutants ชนิดต่างๆ เพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับ wild type

วิธีการที่ใช้ในการศึกษาทั้งสองแนวทางนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ (in vitro) โดยดูผลจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและเซลล์เจ้าบ้าน (pathogen-host interaction) ในการศึกษาที่เราสังเกตการเกาะติด (adherence) การเข้าเซลล์ (invasion) อยู่รอดและการเจริญเติบโต (intracellular survival and replication) ของเชื้อและการตอบสนองของ host cells ในลักษณะต่างๆ เช่น การสร้าง antimicrobial activity (iNOS) cytokine production (เช่น proinflammatory TNF- α เป็นต้น) การเกิดพยาธิสภาพระดับเซลล์โดยดูจากการเกิด cell fusion และก่อให้เกิด multinucleated-giant cell formation (MNGC) เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ให้โครงการย่อยนี้คือ mouse macrophage cell line ซึ่งเป็น phagocytic cells และ human epithelial cells ซึ่งเป็น non-phagocytic ซึ่งการจะใช้เซลล์ชนิดใดในการทดลองได้นั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลองแต่ละชุด ในบางกรณีหลังจากที่ทดลองในห้องปฏิบัติการแล้ว เราจะนำเชื้อ mutants ตัวที่น่าสนใจไปทดสอบหาความ

รุนแรงและความสามารถที่จะก่อโรคในสัตว์ทดลอง (in vivo) และเอาผลที่ได้มาคำนวณหา LD₅₀ และเปรียบเทียบกับค่าของเชื้อ wild type

การศึกษาด้วยการใช้เชื้อ *B. pseudomallei* และเชื้อ *B. thailandensis*

เนื่องจากข้อมูลซึ่งเคยมีการตีพิมพ์ไปแล้ว (7) ชี้แนะว่าแม้ว่าเชื้อทั้งสองจะมี genotype and phenotype ที่ใกล้เคียงกันมาก แต่เชื้อทั้งสองมีความรุนแรงต่างกันมากเมื่อนำเชื้อเข้าไปในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้เชื้อทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เจ้าบ้านที่ต่างกันอยู่บ้าง ดังนั้น เพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น เราจึงหาวิธีการที่จะวัดความแตกต่างดังกล่าวให้ละเอียดและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น เราจึงศึกษาโดยใช้ non-phagocytic cell (A549) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้จะเกาะติดอยู่กับผิวเซลล์ (adherence) บุกรุกเข้าไปในเซลล์ (invasion) และความสามารถที่เชื้อจะมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ในเซลล์ (survival and replication) ประเด็นนี้ ซึ่งผลของการศึกษานี้เราได้รายงานไว้อย่างละเอียดแล้วในรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3 และได้ตีพิมพ์เรียบร้อยแล้วในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (publication no. 5) สำหรับคำอธิบายที่ว่าองค์ประกอบใดของเชื้อที่ทำให้ *B. pseudomallei* มีประสิทธิภาพกว่า *B. thailandensis* ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่ชัดในปัจจุบันนี้ แต่ผลของการทำ mutants และนำเอามาทดสอบตามที่อธิบายในช่วงท้าย น่าจะช่วยให้เราเข้าใจกลไกเหล่านี้ได้ดีขึ้น

การศึกษาโดยการสร้าง mutants

ในส่วนนี้ของงานวิจัย เรามีผู้ร่วมงานอยู่หลายกลุ่มที่มีความสามารถทางด้าน genetic manipulation เพื่อใช้สร้าง mutants ชนิดต่างๆ ตามที่แต่ละกลุ่มสนใจ ซึ่งได้รวบรวมเฉพาะตัวที่นำมาทดสอบต่อไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เชื้อ *B. pseudomallei* mutants ชนิดต่าง ๆ ที่สร้างขึ้น และนำมาศึกษาต่อ

Mutants	Gene involved	Principal Investigators
RpoS (mBp844)	Sigma S factor	รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล
IR	Quorum sensing	รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล
No 6 No 10	Biofilm formation	รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน และ ผศ.ดร. ปรีชา หอมจำปา
PicN-1 (JSK-4) PicN-2 (SSK-2) PicN-12 (SSK-12)	Phospholipase C	รศ.ดร. สุนีย์ กอปรศรีเศรษฐ์
RpoE (AL30)	Sigma factor σ^E	รศ.ดร. สุนีย์ กอปรศรีเศรษฐ์

RpoS mutant

เราเลือกศึกษา *rpoS* เนื่องจากเป็นยีนที่ควบคุมการทำงานของยีนอื่นๆ อีกหลายๆ ยีน sigma S factor เป็นโปรตีนที่ควบคุมโดยยีนตัวนี้และจะถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่เชื้ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น การขาดสารอาหาร หรืออยู่ในสภาวะของ oxidative stress เป็นต้น โปรตีนนี้ถูกสร้างขึ้นเพื่อให้เชื้อสามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้ และเราก็ได้ตีพิมพ์ไปเรียบร้อยแล้ว (publication no. 4) ตามทฤษฎี เราคาดว่าเมื่อเชื้อ *B. pseudomallei* เข้าไปอยู่ในเซลล์ประเภท phagocytic cells นั้น เชื้อจะเจอกับสภาวะที่จะทำให้มันเกิดความเครียดได้ ดังนั้น เราจึงต้องการทดสอบดูว่า *rpoS* mutant จะสามารถ invade เซลล์และเจริญเติบโตในเซลล์แตกต่างไปจากเชื้อเริ่มแรก (wild type) หรือไม่ แต่ผลที่ได้ไม่เป็นไปอย่างที่คาดการณ์เอาไว้คือ mutant ดูเหมือนจะมีความสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ไม่แตกต่างไปจากเชื้อที่เป็น wild type แต่ผลที่ได้ชี้แนะว่า mutant ไม่สามารถที่จะ invade เข้าไปในเซลล์ได้ดีเท่ากับเชื้อ wild type นอกจากนี้ mutant ยังไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง iNOS ซึ่งก็ไม่ต่างไปจากที่พบใน wild type อย่างไรก็ตาม ตัว mutant เองดูเหมือนจะมีความไวกว่า wild type ต่อการถูกฆ่าโดยเซลล์ macrophages ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย IFN- γ คุณสมบัติทางพยาธิสภาพที่แตกต่างไปจาก wild type ก็คือตัวเชื้อ mutant เองไม่สามารถที่จะทำให้เซลล์มี fusion และกลายเป็น MNGC ได้เหมือนกับที่พบใน wild type ขณะนี้เรายังไม่ทราบถึงความแตกต่างนี้ เป็นเพราะว่า mutant ไม่สามารถหลบหนีออกมาอยู่ใน cytoplasm หรือเปล่า แต่ผลของการทดลองที่ใช้ protein inhibitor ชี้แนะว่า Sigma S factor ถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในเซลล์แล้ว และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการ induce ให้เซลล์กลายเป็น MNGC และผลสุดท้ายเซลล์ก็จะถูกทำลายไป ผลของการทดลองในส่วนนี้ ได้รับการตอบรับจากวารสาร Microbial Pathogenesis แล้ว รายละเอียดของผลสรุปปรากฏอยู่ใน draft ของ manuscript ในภาคผนวก (publication no. 15)

นอกจากยีน *rpoS* แล้ว การปรับตัวของเชื้อเมื่ออยู่ในสภาวะของความเครียดก็ยังคงถูกควบคุมโดยยีนในกลุ่มของ quorum sensing คือ *ynf* และ *R* อีกด้วยเหมือนกัน โดยเฉพาะในการควบคุมการอยู่รอดของเชื้อเมื่อมีประชากรหนาแน่น ดังนั้น รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล จึงสร้าง *IR* mutant ขึ้นมา ผลการศึกษา mutants ทั้ง 2 ชนิดนี้ ชี้ให้เห็นว่าระบบควบคุมโดย *rpoS* และยีนของระบบ quorum sensing มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกันเป็นเครือข่ายที่มีการควบคุมกันในเชิงลบ คือ เมื่อไม่มี *rpoS* การสร้าง AHL (acyl homoserine lactone) ที่ควบคุมความหนาแน่นของประชากรจะสูงขึ้น ในขณะเดียวกัน ถ้าไม่มีระบบ quorum sensing *IR* genes การแสดงออกของ *RpoS* ก็จะเพิ่มขึ้นในช่วง late stationary phase และทั้ง 2 ระบบนี้ในเชื้อ gram-negative bacteria อื่นๆ ก็มีการเกี่ยวข้องกับ virulence อีกด้วย ส่วนของงานวิจัยที่เกี่ยวกับการทำ quorum sensing mutant นี้ กำลังอยู่ในขั้นตอนของการเตรียม manuscript เพื่อส่งไปให้วารสาร พิจารณา (publication no. 16)

***RpoE* mutant**

ยีน *rpoE* เป็นยีนอีกตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวของเชื้อในสภาวะเครียด เช่น oxidative stress กลุ่มวิจัยของ รศ.ดร. สุนีย์ กอรปศรีเศรษฐ์ ได้สร้าง mutant ตัวนี้ขึ้นมาและพบว่า mutant นี้มีความไวต่อการถูกฆ่าด้วย H_2O_2 และ high osmolarity สูงกว่าตัว wild type นอกจากนี้ ยังพบว่า mutant ตัวดังกล่าวนี้ไม่สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ในเซลล์ macrophage ในขณะที่เรายังไม่มีคำอธิบายเกี่ยวกับ reduced intracellular survival time ของ mutant ตัวนี้ ไม่ทราบว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่ mutant นี้มีความสามารถในการสร้าง biofilm ลดลงด้วยหรือไม่ แต่ก็อาจมีความเป็นไปได้สูงเหมือนกัน เพราะตัว biofilm นั้นสามารถทำหน้าที่คล้ายๆ กับเป็นเกราะป้องกันให้กับตัวเชื้อได้เหมือนกัน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า mutant ตัวนี้ มีคุณสมบัติบางอย่างแตกต่างไปจาก *rpoS* mutant ที่ได้กล่าวมาแล้ว กล่าวคือ *rpoS* mutant นั้น นอกจากจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในเซลล์ macrophage แล้ว มันก็ยังสามารถแบ่งตัวและเจริญเติบโตได้เป็นปกติเหมือนกับเชื้อ wild type อีกด้วย ผลจากการทดลองเบื้องต้นชี้ว่า *rpoS* mutant นี้ยังสามารถสร้าง biofilm ได้เป็นปกติ ซึ่งหากเป็นเช่นนั้นจริงๆ ก็จะสอดคล้องกับแนวความคิดของหน้าที่ของ biofilm ที่กล่าวมาแล้วอีกด้วย รายละเอียดของผลงานวิจัยส่วนที่เกี่ยวข้องกับ *RpoE* mutant นี้ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเป็นที่เรียบร้อยแล้ว (publication no. 11)

Phospholipase C mutants

เอนไซม์ phospholipase C (PLC) มีความสำคัญสำหรับเชื้อแบคทีเรียหลายๆ ชนิด เอนไซม์ตัวนี้จะถูกหลั่งออกมาโดยตัวเชื้อ และสามารถช่วยย่อย lipid ใน culture เพื่อนำเอา products ไปใช้เป็นอาหารได้ ในอดีตได้มีการศึกษาเอนไซม์ดังกล่าวในเชื้อ intracellular อื่นๆ และแสดงให้เห็นว่า PLC สามารถทำหน้าที่เป็น virulence factor ได้อีกด้วย เพราะมันสามารถที่จะย่อยและทำลาย integrity ของผนังของ eukaryotic cells ซึ่งอาจมีส่วนทำให้เซลล์ตายได้ นอกจากนั้นมันยังช่วยย่อย endosomal membrane และปล่อยให้เชื้อมีโอกาสรอบนอกไปเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่ได้ใน cytoplasm ในการศึกษา PLC ของเชื้อ *B. pseudomallei* นั้น กลุ่มวิจัยซึ่งนำโดย รศ.ดร. สุนีย์ กอรปศรีเศรษฐ์ ได้พบว่าเชื้อมี PLC 2 ชนิดคือ PLC 1 และ PLC 2 จึงได้สร้าง mutant ขึ้นมา 3 ชนิดคือ JSK-4 ซึ่งไม่มี PLC 1, SSK-2 ซึ่งไม่มี PLC 2 และ SSK 1, 2 ซึ่งไม่มีทั้ง PLC 1 และ PLC 2 เราได้ศึกษาคุณสมบัติของ mutants เหล่านี้โดยใช้เซลล์ macrophage เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และสรุปได้ว่า PLC น่าจะเป็น virulence factor ชนิดหนึ่งของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้เหมือนกัน เพราะ mutant โดยเฉพาะที่ไม่มี PLC ทั้ง 2 ชนิด จะมี invasive capacity และ cytotoxicity ต่ eukaryotic cells น้อยกว่าเชื้อ wild type แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้ไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด MNGC

formation หรือการ induce ให้เกิด apoptosis ของ infected host cells ผลงานนี้ รศ.ดร. สุนีย์ กอรูปศรีเศรษฐ์ กำลังรวบรวมเขียน manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ต่อไป (publication no. 19)

Biofilm mutant

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียหลายๆ ชนิด มีความสามารถในการสร้าง exopolysaccharide component ไว้เป็นเกราะรอบๆ ตัวของมันเอง และทำให้เชื้ออยู่รวมกลุ่มกันเป็น microcolonies พวกเชื้อเหล่านี้จึงยากแก่การที่จะฆ่าให้ตายด้วยยาปฏิชีวนะและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งทำให้มันสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในร่างกายได้เป็นเวลานาน (latency state) และอาจมี relapse เกิดขึ้นเมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลงหรือมีความเครียด และเชื้อ *B. pseudomallei* ก็มีคุณสมบัตินี้ด้วยเหมือนกัน องค์ประกอบนี้บางที่เรียกว่า biofilm หรือ glycocalyx กลุ่มวิจัยของเราจึงมีความคิดที่จะศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ และต้องการที่จะพิสูจน์ว่า biofilm ของเชื้อ *B. pseudomallei* มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหรือไม่ คือทำหน้าที่เป็น virulence factor อีกอันหนึ่งหรือเปล่า ดังนั้นในการศึกษาเรื่องนี้ เราจึงวางแผนงานวิจัยออกเป็น 2 ส่วน

1. หาปริมาณของ biofilm ในเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ที่สุ่มเลือกมาจากคลังเชื้อของเรา และ *B. pseudomallei* ที่นำมาใช้ มีทั้งที่เป็น clinical isolates จากผู้ป่วยที่มีอาการและความรุนแรงต่างๆ กัน และ environmental isolates ที่แยกมาจากดิน เมื่อวัดปริมาณของ biofilm แล้ว จึงนำมาเปรียบเทียบกัน หลังจากนั้นจะเอาเชื้อ *B. pseudomallei* ที่สร้าง high-biofilm และ low-biofilm ไปทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค แล้วจึงนำเอา LD₅₀ ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกัน ซึ่งผลที่ได้ไม่ได้เป็นไปตามที่คาดหวังไว้คือปริมาณของ biofilm ที่สร้างไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ

2. ทำการสร้าง biofilm mutants ซึ่งได้ mutant มา 2 ตัว ซึ่งมีคุณสมบัติทาง phenotype เหมือนกัน และได้พิสูจน์จนแน่ชัดแล้วว่าเป็น biofilm mutants จริง หลังจากนั้นจึงนำไปทดสอบในสัตว์ทดลอง และก็ปรากฏว่าทั้ง wild type และ biofilm mutants มีความรุนแรงในระดับที่ใกล้เคียงกัน

ผลของการทดลองทั้ง 2 แนวทาง ชี้แนะว่า biofilm คงจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อหรือความสามารถในการก่อโรคชนิดเฉียบพลัน (acute infection) ในสัตว์ทดลอง ซึ่งข้อสรุปดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลที่ได้จาก in vitro study ที่ใช้ mutants อื่นๆ ที่กล่าวมาแล้ว และจากการใช้ isolates ของเชื้อที่เป็นพวก high-biofilm producer และ low biofilm producer biofilm mutant มี invasive capacity รวมถึงการก่อให้เกิด MNGC formation ไม่แตกต่างไปจากที่พบในเชื้อ wild type เลย อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้ไม่ได้แสดงให้เห็นว่า biofilm จะไม่เกี่ยวข้องกับการคงทนอยู่ของเชื้อในร่างกาย (latency) และอาจทำให้เกิด relapse infection ซึ่งเป็นคำถามวิจัยที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

งานวิจัยส่วนใหญ่เกี่ยวกับ biofilm เป็นงานที่ทำที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพราะผู้วิจัยหลัก คือ รศ. ทพญ. ดร. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ ซึ่งเป็นผู้ที่ได้ทุน สกว. ให้ทำวิจัยในเรื่องดังกล่าว และกลุ่มของ รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน และ ผศ.ดร. ปรีชา หอมจำปา ที่สร้าง biofilm mutants สำหรับงานวิจัยนี้ และผลวิจัยเรื่องนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการเรียบร้อยแล้ว (publication no. 10)

สืบเนื่องมาจากงานวิจัย biofilm ของเครือข่ายแล้ว ในปัจจุบันเรามีกงานวิจัยบางส่วนที่กำลังทำเพิ่มเติม โดยเราได้รับงบประมาณจากโครงการวิจัยใหม่ที่ได้รับจาก สวทช. โดยงานวิจัยเรื่องนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการใหญ่ที่มีศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิสที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นแกนนำ นอกจากโครงการวิจัยใหม่ที่ได้รับมาแล้ว รศ. ทพญ. ดร. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ เองกำลังอยู่ในขั้นตอนของการเขียนโครงการขอทุนวิจัยใหม่เพิ่มอีก 1 โครงการ เพื่อศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ biofilm ในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และอาจเป็นสาเหตุของการที่ร่างกายไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อออกไปได้ง่ายๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่มี relapse rate ค่อนข้างจะสูงมาก

นอกเหนือจากการวิจัยโดยใช้ mutants หลายๆ ชนิดที่กลุ่มวิจัยของเราได้สร้างขึ้นมาแล้ว ในขณะนี้กลุ่มวิจัยของเราเองก็กำลังสร้าง mutants อื่นๆเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการศึกษากลไกของการเกิดโรคจากเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นต้นว่า รศ.ดร. สุนีย์ กอรัปศรีเศรษฐ์ ได้สร้าง mutant ที่เกี่ยวข้องกับ type III secretion system ซึ่งทำหน้าที่เป็น virulence factor อีกชนิดหนึ่ง และเป็นที่รู้จักและยอมรับในเชื้ออื่นๆ อีกหลายชนิด ผศ.ดร. ภัทรชัย กิรติสิน และ รศ.นพ. มงคล คุณากร ซึ่งทั้งสองท่านมีความสนใจเกี่ยวกับ quorum sensing และได้มีการสร้าง mutants ที่ทำกันอยู่ในประเทศไทยแล้ว กลุ่มวิจัยของเราก็ก็นับว่าได้รับอนุญาตจาก Prof. Dr. D.E. Woods ที่ประเทศแคนาดา ให้ใช้ mutants ที่เกี่ยวกับ exopolysaccharide LPS, และ flagellin ซึ่งกลุ่มของเราในปัจจุบันนำเอา mutants เหล่านี้มาใช้เป็นส่วนของงานวิจัยในโครงการวิจัยใหม่ซึ่งเราเพิ่งจะได้รับอนุมัติจาก สวทช.

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การศึกษาความแตกต่างของ gene profiles ในเซลล์ macrophages จากคนปกติและจากผู้ป่วย โดยเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์เหล่านี้ และของ human epithelial cell line A549 เมื่อได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* และ/หรือเชื้อ *B. thailandensis*

นักวิจัยหลัก: ศ.ดร. สติติย์ สิริสิงห
รศ. ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์
ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ
รศ.ดร. ศุภธิดา อุบล

ระยะเวลา: 2 ปี

งบประมาณ (วัสดุ): 1,200,000 บาท

ผลงานตีพิมพ์ ยังไม่มีเนื่องจากเป็นเพียงโครงการนำร่อง

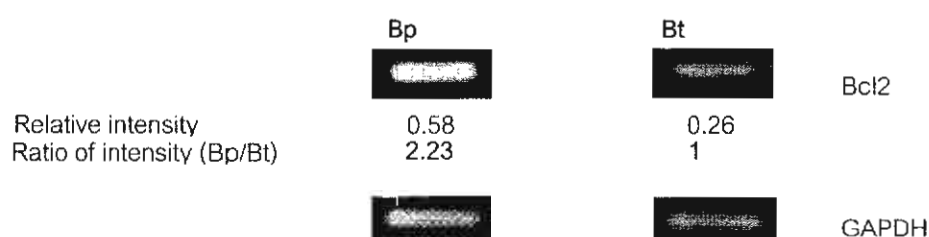
งานวิจัยในโครงการนี้เป็นการวิจัยนำร่องเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่าง pathogen-host ในระดับโมเลกุลและเซลล์ เพื่อช่วยให้เราเข้าใจเกี่ยวกับกลไกของการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ เราต้องการเปรียบเทียบ differential gene expression profiles ของ human epithelial cell A549 และของ primary human macrophage เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อทั้ง 2 ชนิด

สำหรับการทดลองที่ใช้เซลล์ A549 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และวิเคราะห์โดยใช้ microarray approach นั้น เราพบว่ามียีนที่มีการแสดงออกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่า 500 ยีน เช่น มีตั้งแต่ยีนที่เกี่ยวข้องกับ cell-cell signaling, cell cycle, apoptosis, metabolism, developmental process และ immune functions เป็นต้น แม้ว่าเราต้องการที่จะทำการ validate ยีนหลายๆ ยีนที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากเรามีเวลาที่เหลือไม่มาก และมีงบประมาณที่ค่อนข้างจะจำกัด เราจึงเลือกศึกษาเฉพาะกลุ่มยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันก่อน เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับ adhesion molecules, proinflammatory cytokines และ apoptosis

ในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มวิจัยที่นำโดย รศ.ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์ ได้ทำการสกัด RNA จาก เซลล์ A549 ที่ incubate ไว้กับเชื้อ *B. pseudomallei* และ เซลล์ A549 ที่ incubate ไว้กับเชื้อ *B. thailandensis* ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ทำการสังเคราะห์ให้เป็น cDNA จาก mRNA ที่สกัดไว้ข้างต้น แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนที่น่าสนใจด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ รวมทั้งต่อ house keeping gene ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ GAPDH หลังจากนั้นนำ PCR product มาแยกโดยใช้ gel electrophoresis ก่อน แล้วจึงทำการวัดความเข้ม ของ band ของแต่ละยีน หลังจากนั้น normalize ความเข้มของยีนที่น่าสนใจ ด้วยความเข้มของ house keeping gene จาก

นั้นจึงนำค่าความเข้มที่ normalized แล้ว มาเปรียบเทียบระหว่าง ยีนที่แสดงออกในเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* กับ เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* ในส่วนของ real time PCR นั้น จะใช้ cDNA เช่นเดียวกับการทำ RT PCR โดยจะทำการหาค่า threshold cycle ของแต่ละยีนแล้วเทียบกับ house keeping gene จากนั้นจึงเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ระหว่างเซลล์ที่ ติดเชื้อ *B. pseudomallei* กับ เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis*

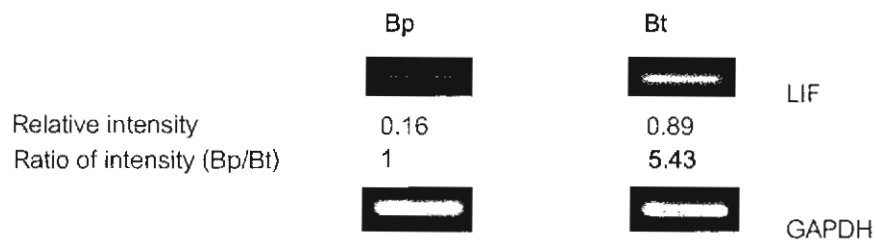
จากการทำ microarray เพื่อศึกษาความแตกต่างในการแสดงออกของยีนนั้น ได้ทำการเลือกยีนที่สนใจมาทำการศึกษาต่อยด้วย RT PCR ได้แก่ ยีน B-cell CLL/lymphoma 2 (*bcl2*), Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) และ Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) พบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* มีการแสดงออกของยีน *bcl2* มากกว่า เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* ส่วนยีน ICAM1 และ LIF นั้น มีการแสดงออกของยีนในเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ต่ำกว่า เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* ผลเบื้องต้นจากการทำ RT PCR พบว่า ยีน *bcl2* ในเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* มีความเข้มของ PCR product มากกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* ถึง 2 เท่า (รูปที่ 4) ส่วนยีน ICAM1 และ LIF นั้น พบว่า มีความเข้มของ PCR product น้อยกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* ถึง 2 เท่า และ 5 เท่าตามลำดับ (รูปที่ 5 และ 6) เราได้ทดลองทำ real time PCR กับยีน ICAM1 เพื่อยืนยันผลและศึกษายีน E-selectin และ IL-11 เพิ่มเติม พบว่าค่า relative quantitation ของ mRNA level ในเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* มีค่าน้อยกว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งมีการแสดงออกของยีนเป็นไปตามผลการทดลองที่ได้จาก microarray เหตุผลที่ลองเลือกกลุ่มยีนเหล่านี้มาศึกษาก่อนเพราะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ inflammatory response โดยตรง



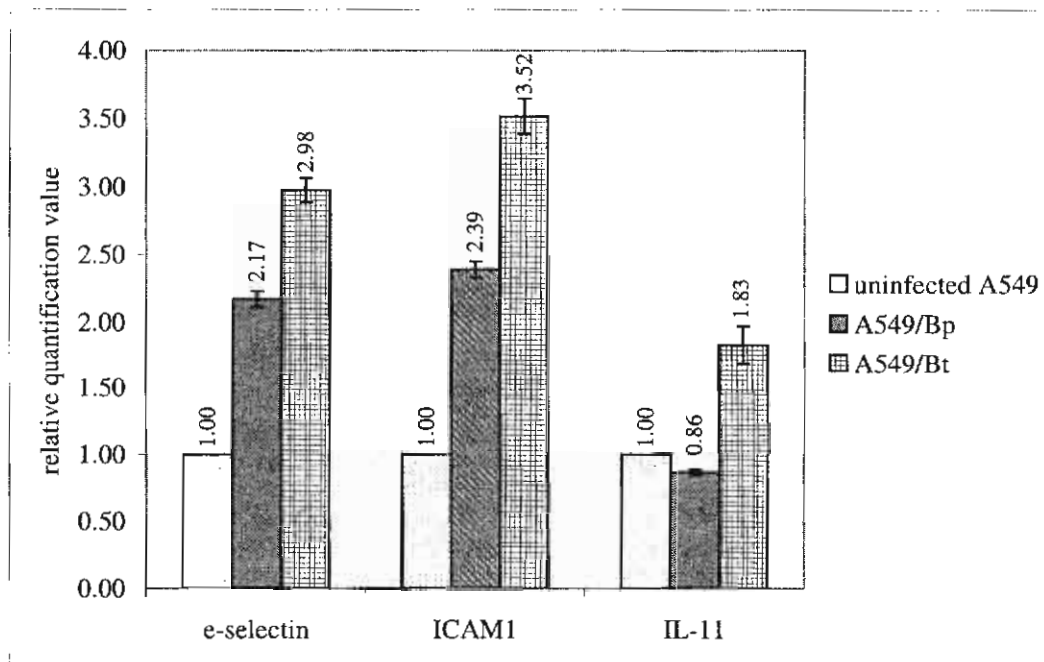
รูปที่ 4 แสดงความเข้มของ PCR product ของยีน *bcl2* ในเซลล์ A549 ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* (Bp) กับ เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* (Bt).



รูปที่ 5 แสดงความเข้มของ PCR product ของยีน ICAM1 ในเซลล์ A549 ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* (Bp) กับ เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* (Bt)



รูปที่ 6 แสดงความเข้มของ PCR product ของยีน LIF ในเซลล์ A549 ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* (Bp) กับ เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* (Bt).



รูปที่ 7 แผนภูมิแท่งแสดงค่า relative quantitation ของ mRNA level ของยีน E-selectin, ICAM1 และ IL-11 ในเซลล์ A549 ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* (Bp) กับ เซลล์ที่ติดเชื้อ *B. thailandensis* (Bt) โดยใช้เซลล์ปกติ (Uninfected A549) เป็นตัวอ้างอิง

ในขณะที่เรากำลังทำการ validate ยีนเหล่านี้ นั้น อาจารย์ดวงจิต กนิษฐานนท์ ของภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เริ่มเกิดสนใจที่จะเข้าร่วมงานวิจัยกับเรา และในขณะเดียวกันก็มีนักศึกษาระดับปริญญาเอกอีกคนคือ น.ส. ปฎิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์ มีสนใจที่จะทำในเรื่องนี้ต่อ ดังนั้น อาจารย์ดวงจิต จึงได้ขอทุนสนับสนุนงานวิจัยจากทุนพัฒนาการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เรื่อง “Differential gene expression profiles of lung epithelial cells exposed to *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*” โดยจะนำเอาผลของ microarray จากโครงการวิจัยของเราไปสานต่อ ซึ่งตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยย่อยเรื่องนี้ และของโครงการหลักของเรา

ในด้านของการวิจัยที่ใช้ primary human macrophage จากคนปกติและผู้ป่วย เพื่อศึกษา differential gene profile โดยการใช้ macroarray analysis นั้น เราได้สรุปปัญหาไว้ให้ทราบเป็นระยะๆ แล้วในรายงานความก้าวหน้าในหลายๆ ครั้งที่ผ่านมา ซึ่งพอจะสรุปได้ว่า เราไม่สามารถเตรียมปริมาณของ MØ จาก donor ในครั้งใดครั้งหนึ่งได้เพียงพอ และผลของงานวิจัยเบื้องต้นที่ได้จากการวิจัยและวิเคราะห์ differential gene expression ของคนปกติพอจะสรุปได้ดังนี้คือ นำเอา MØ ที่เตรียมได้จาก CD14-affinity column มาเลี้ยงไว้ 3-5 วัน แล้วจึงนำมา infected ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ที่ MOI 2:1 เป็นเวลา 4 ชม. และ 16 ชม. แล้วจึงนำเซลล์มาทำให้แตกออกเพื่อแยก total RNA ก่อน แล้วจึงนำไปแยก mRNA หลังจากนั้นนำ mRNA ที่ได้ไปทำ reverse transcribe เพื่อเตรียม cDNA สำหรับนำไปทำ macroarray ต่อไป ซึ่งผลของ macroarray analysis พอจะสรุปกว้างๆ ได้ดังนี้คือในช่วงต้นของการตอบสนอง (4 ชม.หลังจาก infection) มียีนหลายยีนซึ่งดูเหมือนจะถูกกดโดยเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ในเวลาเดียวกัน มียีนหลายยีนอื่นๆ ของ MØ ที่ถูก infected ด้วยเชื้อ *B. thailandensis* ถูก activated เมื่อเปรียบเทียบกับ MØ ที่ไม่ได้รับเชื้อ แต่เมื่อเราวิเคราะห์ยีนของ MØ ณ เวลา 16 ชม. หลังจากได้รับเชื้อ ปรากฏว่ายีนของ MØ ที่ถูก infected ด้วย *B. pseudomallei* จะได้รับการกระตุ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่ยีนของ *B. thailandensis*-infected MØ มีทั้งที่ถูกกระตุ้นและถูกกดเมื่อเทียบกับ MØ ที่ไม่ได้รับเชื้อ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 Differential gene expression in *B. pseudomallei*-infected and *B. thailandensis*-infected primary human macrophages

	Time after infection	Gene profile*
<i>B. pseudomallei</i> -infected	4 hr	79/91 down regulated (e.g., IL-1 , IL-4, IL-1R2
	16 hr	64/64 up regulated (e.g., IL-7, IL-9, IL-10, IL-15, IL-2R)
<i>B. thailandensis</i> -infected	4 hr	30/38 upregulated (eg., IFN- γ , G-CSF, GM-CSF and IL-4)
	16 hr	24/31 upregulated (eg., MCP-1)

* เมื่อเปรียบเทียบกับยีนของ uninfected MØ

ผลเบื้องต้นที่ได้นั้น ดูจะสอดคล้องกับผลที่ได้เมื่อเราศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดใน primary human macrophage ที่สรุปอยู่ในโครงการวิจัยย่อยที่ 1 และสอดคล้องกับผลของการวิจัยใน mouse macrophage cell line ที่กลุ่มวิจัยของเราเคยตีพิมพ์ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (14) ณ จุดนี้เรากำลังเตรียมแผนการที่จะ validate ผลที่ได้จาก macroarray analysis ที่ได้สรุปเอาไว้ในตารางที่ 4 โดยในขั้นต้นจะทำได้โดยใช้ RT-PCR แล้ว จะตามด้วยการหาตัวเลขที่แน่นอนต่อไปโดยใช้ real time PCR แผนการดังกล่าวจะทำต่อไปโดยใช้งบประมาณวิจัยจากโครงการวิจัยอื่นที่กลุ่มวิจัยของเรามีอยู่ในปัจจุบัน

ตามที่ได้ระบุไว้ในรายงานความก้าวหน้าครั้งก่อนๆ แล้วว่า เนื่องจากมีข้อจำกัดทางด้านเทคนิค (เช่น ปริมาณของเลือดที่เจาะแต่ละครั้ง) เราไม่สามารถเตรียม macrophage จากผู้ป่วยในปริมาณมากพอที่จะนำมาทำ macroarray analysis ได้ เราจึงยกเลิกแผนการดังกล่าว อย่างไรก็ตามในขณะเดียวกัน พญ.ดร. สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ จากมหาวิทยาลัยนเรศวร เริ่มสนใจและต้องการที่จะเข้าร่วมกลุ่มวิจัย และได้ขอทุนวิจัยพัฒนานักวิจัย สกว. โดยมี ศ.ดร. สติชัย สิริสิงห ทำหน้าที่เป็นนักวิจัยที่ปรึกษา จากผลของงานวิจัยของกลุ่มอื่นๆ (16, 17) และการวิเคราะห์ผลจาก array ของเราเอง ซึ่งนำว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยเบาหวานซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงกลุ่มหนึ่ง น่าจะต่างไปจากในคนปกติ ดังนั้น จึงมีการวิจัยเปรียบเทียบการสร้าง interleukin-17 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ และเบาหวานเพราะ IL-17 เริ่มเข้ามามีบทบาทในด้านของการควบคุมการอักเสบในเนื้อเยื่อ (21) ซึ่งในขณะเขียนรายงานนี้ก็ได้อผลเบื้องต้นเป็นที่น่าสนใจ และในขณะนี้อยู่ในขั้นตอนนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อเตรียมเขียนเป็นบทความสั้นๆ ส่งพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติต่อไป (publication no. 20)

ดังนั้น พอจะสรุปได้ว่า เราประสบผลสำเร็จจากโครงการวิจัยย่อยเรื่องนี้ ในการที่เราใช้ผลวิจัยที่ได้เป็นข้อมูลนำร่อง สำหรับทำวิจัยต่อในขั้นต่อไป และใช้เป็นฐานข้อมูลในการขอทุนวิจัยจากแหล่งทุนอื่น สำหรับโครงการย่อยเรื่องนี้ แม้ว่าเราใช้งบประมาณค่อนข้างสูง และทางกลุ่มไม่ได้หวังไว้แต่แรกว่าจะต้องได้ผลงานวิจัยที่สมบูรณ์พอสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ การวิจัยในโครงการวิจัยย่อยนี้ มีความจำเป็นที่จะต้องทำ เนื่องจากมันเป็นการเปิดประตูใหม่ของงานวิจัยเกี่ยวกับโรคเมลิออยโดสิส และจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่มีงานตีพิมพ์ที่สมบูรณ์จากนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ เลย อย่างไรก็ตาม เราได้ทราบว่าแนวทางวิจัยที่กล่าวถึงเริ่มเป็นที่น่าสนใจและกำลังมีการนำไปเริ่มวิจัยกันบ้างแล้วโดยนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ที่มีทั้งประสบการณ์และเงินงบประมาณสูงกว่ากลุ่มของเรา

โครงการวิจัยย่อยที่ 5: การพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

นักวิจัยหลัก:	ศ.ดร. สติติย์ สิริสิงห นาง นริศรา จันทราทิติย์ รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน รศ. ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์ รศ.ดร. รศนา วงศ์รัตนชีวิน
ระยะเวลา:	2 ปี
งบประมาณ (วัสดุ):	200,000 บาท
ผลงานตีพิมพ์	2 เรื่อง (publication no. 13 และ 14)

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยย่อยเรื่องนี้คือการพัฒนา “rapid diagnosis เพื่อวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส” โดยมุ่งเน้นไปในการใช้เทคนิค immunochromatography และต้องเป็นวิธีที่ใช้ได้กับแหล่งของโรคระบาดในประเทศอื่นด้วยซึ่งแหล่งโรคที่สำคัญรองจากประเทศไทยคือประเทศออสเตรเลีย ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะพยายามพัฒนาวิธีการดังกล่าวแล้ว เรายังต้อง characterize เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจากประเทศต่างๆ เช่น ออสเตรเลีย ลาว จีน มาเลเซีย เป็นต้น

ขั้นตอนของการวิจัยนั้น เราเริ่ม characterize เชื้อต่างๆ ที่ได้มาจากประเทศต่างๆ ที่เรามีอยู่ในคลังเชื้อของเรา และเชื้อที่ได้รับเพิ่มเติมจากประเทศออสเตรเลีย ดังที่ได้เคยแจ้งรายละเอียดเป็นระยะๆ ไว้ใน รายงานความก้าวหน้าก่อนหน้านี้นี้แล้ว ซึ่งพอจะสรุปได้ดังต่อไปนี้คือ เราได้ศึกษาคุณสมบัติของ lipopolysaccharide โดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting พร้อมทั้งศึกษา gene variation โดยวิธี ribotyping และ pulse-field gel electrophoresis ของเชื้อกว่า 1,000 สายพันธุ์ที่แยกทั้งจากผู้ป่วยสัตว์ที่เป็นโรค และจากเชื้อที่พบในดิน ผลของการทำ ribotyping และ PFGE นั้น ไม่มีอะไรที่เด่นชัดว่ามีอะไรที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ แต่สิ่งที่น่าสนใจคือคุณสมบัติของ LPS ของสายพันธุ์เหล่านี้ ซึ่งจากการศึกษา เราสามารถแยก LPS ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ออกเป็น 3 ชนิด คือ Ladder type A กับ Ladder type B ซึ่งทั้ง 2 ชนิด เป็น smooth LPS ซึ่งมี O-polysaccharide และ LPS ชนิดที่ไม่มี ladder และน่าจะเข้าข่ายของ rough LPS ซึ่งไม่มี O-polysaccharide จากการศึกษาทั้งหมดนั้น LPS มากกว่า 96% จะเป็น smooth type A ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่พบคือ *B. pseudomallei* จากประเทศออสเตรเลีย มี LPS แบบ smooth type B มากกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย ความหลากหลายของ LPS เกือบทั้งหมดจะพบได้ในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย และเกือบจะไม่พบเลยจากเชื้อที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติเลย นอกจากนี้โอกาสที่พบ smooth type B นั้นมีมากในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยที่เป็นโรคซ้ำๆ กัน (relapse) นอกจากนี้เรายังมีเชื้อในคลังเชื้อของเรา ที่ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคมารแล้ว

มากกว่า 1 ครั้ง และนำเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยคนเดียวกันแต่ต่างวาระกันนี้มาศึกษาเปรียบเทียบ และจากข้อมูลที่รวบรวมได้ให้เห็นว่า LPS heterogeneity ที่พบในผู้ป่วยนั้นมี phenotypic variation และมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็น host-induced และอาจสัมพันธ์กับการอยู่รอดในผู้ป่วยได้เป็นเวลานานๆ การมี smooth type B นั้นอาจมีประโยชน์กับตัวมันเองก็ได้ ข้อเสนอพื้นฐานดังกล่าวนี้ยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อความชัดเจน และกลุ่มวิจัยของเราก็มีการวางแผนสำหรับงานวิจัยขั้นต่อไป และการวิจัยดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยของนักวิจัยในกลุ่มเราร่วมกับนักวิจัยทางคลินิก โครงการวิจัยดังกล่าวได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากกลุ่มวิจัยของ Wellcome Research Unit ที่มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์วิจัยเมลิออยโดสิสของมหาวิทยาลัย และงบประมาณในส่วนที่ยังขาดอยู่กำลังอยู่ในขั้นตอนของการขอการสนับสนุนต่างๆ สกว. ต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวกับ characterization ของเชื้อที่ได้ทำสำเร็จไปแล้วในส่วนนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนของการตีพิมพ์ (in press) ในวารสาร American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (publication no. 14)

ในด้านของการพัฒนาทำ rapid diagnosis โดยการนำเทคนิคของ immunochromatography มาใช้นั้น ในขณะที่เขียนโครงการวิจัยนี้ กลุ่มวิจัยของเราเองยังไม่มีประสบการณ์ทางด้านนี้เลย แต่ก็ได้พยายามพัฒนาไปที่ละเล็กละน้อย ซึ่งก็ยังคงผลในด้านของความไว (sensitivity) ของการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเอง หรือตรวจหาการตอบสนอง (antibody) ได้ไม่ดีเท่าที่ควร เราได้เคยนำเรื่องดังกล่าวไปปรึกษากับ .ดร. กวี รัตนบรรณางกูร ซึ่งมีประสบการณ์มากกว่าเรา และได้รับข้อเสนอแนะเพิ่มเติมพร้อมกับรับว่าจะช่วยพัฒนาให้ เมื่ออาจารย์กวีเองทำกับระบบอื่นได้สมบูรณ์แล้ว อย่างไรก็ตามในช่วงระยะเวลาต่อไป ก็ได้พบว่ามียุทธศาสตร์จากประเทศออสเตรเลียได้ใช้เทคนิคนี้และได้ทดลองออกมาใช้ทั้งในรูปแบบของ field trial โดยใช้ prototype immunochromatographic test kit ทำโดย PanBio Pty., Ltd. ในประเทศออสเตรเลีย และทดสอบโดยกลุ่มนักวิจัยของประเทศออสเตรเลียเอง (18) และที่ประเทศมาเลเซีย (19) และประเทศไทย (20) โดยเป็นการทดสอบหาทั้ง IgG และ IgM antibodies ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* แต่ผลขั้นต้นที่ได้รายงานไว้ยังไม่ดีเท่าที่ควร เพราะยังมีความไวไม่เพียงพอและไม่เหมาะสมที่จะนำไปวินิจฉัยโรคใน endemic area และหากจะต้องนำไปใช้จริงจำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อไป นอกจากนี้ในระหว่างที่เรายังมีความคิดเกี่ยวกับเรื่องนี้ กลุ่มวิจัยของเราเองก็ได้ปรึกษากับหน่วยงานของ สวทช. เพื่อดูความเป็นไปได้ที่จะทำการผลิตและวิธีการตลาดอย่างไร เมื่อเราได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี แต่ก็ได้ข้อแนะนำว่าการจะทำออกเป็นแบบอุตสาหกรรมจริงๆ คงลำบาก เพราะตลาดของการใช้ kit ดังกล่าวยังค่อนข้างจะแคบ ซึ่งความเห็นดังกล่าวก็ดูเหมือนจะตรงกับความเห็นของ ศ.ดร. นพ. สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล (คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล) โดยที่อาจารย์เองมีประสบการณ์ในการตลาดเกี่ยวกับการตลาดของ test kit อื่นๆ ที่บริษัทของอาจารย์ผลิตขายอยู่

เมื่อมาถึงจุดนี้ เราจึงต้องได้หยุดแผนการนำเอาเทคนิคนี้มาพัฒนาเพื่อทำให้เป็น rapid diagnostic kit ต่อไป แต่เราได้มองกลับมาถึงวิธีที่ทางกลุ่มวิจัยของเราได้ทำสำเร็จมาแล้วเป็นอย่างดี คือการนำเอา hemoculture มาตรวจสอบโดยใช้ monoclonal antibody-based latex agglutination (22) ในการศึกษาปัจจุบันเราได้นำเอา clones ของ MAb เหล่านี้ ไปให้กับนักวิจัยของศูนย์วิจัยโรค เมลียอยโดสิสเพื่อนำไปพัฒนาเพิ่มเติม เพื่อที่จะให้มีความไวสูงขึ้นพอที่จะตัดเวลาของการตรวจให้สั้นลงไปอีกคือจากประมาณ 10-12 ชม. ลงไปให้เหลือไม่เกิน 5 ชม. นอกจากนี้กลุ่มวิจัยของศูนย์ยังมีแผนการที่จะใช้ phage display technology มาเพื่อเตรียม MAb เพื่อที่จะทำให้การเก็บสตัวอย่างและการเตรียมแอนติบอดีง่ายขึ้นและถูกลงไป โครงการดังกล่าวจะทำงานร่วมกับ ผศ.ดร. ชัชชัย ตระยาภิวัฒนา จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งเป็นผู้ที่มีประสบการณ์มากเกี่ยวกับเทคนิคนี้ ปัจจุบันอยู่ในขั้นตอนของการเขียนโครงการเพื่อขอทุนสนับสนุนร่วมกันจากหน่วยงานอื่นต่อไป อย่างไรก็ตามในขณะที่กำลังเขียนโครงการอยู่นี้ ทางกลุ่มวิจัยมีผลเบื้องต้นแล้วว่าน่าที่จะมีความเป็นไปได้สูง

เอกสารอ้างอิง

1. Chen AC and Currie BJ. Clin Microb Rev 18: 383-416, 2005.
2. Leelarasamu A. Curr Opin Infect Dis 17: 131-136, 2004.
3. White NJ. Lancet 361: 1715-1722, 2003.
4. 4th World Melioidosis Congress. 16-18 September 2004, Singapore.
5. Chierakul W, Winothai W, Wattanawaitunechai C et al. Clin Infect Dis 41: 982-990, 2005.
6. Gun YH. J Infect Dis 192: 1845-1850, 2005.
7. Holden MT, Tidball RW, Peacock ST et al. PNAS (USA) 101: 14240-14245, 2004.
8. NIAID/OD International conference on Burkholderia Pathogenesis: Approaches and Opportunities for Research on Glanders and Melioidosis. 2-3 August 2004, Bethesda, MD.
9. Corinti S, Albanesi C, la Sala A et al. J Immunol 166: 4312-4318, 2001.
10. Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Keshpichayawattana W et al. Clin Exp. Immunol 122: 324-329, 2000.
11. Kespichayawattana W, Intachote P, Utaisincharoen P et al. Microb Pathog 36: 287-292, 2004.
12. Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W et al. Microbiol Immunol 45: 307-313, 2001.
13. Gordon MA, Jack DL, Dockrell DH et al. Infect Immun 73: 3445-3452, 2005.
14. Kespichayawattana W, Rattanachetkul S, Wanun T et al. Infect Immun 68: 5377-5384, 2000.
15. Taweechaisupapong S, Kaewpa C, Arunyanart C et al. Microb Pathog 39: 77-85, 2005.
16. Joshi N, Caputo SM, Weitekamp MR, Karchmer AW. N Engl J Med 341: 1906-1912, 1999.
17. Woods DE, Jones AL, Hill PJ. Hill PJ. Infect Immun 61: 4045-4050, 1993.
18. Chuah SC, Gilmore G, Norton RE. Pathology 37: 169-171, 2005.
19. Cuzzubbo AJ, Chenthamarakshan V, Vadivelu J et al. J Clin Microbiol 38: 1670-1671, 2000.
20. Cheng AC, Peacock SJ, Limmathurotsakul D et al. Trans R Soc Trop Med Hyg 100: 64-67, 2005.
21. Park H, Li Z, Yang XO et al. Nat Immunol 6: 1133-1141, 2005.
22. Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V et al. J Med Microbiol 49: 1075-1078, 2000.

ภาคผนวก

ชื่อและสถาบันของนักวิจัยที่ทำงานร่วมกันในเครือข่ายฯ

ชื่อ	สถาบัน	สถานภาพ
1. ศ.เกียรติคุณ ดร. สติชัย สิริสิงห	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	หัวหน้าโครงการ
2. ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
3. รศ.ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
4. รศ.ดร. ศุภธิดา อุบล	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
5. รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประจักษ์กุล	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
6. รศ.ดร. สุนัย กอร์ปศรีเศรษฐ์	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
7. ดร. สาธิต พิษยางกูร	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS)	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
8. รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ผู้ร่วมโครงการตั้งแต่เริ่มขอทุน
9. รศ.ดร. รศนา วงศ์รัตนชีวิน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	เข้าร่วมโครงการหลังจากได้รับทุนอุดหนุนและมีทุนวิจัยเองจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
10. รศ.ดร. ปรีชา หอมจำปา	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	เข้าร่วมโครงการโดยทำวิจัยร่วมกับ รศ.ดร.สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน
11. ดร. นพ. ภัทรชัย กิรติสิน	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	เข้าร่วมโครงการหลังจากได้รับทุนอุดหนุน และมีทุนวิจัยจาก สกว. เรื่อง “การพิสูจน์หายีน <i>bps R</i> และการสืบบทบาทของยีนในระบบ Quorum sensing ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ” ของตนเอง
12. รศ.นพ. มงคล คุณากร	คณะแพทยศาสตร์ ร.พ.รามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล	เข้าร่วมโครงการโดยมีงานวิจัยร่วมกับ รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประจักษ์กุล

ชื่อ	สถาบัน	สถานภาพ
13. ดร.พญ. ดวงจิต กนิษฐานนท์	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	เข้าร่วมโครงการหลังจากได้รับทุนอุดหนุน และในปัจจุบันได้รับทุนวิจัยจากทุนพัฒนาการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เรื่อง Differential gene expression profiles of lung epithelial cells exposed to <i>Burkholderia pseudomallei</i> and <i>Burkholderia thailandensis</i> โดยมี รศ.ดร. ศันสนีย์ ไซโยจิน และ ศ.ดร. สติฉัย สิริสิงห์ เป็นผู้ร่วมโครงการ
14. รศ.ทพญ. ดร. สุวิมล ทวีชัยสุภาพงษ์	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	เข้าร่วมโครงการภายหลังและมีทุนวิจัยของตนเองคือ ทุนพัฒนานักวิจัยของ สกว. เรื่อง “The relationship between biofilm formation and virulence in <i>Burkholderia pseudomallei</i> and <i>Burkholderia thailandensis</i> ” โดยมี ศ.ดร. สติฉัย สิริสิงห์ เป็นนักวิจัยที่ปรึกษา
15. พญ.ดร. สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ	สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร	เข้าร่วมโครงการภายหลังและได้รับทุนวิจัยพัฒนานักวิจัยของ สกว. เรื่อง “การแสดงออกของ interleukin-17 ของ T cell ต่อการติดเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> โดยมี ศ.ดร. สติฉัย สิริสิงห์ เป็นนักวิจัยที่ปรึกษา
16. ดร. อัญญา เล่งเวลาสติฉัย	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	เข้าร่วมโครงการภายหลังและได้รับทุนวิจัยพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (ทบวงฯ- สกว.) เรื่อง “หน้าที่ของไมโตคอนเดรียจากเซลล์ที่ติดเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> โดยมี ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ เป็นนักวิจัยที่ปรึกษา

ชื่อ	สถาบัน	สถานภาพ
17. นางนริศรา จันทราทิตย์	Wellcome Research Unit คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล	เข้าร่วมโครงการหลังจากได้รับทุนวิจัย และในปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาเอก (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน) โดยทำวิทยานิพนธ์เรื่อง “Phenotypic plasticity of <i>Burkholderia pseudomallei</i> ” ซึ่งมี พญ. ศศิธร ผู้กฤติยาคามี (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน) เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา
18. นางรุ่งลาวรรณ เซวงเกียรติกุล	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ร่วมวิจัยในโครงการวิจัยใหม่ “การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ”
19. นสพ. นริศร นางาม	คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	เข้าร่วมวิจัยในฐานะนักศึกษาระดับปริญญาเอก (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน) และมีทุนวิจัยส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ของ สกว. เรื่อง “การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเมลิออยโดสิสโดยใช้เทคนิค T7 phage display” และมี ผศ.ดร. พงศ์ราม รามสูตร (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน) เป็นอาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์
20. รศ. สพญ.ดร. นันทริกา ชันช้อย	คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เข้าร่วมโครงการภายหลังโดยทำหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของ สพญ. จริยา สุदानนท์ไพบุลย์ ซึ่งทำวิทยานิพนธ์เรื่อง “การพัฒนาและประเมินเทคนิค indirect ELISA เพื่อวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสในโลมา” และเป็นการวิจัยร่วมกับ Dr. R.E. Kinoshita ของ Ocean Park ที่ Hong Kong, China
21. นพ. จารึก เจริญทรัพย์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	กำลังศึกษาระดับปริญญาเอก ทุน คปก. และทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การดูแลของ ศ.ดร. สติชัย สิริสิงห

ชื่อ	สถาบัน	สถานภาพ
22. น.ส. จันทิภา วิกฤษพัฒนา	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	กำลังศึกษาระดับปริญญาเอก และทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การดูแลของ ศ.ดร. สติติย์ สิริสิงห
23. น.ส. ปฎิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	กำลังศึกษาระดับปริญญาเอก และทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การดูแลของ ศ.ดร. สติติย์ สิริสิงห และ รศ.ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์
24. น.ส. พีรยา เอกจริยวัฒน์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	กำลังศึกษาระดับปริญญาโท และทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การดูแลของ ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ
25. น.ส. ทิพย์มาศ ช่วยเกิด	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	กำลังศึกษาระดับปริญญาโท และทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การดูแลของ ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ
26. น.ส. สุทธิสา พุดลา	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	กำลังศึกษาระดับปริญญาโท และทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การดูแลของ ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ
27. น.ส. สุธีรา อาจเจริญ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	นักวิจัยวุฒิปริญญาโท ซึ่งจ้างด้วยงบประมาณของโครงการวิจัย
28. น.ส. กรแก้ว ลิ้มโพธิ์สุวรรณ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	นักวิจัยวุฒิปริญญาตรี ซึ่งจ้างด้วยงบประมาณวิจัย สกว. ของ ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ

นอกจากการรายนามนักวิจัยในระดับต่างๆ ตามที่ระบุไว้ในตารางนั้นแล้ว ยังมีนักศึกษาทั้งระดับปริญญาเอกและโท ที่จบการศึกษาแล้ว หรือกำลังจะจบและกำลังทำวิทยานิพนธ์ภายใต้การควบคุมดูแลของนักวิจัยของโครงการคือ รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, รศ.ดร. สุณีย์ กอร์ปศรีเศรษฐ์ รศ.ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล และดร.อิษฎา เร่งเวหาสถิตย และงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ทั้งหมดเกี่ยวกับเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งสิ้น รวมนักศึกษาในกลุ่มนี้ประมาณ 12-15 คน นอกจากนี้นักศึกษาระดับปริญญาตรีอีกหลายคนที่ทำ Senior project เกี่ยวกับเรื่องนี้ภายใต้การดูแลของ ดร. อิษฎา เสงเวหาสถิตย

นอกเหนือจากกลุ่มนักวิจัยและนักศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดแล้ว กลุ่มวิจัยของเรายังมีนักวิจัยในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร และออสเตรเลีย ที่ทำงานร่วมกับกลุ่มของเรา และเมื่อรวมแล้ว เรามีกลุ่มนักวิจัยที่ร่วมงานกันในรูปแบบต่างๆ กัน ทั้งสิ้นมากกว่า 40 คนจากมากกว่า 10 สถาบัน

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (Original research articles)

1. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichayangkul S, Sirisinha S. CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). Clin Exp Immunol 128: 467-473, 2002 (impact factor = 2.318).
2. Utaisincharoen P, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichayangkul S, Sirisinha S. CpG ODN enhances uptake of bacteria by mouse macrophages. Clin Exp Immunol 132: 70-75, 2003 (impact factor = 2.518).
3. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Involvement of beta interferon in enhancing inducible nitric oxide synthase production and antimicrobial activity of *Burkholderia pseudomallei*-infected macrophages. Infect Immun 71: 3053-3057, 2003 (impact factor = 4.033).
4. Subsin B, Thomas MS, Katzenmeier G, Shaw JG, Tungpradabkul S, Kunakorn M. Role of stationary growth phase sigma factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in response to physiological stress conditions. J Bacteriol 185: 7008-7014, 2003 (Impact factor = 4.146).
5. Kespichayawattana W, Intachote P, Utaisincharoen P, Sirisinha S. Virulent *Burkholderia pseudomallei* is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to cultured human epithelial cells. Microb Pathog 36: 287-292, 2004 (Impact factor = 2.047).
6. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Induction of iNOS expression and antimicrobial activity by interferon (IFN)-beta is distinct from IFN-γ in *Burkholderia pseudomallei* – infected mouse macrophages. Clin Exp Immunol 136: 277-283, 2004 (Impact factor = 2.518).
7. Wongratanacheewin S, Kespichayawattana W, Intachote P, Pichayangkul S, Sermswan RW, Krieg AM, Sirisinha S. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide confers protection in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun 72: 4494-4502, 2004. (Impact factor = 4.033)
8. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell lines A549. Clin Exp Immunol 138: 61-65, 2004 (Impact factor = 2.5186).
9. Utaisincharoen P, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* invasion and activation of epithelial cells requires activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Microb Pathog 38: 107-112, 2005 (Impact factor = 2.047).
10. Taweechaisupapong S, Kaewpa C, Arunyanart C, Kanla P, Homchampa P, Sirisinha S. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation. Microb Pathog 39: 77-85, 2005 (Impact factor = 2.047).

11. Korbsrisate S, Vanaporn M, Kerdasuk P, Kespichayawattana W, Vattanaviboon P, Kiatpapan P, Lertmemongkolchai G. The *Burkholderia pseudomalle* RPOE (AlgU) operon is involved in environmental stress tolerance and ibofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.* 252: 243–249, 2005. (Impact factor = 1.840).
12. Ekchariyawat P, Pudla S, Limposuwan K, Arjcharoen S, Sirisinha S, Utaisinchaoen P. *Burkholderia pseudomalle*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) and cytokine-inducible Src homology 2-containing protein (CIS) in murine macrophage: a possible mechanism for suppression of response to gamma interferon stimulation. *Infect Immun* 73: 7332–7339, 2005. (Impact factor = 4.033).
13. Jesudason MV, Balaji V, Sirisinha S, Sridharan G. Rapid identification of *Burkholderia pseudomalle* in blood culture supernatants by a coagglutination assay. *Clin Microbiol Infect* 11: 930–933, 2005 (Impact factor = 2.361).
14. Anuntagool N, Wuthiekanun V, White NJ, Currie BJ, Sermswan RW, Wongratanacheewin S, Taweekaisupapong S, Chaiyaroj SC, Sirisinha S. Lipopolysaccharide heterogeneity among *Burkholderia pseudomalle* from different geographical and clinical origins. *Am J Trop Med Hyg* 74: 348–352 (2006) (Impact factor = 2.013).
15. Utaisinchaoen P, Arjcharoen S, Limposuwan K, Tungpradabkul S, Sirisinha S. *Burkholderia pseudomalle* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). *Microb Pathog March*, 2006 (Impact factor = 2.047).
16. Lumjiaktase P, Diggle SP, Tungpradabkul S, Loprasert S, Daykin M, Kunakorn M. Quorum sensing regulates the oxidative stress response via DpsA in *Burkholderia pseudomalle*. (submitted to Microbiology) (Impact factor = 0.539).
17. Jangiam W, Loprasert S, Tungpradabkul S. Regulation of catalase activity, an oxidative stress, by RpoS in *Burkholderia pseudomallei* (submitted to Microb Pathog).
18. Wongtrakoongate P, Boonrak J, Chaijan S, Kamchonwongpaisan S, Tungpradabkul S. *Burkholderia pseudomallei* intracellular proteome reference map: An application for identification of virulent factors compared with *Burkholderia thailandensis* (submitted to J Microbiol Methods).
19. Korbsrisate S, Suparak S, Damnin S, Chumdee J, Kespichayawattana W, Lengwehasatit I, Tomaras AP, Vasil ML. Characterization of two distinct phospholipases C from *Burkholderia pseudomallei* (submitted).
20. Pongcharoen S, Niumsup P, Sanguangsermsri D, Chanchan P, Jienmongkol P, Banchuin N, Sirisinha S. Reduced interleukin-17 expression of *Burkholderia pseudomalle*-infected peripheral blood mononuclear cells from diabetic patients (submitted).

บทคัดย่อของงานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมนานาชาติทั้งแบบ

Oral และ poster presentation

1. Sirisinha S, Wongratanaheewin S, Kespichayawattana W. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide confers protection against acute fatal septicemia in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. 12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, 18-23 July 2004.
2. Utaisincharoen P, Sirisinha S. Induction of iNOS expression and antimicrobial activity by IFN- β is distinct from IFN- γ in *Burkholderia pseudomallei* – infected mouse macrophages. 12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, 18-23 July 2004.
3. Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* modulates proinflammatory cytokine and antimicrobial responses of macrophages. NIAID/ORD International Conference on *Burkholderia* Pathogenesis: Approaches and Opportunities for Research on Glanders and Melioidosis. NIH, Bethesda, USA. 2-3 August 2004.
4. Sirisinha S. Innate immunity: general review with emphasis on its interaction with gram-negative bacteria. 2nd Academic Sessions, Allergy and immunology Society of Sri Lanka, Colombo, Sri Lanka, 18-19 November 2004.
5. Sirisinha S. *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*: an agent endemic (in the tropics) and with potential for bioterrorism. Sri Lanka Medical Association, Colombo, Sri Lanka, 18-20 November, 2004.
6. Jesudason MV, Balaji V, Singhal PK, Sirisinha S, Sridharan G. Evaluation of rapid tests to detect *B. pseudomallei* in Blood culture broth supernatants. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16-18 September, 2004.
7. Utaisincharoen P, Sirisinha S. Inability of *Burkholderia pseudomallei* to stimulate IFN- γ production from mouse macrophages leads to the failure of transcription factors activation required for inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16-18 September, 2004.
8. Korbsrisate S, Kerdsuk P, Vanaporn M, Kespichayawattana W, Vattanaviboon P, Kiatpapan P and Lertmemongkolkhai G. The RPOE (ALGU) operon plays an important role in the survival of *Burkholderia pseudomallei* under stress. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16-18 September, 2004.
9. Suparak S, Vanaporn M, Damnin V, Ckumdee J, Lengwehasatit I, Vasil ML, Korbsrisate S. Characterization of two distinct phospholipase C genes in *Burkholderia pseudomallei* under stress. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16-18 September, 2004.

10. Sirisinha S, Wongratanacheewin S, Kespichayawattana W. Immunostimulatory CPG oligodeoxynucleotide confers protection against septicemic melioidosis in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
11. Manjai A, Tattawasart U, Wongratanacheewin S, Aranyanart C. Isolation and development of an epideriophage typing scheme for *Burkholderia pseudomallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
12. Manjai A, Tattawasart U, Wongratanacheewin S, Aranyanart C. Isolation and development of a bacteriophage typing scheme for *Burkholderia pseudomallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
13. Jangiam W, Tungpradabkul S. Effect of hydrogen peroxide, an oxidative stress, on RPOS expression and regulation in *Burkholderia pseudomallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
14. Soyluang S, Tungpradabkul S. Identification and functional analysis of quorum sensing-like genes in *Burkholderia thailandensis*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
15. Wongtrakongate P, Yasothornsrikul S, O'Connor DT, Tungpradabkul S. Identification of Sigma-S regulation in *Burkholderia pseudomallei* by proteomics. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
16. Nichayapun P, Tungpradabkul S. Annotation rhamnolipid operon in *Burkholderia pseudomallei* using computational analysis. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
17. Tunpiboonsak S, Tungpradabkul S. DNA-RFLP analysis of *waaf* gene for identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
18. Taweechaisupapong S, Arunyanart C, Kania P, Sirisinha S, Wongratanacheewin S. The relationship between biofilm formation and virulence of *Burkholderia pseudomallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
19. Pinmai K, Chareonsudjai S, Lulitanond V, Wongratanacheewin S, Hahnvajanawong C. The study of the relationship of biofilm and cell cytotoxicity of infected monocyte and epithelial cell with *Burkholderia pseudomallei*. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
20. Suparak S, Kespichayawattana W, Vattanaviboon P, Korbsrisate S. Construction of *Burkholderia pseudomallei* BIPB mutant. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.

21. Srilunchang M, Wongratanacheewin S, Proungvitaya T, Homchampa P. Construction and phenotypic characterization and AROC mutant of *Burkholderia pseudomallei* and its potential as a vaccine candidate. Oral/Poster presentation at the 4th World Melioidosis Congress. Singapore, 16–18 September, 2004.
22. Utaisincharoen P, Sirisinha P. *Burkholderia pseudomallei* stimulates interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line. Third Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia–Oceania. Hangzhou, China, 18–22 April 2005.
23. Sirisinha S, Utaisincharoen P. Evasion of innate immunity by a bacterial pathogen endemic in the FIMSA region. Third Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia–Oceania. Hanzhou, China, 18–22 April 2005.
24. Thotsaporn K, Tucker SJ, Tungpradabkul S. Contruction of inward rectifying potassium (KIR) mutant in *Burkholderia pseudomallei*. The 9th Asian Conference on Transcription (ACT-VIX). Taiwan, 12–14 December 2005.
25. Sriwattanarothai N, Wongtrakoongate P, Tungpradabkul S. The *Burkholderia pseudomallei* Sigma-S factor and quaorum sensing regulatory circuits. The 9th Asian Conference on Transcription (ACT-VIX). Taiwan, 12–14 December 2005.
26. Tunpiboonsak S, Tungpradabkul S. Characterization and functional analysis of poly phosphate kinase (PPK) gene in *Burkholderia pseudomallei*. The 9th Asian Conference on Transcription (ACT-VIX). Taiwan, 12–14 December 2005.
27. Jangiam W, Loprasert S, Tungpradabkul S. Regulation of catalase activity by RPOS in *Burkholderia pseudomallei*. The 9th Asian Conference on Transcription (ACT-VIX). Taiwan, 12–14 December 2005.
28. Jangiam W, Loprasert S, Tungpradabkul S. The role of rpoS for oxidative stress iin *Burkholderia pseudomallei*. BioMicro World-2005. The 1st International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Spain, March 2005, 984 pp.

บทคัดย่องานวิจัยที่น่าเสนอในการประชุมในประเทศ

1. Tungpradabkul S, Wongtrakoongate P, Boonrak J, Chaijin S, Kamchonwongpaisan S. Identification of *Burkholderia pseudomallei* virulent factors by proteomic profiles. Second Protein Research Network Symposium on “Proteins: Structure, Function, and Proteomics” Chulabhorn Research Institute, Bangkok 22–23 September 2005.
2. Boonrak J, Tungpradabkul S. Identification of differentially expression between the stationary phase of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* . Second Protein Research Network Symposium on “Proteins: Structure, Function, and Proteomics” Chulabhorn Research Institute, Bangkok, September 2005.

3. Wongtrakoongate P, Chaijin S, Kamchonwongpaisan S, Tungpradabkul S. *Burkholderia pseudomallei* intercellular proteome reference map identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Second Protein Research Network Symposium on "Proteins: Structure, Function, and Proteomics" Chulabhorn Research Institute, Bangkok, 22-23 September 2005.
4. Kittisak Thotsaporn, Stephen J. Tucker, Sumalee Tungpradabkul. Cloning and gene knock out of inward rectifying potassium (KIR) channels in *Burkholderia pseudomalle*. The 31st Congress on Science and Technology of Thailand (วทท. 31), October 2005.
5. Namkang Sriwattanaorathai, Sumalee Tungpradabkul. The relationship between sigma-S factor and quorum sensing regulatory system in *Burkholderia pseudomalle*. The 31st Congress on Science and Technology of Thailand (วทท. 31), October 2005.
6. Witawat Jangiam, Suvit Loprasert, Sumalee Tungpradabkul. Effect of Hydrogen Peroxide, and oxidative Stress, to *rpoS* Expression and Regulation of *katG*, *katE* and *dpsA* genes in *Burkholderia pseudomalle*. The 31st Congress on Science and Technology of Thailand (วทท. 31), October 2005.
7. Suda Tunpiboonsak, Sumalee Tungpradabkul. Characterization and functional analysis of PPK gene in *Burkholderia pseudomalle*. The 31st Congress on Science and Technology of Thailand (วทท. 31), October 2005.
8. Suda Tunpiboonsak, Sumalee Tungpradabkul. Cloning and expression of polyphosphate kinase gene (*ppk*) in *Burkholderia pseudomalle*. The 30th Congress on Science and Technology of Thailand (วทท. 30), October 2004.
9. Pinnara Rojvirat, Sumalee Tungpradabkul. Differentiation and polymorphic of WaaF gene in *Burkholderia pseudomalle* using PCR-RFLP technique. The 30th Congress on Science and Technology of Thailand (วทท. 30), October 2004.
10. Sirisinha S. Update on pathogenesis of melioidosis. ประชุมวิชาการครั้งที่ 21 ประจำปี 2548 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 11-14 ตุลาคม 2548.

ผลงานตีพิมพ์

เลขที่ 1-13	ตีพิมพ์แล้ว
เลขที่ 14	in press
เลขที่ 15	accepted
เลขที่ 16-18	submitted
เลขที่ 19, 20	in preparation

CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7)

P. UTAISINCHAROEN*, N. ANUNTAGOOL*, P. CHAISURIYA*, S. PICHYANGKUL† & S. SIRISINHA*‡
 *Laboratory of Immunology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, †Department of Immunology and Medicine, US Army Medical Component, AFRIMS, Bangkok, Thailand, and ‡Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

(Accepted for publication 20 February 2002)

SUMMARY

Synthetic CpG containing oligodeoxynucleotide (CpG ODN) is recognized for its ability to activate cells to produce several cytokines, such as IL-12 and TNF- α . In the present study we have demonstrated that CpG ODN 1826, known for its immunostimulatory activity in the mouse system could, by itself, induce nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) production from mouse macrophage cell line (RAW 264.7). Neutralizing antibody against TNF- α was not able to inhibit NO or iNOS production from the CpG ODN 1826-activated macrophages, suggesting that although the TNF- α was also produced by CpG ODN-activated macrophages, the production of iNOS was not mediated through TNF- α . Although both CpG ODN 1826 and lipopolysaccharide (LPS) were able to stimulate NO and iNOS production, the exposure time required for maximum production of NO and iNOS for the CpG ODN 1826-activated macrophages was significantly longer than those activated with LPS. These results were due probably to a delay of NF- κ B translocation, as indicated by the delay of I κ B α degradation. Moreover, the fact that chloroquine abolished NO and iNOS production from the cells treated with CpG ODN 1826 but not from those treated with LPS suggested that the induction of NO and iNOS production from the cells stimulated with CpG ODN (1826) also required endosomal maturation/acidification.

Keywords CpG ODN iNOS mouse macrophage nitric oxide

INTRODUCTION

Bacterial genomic DNA containing unmethylated cytosine followed by guanine (CpG ODN) is well recognized as an immunostimulator. It appears to function as one of the 'danger signals' to trigger innate immunity against infection as well as triggering a specific adaptive immune response [1]. For example, both bacterial CpG DNA and synthetic oligonucleotide containing unmethylated cytosine (CpG ODN) can similarly induce the production of proinflammatory cytokines, such as IL-6, IL-12 and TNF- α in both *in vitro* and *in vivo* conditions [2–5].

The molecular mechanism of CpG DNA or CpG ODN in immunostimulation is almost identical to that of the more classical inducers of innate immune system, i.e. lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PG) [6]. In fact, both the CpG DNA and CpG ODN, like LPS, can induce septic shock when injected into mice [3]. Toll-like receptor (TLR) is a critical receptor and signal transducer for both bacterial DNA and LPS. TLR4 has

been reported to play an important role in LPS signal transducer, while TLR9 is responsible for CpG ODN activation [7,8]. Moreover, endocytosis of TLR9 is a crucial step for signal transduction of CpG ODN [9,10]. Both TLR4 and TLR9 recruit MyD88 which subsequently activates p38 and c-Jun, resulting in activation of transcription factors such as AP-1 and NF- κ B [11–13]. However, the LPS could still induce NF- κ B and mitogen-activated protein kinase cascades in a MyD88-independent pathway, as MyD88-deficient cells could still respond to LPS but not to CpG DNA [14,15].

Among the mediators produced by LPS activated mouse macrophages, nitric oxide (NO) produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays a crucial role in innate immune response against bacterial infection [16]. However, unlike those treated with the LPS, the macrophages treated with the bacterial DNA by itself failed to produce NO or iNOS [5], but these products were observed only when the cells were first primed with IFN- γ [5,17,18]. Recent data also indicate that CpG DNA or CpG ODN could stimulate NO production, but only in the presence of a subthreshold concentration of LPS [18].

The specific CpG ODN 1826 (5' ICCATGACGTTCCCT GACGTT 3') used in the present study, is known to be an excel-

Correspondence: Pongsak Utaisinchaoen, Laboratory of Immunology, Chulabhorn Research Institute, Vipavadee Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand.

E-mail: pongsak@tubtim.cri.or.th

lent immunostimulator in the murine model, both *in vitro* and *in vivo* [19]. However, whether this specific CpG ODN alone can activate NO and iNOS production has not been illustrated. The data presented herein demonstrated that CpG ODN (1826) induces NO and iNOS production from mouse macrophages by a mechanism different from that induced by LPS.

MATERIALS AND METHODS

Oligodeoxynucleotides (ODN)

Nuclease-resistant phosphorothioate ODNs were kindly provided by A. M. Krieg (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA, USA). The sequences of the ODNs used are 1826 (5' TCCAT GACGTTCTGACGTT 3'), 1585 (5' GGGGTCAACGTTG AGGGGGG 3'), 2006 (5' TCGTCGTTTGTGCTGTTTG TCGTT 3'), and non-CpG containing ODN 1982 (5' TCCAGGA CTTCTCTCAGGTT 3'). *Escherichia coli* DNA (strain B) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) and was purified further by repeated extraction with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) or Triton X 114 and ethanol precipitation before made into single stranded by boiling for 10 min. Possible contamination with a trace amount of lipopolysaccharide (LPS) in these samples was determined by a *Limulus* amoebocyte lysate assay (LAL assay, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) and expressed as endotoxin units (EU) per ml. The lower limit for the detection of LPS in our laboratory was 0.03 EU/ml. An LPS reference prepared from *Salmonella typhimurium* (Sigma) had an activity of 4.35 ng/EU. All the ODNs and *E. coli* DNA used had endotoxic activity less than 0.075 EU/mg.

Cell line and culture condition

Mouse macrophage cell line (RAW 264.7) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). If not indicated otherwise, the cells were cultured in 24-well plates with 0.5 ml of Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA) at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere.

NO assay

The production of NO was determined by measuring the quantity of nitrite in the supernatant from the cells cultured under different conditions by the Griess method, using a standard curve constructed with nitrite ranging from 5 to 40 µM [20]. *E. coli* LPS (Sigma) at concentration of 10 ng/ml was used as a positive control. Under this condition, the sensitivity limit of the method was 5 µM of nitrite.

TNF-α assay

TNF-α activity was measured by a cytotoxic assay using mouse fibroblast cell line (L-929) [21]. In brief, the supernatant from activated macrophages was appropriately diluted before being added to the mouse fibroblast culture. After 18 h of incubation, the TNF-α-treated fibroblast cells were stained with crystal violet. Change in the absorbance at 540 nm was measured and converted to unit/ml of TNF based on a standard curve using murine TNF-α (Genzyme, Cambridge, MA, USA) as standard.

Immunoblotting for iNOS and IkBα detection

The production of iNOS and IkBα was determined by immunoblotting. Briefly, the mouse macrophages were lysed in

lysis buffer containing 62.5 mM Tris pH 6.8, 6 M urea, 10% glycerol, 2% SDS, 0.003% bromophenol blue and 5% 2-mercaptoethanol and followed by sonication on ice for 20 s. The lysates were electrophoresed on 8% polyacrylamide before transferring to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The membrane was blocked in 5% skim milk for 1 h before reacting overnight with rabbit polyclonal antibody to mouse iNOS or IkBα (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). The blots were then reacted with horseradish peroxidase-conjugated swine anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark). Protein bands were detected by enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Pierce, Rockford, IL, USA).

RESULTS

NO production from macrophages activated with CpG ODN

To determine NO production, the mouse macrophage (RAW 264.7) monolayer was treated with various concentrations of CpG ODN 1826. After 24 h, the supernatant was analysed for nitrite by Griess reaction. As shown in Fig. 1, NO was produced by the cells stimulated with CpG ODN 1826 at a concentration as low as 0.05 µg/ml, reaching a plateau production at 1 µg/ml. Conversely, the cells activated with non-CpG containing ODN (1982) which served as a negative control, were unable to produce a significant level of NO, even when used at a concentration as high as 10 µg/ml. Two other CpG ODNs, i.e. 1585 and 2006, and bacterial DNA were also analysed but none of them was able to stimulate NO production from these cells when tested under the same conditions (Fig. 2).

In order to rule out the possibility that NO production was due to LPS contamination in the sample, the macrophages were activated with CpG ODN 1826 in the presence of different con-

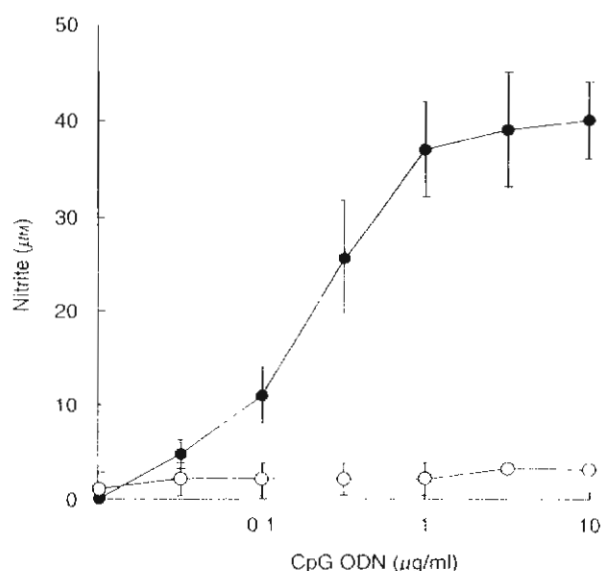


Fig. 1. NO production by mouse macrophages stimulated with CpG ODN. RAW 264.7 macrophages (1×10^6 cells/well) were incubated with different concentrations of CpG ODN 1826 (●) or 1982 (○) for 24 h. The supernatant was analysed for nitrite by Griess reaction. Data represent the mean and s.d. of three separate experiments, each carried out in triplicate.

centrations of polymyxin B. After 24 h, the supernatant was analysed for nitrite and the cells were subjected to immunoblotting using antibody against iNOS. Results presented in Fig. 3a showed that polymyxin B did not interfere with NO production from the cells activated with CpG ODN 1826. However, under a similar condition, this inhibitor completely abolished NO production from the cells stimulated with 10 ng/ml *E. coli* LPS. Similarly, polymyxin B at concentration of 10 µg/ml also abrogated iNOS expression completely from the macrophages stimulated with LPS but not with CpG ODN 1826 (Fig. 3b). Together, these results suggest that CpG ODN 1826 was able to stimulate NO and iNOS production and that such a response was not the result of LPS contamination.

Among the cytokines produced by CpG ODN-activated macrophages, TNF- α is known to be able to stimulate NO and iNOS production [16,22]. The production of TNF- α from the cells activated with CpG ODN 1826 [3] prompted us to investigate further whether NO and iNOS production from the cells treated with CpG ODN 1826 could possibly be mediated through the early TNF- α released. In this experiment, the macrophages were stimulated with CpG ODN 1826 in the presence or absence of neutralizing antibody against TNF- α , and the iNOS production was then measured. The results showed that this antibody was unable to prevent either the NO production (Fig. 4a) or iNOS expression (Fig. 4b). On the contrary, under the same conditions this amount of antibody could neutralize completely the TNF- α activity in the supernatant (Fig. 4c).

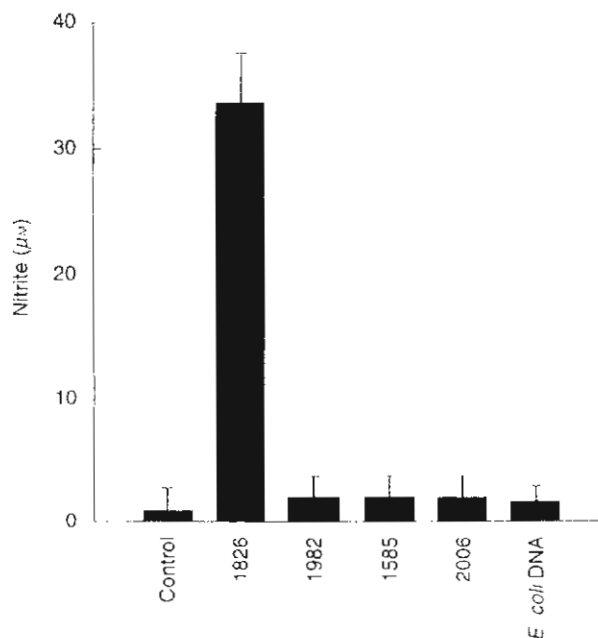


Fig. 2. Specificity of CpG ODN sequence in stimulating NO production. RAW 264.7 macrophages (1×10^6 cells/well) were incubated with CpG ODN 1826, 1982, 1585, 2006 or *E. coli* DNA at a final concentration of 1 µg/ml for 24 h. Nitrite in the supernatant was determined after 24 h of incubation. Unstimulated cells served as control. Data represent means and s.d. of three separate experiments each carried out in triplicate.

Exposure time required for maximum stimulation of NO production by CpG ODN 1826-activated macrophages

To achieve this, the macrophages were pulsed with a precalibrated concentration of CpG ODN 1826 for different time intervals before analysis for NO and iNOS production. After pulsing, the cells were washed and then cultured further for a total of 24 h, when the supernatant was collected and analysed for NO and the cells were analysed for iNOS. The results showed that a minimum of 8 h of exposure was required for the cells to be fully activated by CpG ODN 1826 (Fig. 5a). In contrast, the pulsing time required for the LPS to activate these cells fully was less than 1 h. It should be noted that at 1 h, very low NO production was detected when the cells were pulsed with CpG ODN 1826. A similar conclusion could also be obtained with the production of iNOS from the cells activated with these two stimulators (Fig. 5b), although it could be argued that a trace amount of LPS might still be present on the cells (and plastic plates), which would lead

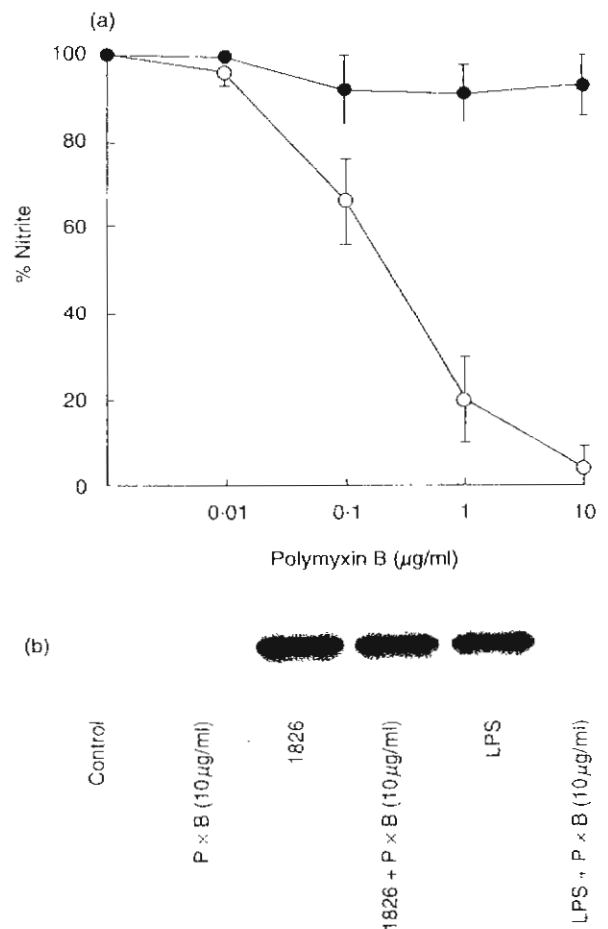


Fig. 3. Failure of polymyxin B to inhibit NO production by CpG ODN 1826-activated macrophages. RAW 264.7 macrophages (1×10^6 cells/well) were activated with 1 µg/ml of CpG 1826 (●) or 10 ng/ml of *E. coli* LPS (○) in the presence of different concentrations of polymyxin B (PxB) for 24 h. The supernatant was analysed for nitrite (a) while the cells were used in the immunoblot for iNOS (b). Control is unstimulated cells. Data (a) represent mean and s.d. of five separate experiments, each carried out in triplicate.

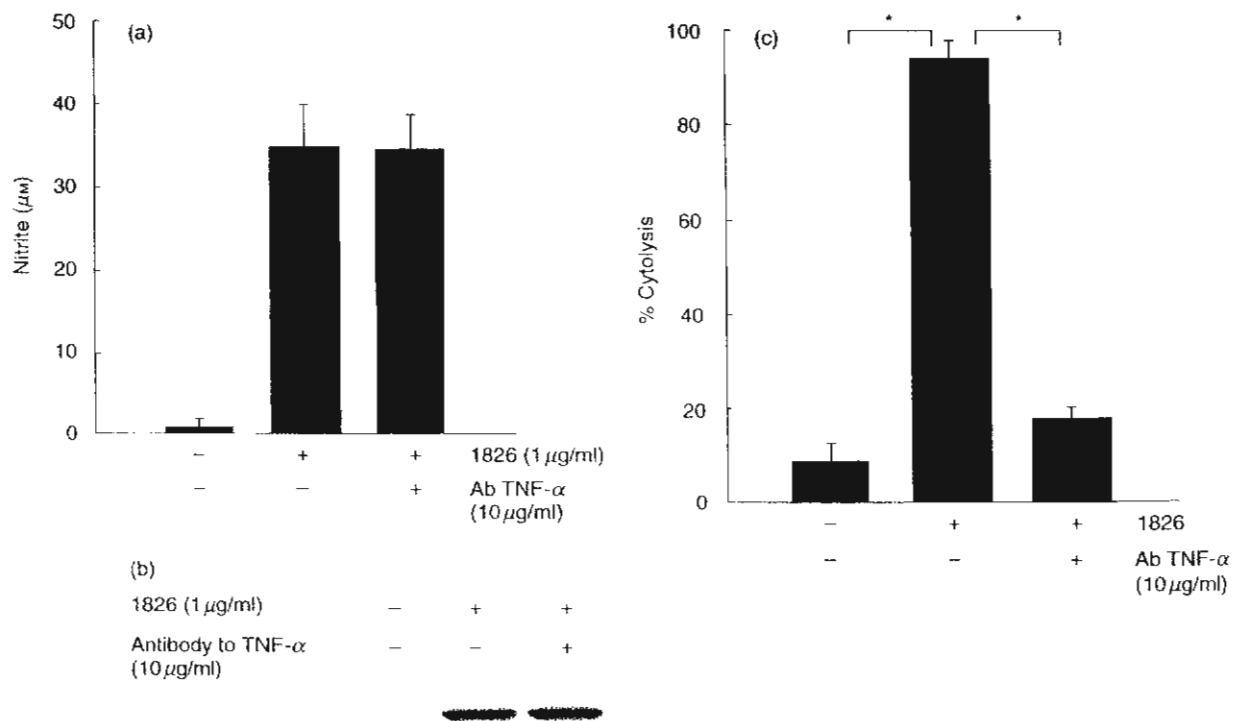


Fig. 4. NO and iNOS production by mouse macrophages activated with CpG ODN 1826 is independent of TNF- α production. RAW 264-7 macrophages (1×10^6 cells/well) were stimulated with CpG ODN 1826 ($1 \mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of neutralizing antibody ($10 \mu\text{g/ml}$) against TNF- α . After 24 h, the supernatant was analysed for nitrite (a) and the cells were analysed for iNOS by immunoblotting (b). The ability of antibody to neutralize biological activity of TNF- α was also determined by cytolysis of mouse fibroblasts (L929) (c). Data (a and c) represent mean and s.d. of three separate experiments, each carried out in duplicate. * $P < 0.05$ according to Student's *t*-test.

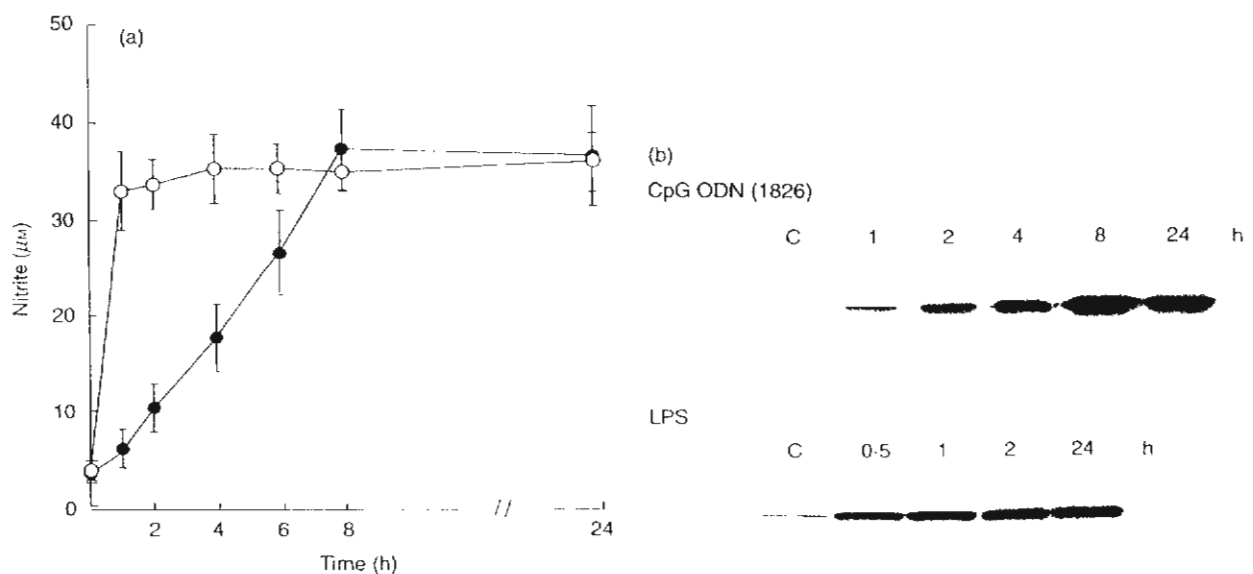


Fig. 5. Time required for maximal stimulation of NO in CpG ODN 1826 or LPS activated macrophages. RAW 264-7 macrophages (1×10^6 cells/well) were activated with CpG ODN 1826 ($1 \mu\text{g/ml}$) (●) or LPS (10 ng/ml) (○) for different time intervals. At times indicated, the supernatant was discarded, washed three times with PBS before incubating further in fresh media. At 24 h, the supernatant was analysed for nitrite (a). Data represent mean and s.d. for three separated experiments, each carried out in duplicate. The cells were analysed for iNOS by immunoblotting (b).

to the macrophages activation. This possibility is unlikely to alter the result presented, as we had evidence (unpublished) that polymyxin B added after pulsing gave similar results.

Kinetics of I κ B α degradation in CpG ODN 1826-activated macrophages

The macrophages were activated with CpG ODN 1826 at a concentration of 1 μ g/ml for 5, 15, 30, 45 and 60 min and I κ B α in the lysate of activated cells was determined by immunoblotting. Degradation of I κ B α from the CpG ODN 1826-treated cells could not be observed until 45 min after exposure (Fig. 6). In contrast, I κ B α degradation from the cells activated with LPS was detected within 15 min. These results suggested that comparing with the LPS, the I κ B α degradation in the macrophages activated with CpG ODN 1826 was significantly delayed.

CpG ODN 1826-mediated NO and iNOS production is dependent on a chloroquine sensitive step

Chloroquine is an endosomal maturation/acidification inhibitor known to abolish CpG ODN-mediated cytokine production and cell activation [9,23]. However, no information on NO and iNOS is currently available. Therefore, in the present study, NO and iNOS production was determined when the macrophages were activated with CpG ODN 1826 or LPS in the presence or absence of chloroquine. As to be expected from its molecular mechanism of action, this inhibitor did not have any effect on NO (Fig. 7a) or iNOS (Fig. 7b) production from the cells stimulated with LPS. However, the chloroquine was able to abrogate both the NO and iNOS production by CpG ODN 1826-activated cells (Fig. 6) suggesting that the cells activated with CpG ODN 1826 required an endosomal maturation/acidification step which was not essential for LPS stimulation.

DISCUSSION

During the past decade, there have been many independent studies demonstrating the immunomodulatory potential of prokaryotic DNA, especially of bacterial origin. The genomic DNA of bacteria is discriminated from that of the host derived by a pattern recognition system of the innate immune system [24]. Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides in the context of

particular flanking sequences (CpG motif) are required structure for this specific recognition [25]. In addition, a short synthetic oligonucleotide containing a CpG motif can also serve as a danger signal for the vertebrate immune system [19]. It is well documented that both CpG DNA and synthetic CpG ODN can induce macrophage activation with the production of several proinflammatory cytokines similar to that induced by the classical inducers of the innate immune system, e.g. LPS and peptidoglycan. However, unlike LPS, the bacterial DNA by itself cannot activate NO production from mouse macrophages unless it is given together with IFN- γ or a subthreshold concentration of LPS [5,17,18]. In the present study, we investigated and characterized in more detail NO and iNOS production from mouse macrophages stimulated with CpG ODN 1826. The results indicated that the presence of CpG ODN sequence 1826 alone was sufficient to activate NO and iNOS production by mouse macrophages. This specific ODN, which contains CpG motif flanked by two 5' purine and two 3' pyrimidine and containing two optimal murine CpG motif (5' GACGTT 3'), is also known to have high immunostimulatory activity in the murine system, both *in vitro* and *in vivo* [19]. Other CpG ODNs such as 1585 (stimulator for both mouse and human cells) or bacteria DNA can also stimulate cytokine production from mouse macrophages, but neither of them were able to activate NO or iNOS production [5,19] (Fig. 2). Similarly, the CpG ODN 2006 (which is potent for cells of human origin) or non-CpG containing ODN (1982) also failed to stimulate NO or iNOS production (Fig. 2). On the other hand, it can be argued that the NO and iNOS production from the cells used in the present study could be due to a trace contamination of CpG ODN with LPS. This appears not to be the case as polymyxin B, which is a known LPS inhibitor for macrophage activation, had no effect on NO and iNOS production by CpG ODN 1826-activated cells (Fig. 3). Moreover, analysis of these CpG ODNs for endotoxic activity by LAL assay shows only a trace amount, if any, of LPS in these samples. It appears therefore that the DNA or synthetic ODN containing CpG motif alone is sufficient to activate the production of not only cytokines but also of NO and iNOS.

The time-pulsed study employed here suggested that NO and iNOS production by the macrophages activated with CpG ODN 1826 required a minimum of 8 h exposure time for the cells to be activated fully (Fig. 5). This result was strikingly different from that of the LPS stimulation, which required a much shorter pulsing interval. The macrophage response to LPS stimulation is initiated by the binding of LPS to the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and this complex then interacts with CD 14. Within 1 min of exposure, the LPS is able to bind to the CD 14 on the cell surface [26]. Phosphorylation of intracellular signalling proteins such as p38 also occurred within 5 min after activation with the LPS [27,28]. However, the phosphorylation of intracellular signalling proteins such as p38 and JNK appeared later when the cells were activated with CpG DNA [19,29]. The slower rate of phosphorylation of the signalling protein may cause a delay of the NF- κ B translocation in the CpG ODN 1826-activated cells, judging from a delay of I κ B α degradation (Fig. 7). Taken together, these data may explain partially why a longer time is required for the CpG ODN 1826 to activate NO and iNOS production fully.

Endocytosis of CpG DNA is required for its immunostimulatory activity [23,29]. To initiate signalling, the CpG DNA-stimulated cells recruit MyD88 to endosome-like vesicular

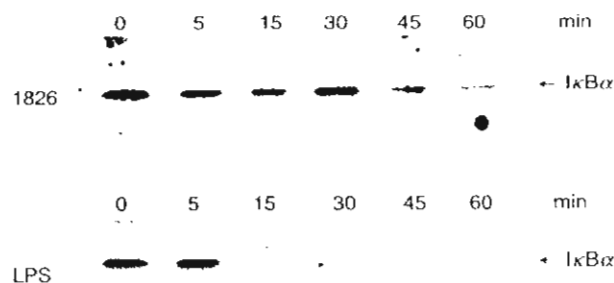


Fig. 6. Kinetics of I κ B α degradation in the CpG ODN 1826 activated macrophages. RAW 2647 macrophages (1×10^6 cells/well) were activated with 1 μ g/ml of CpG ODN 1826 (a) or 10 ng/ml of LPS for different time intervals before the cells were lysed in lysis buffer and analysed for I κ B α by immunoblotting.

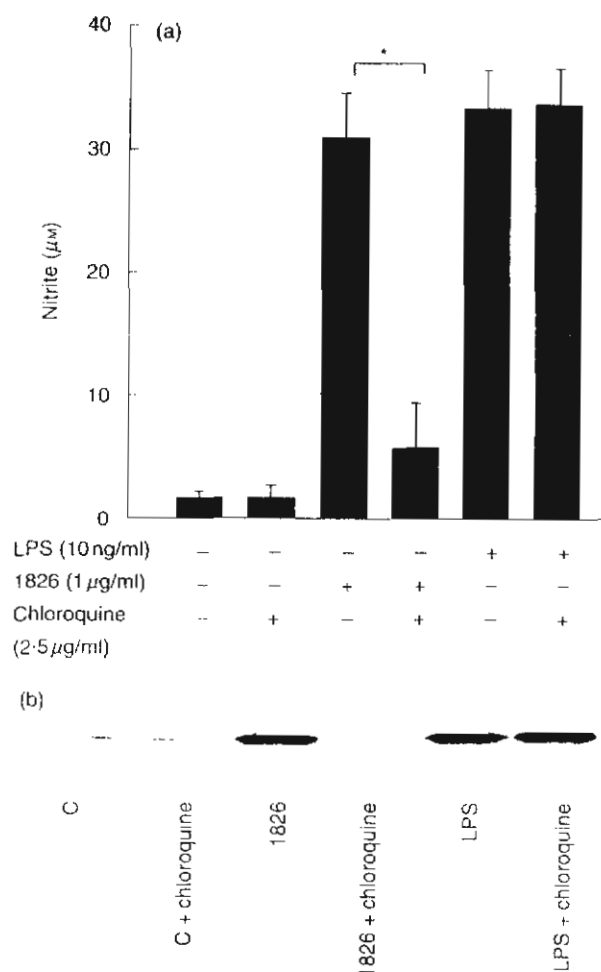


Fig. 7. Endosomal maturation/acidification is required for CpG ODN 1826 to activate NO and iNOS production. RAW 264-7 macrophages (1×10^6 cells/well) were preincubated with or without chloroquine (2.5 μ g/ml) for 2 h before activated with CpG ODN 1826 (1 μ g/ml) or *E. coli* LPS (10 ng/ml). After 24 h, the supernatant was analysed for nitrite (a) and the cells were analysed for iNOS (b). Control represents the unstimulated cells. Data (a) represent mean and s.d. of three separate experiments, each carried out in duplicate. * $P < 0.05$ according to Student's *t*-test.

structure where it co-localizes with CpG DNA. Inhibition of endosomal maturation/acidification such as chloroquine can prevent cytokine production by inhibiting phosphorylation of p38 and JNK [13]. This inhibitor could also inhibit NO and iNOS production from the cells stimulated with CpG ODN 1826 (Fig. 7). In contrast, LPS did not require endocytosis for signalling and cytokine production [13]. Chloroquine also did not interfere with NO and iNOS production from the LPS stimulated macrophages (Fig. 6). These results indicate, therefore, that the NO and iNOS production by CpG ODN 1826-stimulated macrophages is generated by a mechanism similar to that of other cytokines, i.e. requiring endocytosis but possibly different from that of the LPS.

The data currently available on the mediators produced by macrophages stimulated with synthetic CpG ODN and bacterial DNA suggest that they may have similar effect on macrophage activation. However, in this communication we have demon-

strated clearly that only the synthetic CpG ODN and not the bacterial DNA in general could stimulate NO production in macrophages. Moreover, our data suggest that a particular sequence structure of synthetic CpG ODN is essential for activating NO production. Previous reports by other investigators have shown that bacterial DNA could stimulate NO production only when the macrophages were pretreated with IFN- γ [5,17,18]. However, Zhu *et al.* claimed recently that the bacterial DNA could stimulate NO production in the absence of IFN- γ [30]. Their conclusion is inconsistent with the data presented by other investigators [5,17,18]. Their limited results on the effect of CpG ODN (which possessed a sequence similar to the 1826 used herein) on NO production are compatible with the more extensive investigation presented in this communication. More information on the biological effect of synthetic CpG ODN on macrophage and other cell types should be elucidated in order to explain its beneficial effect in the *in vivo* condition in both experimental animals and human model.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Thailand Research Fund (TRF) and Chulabhorn Research Institute (Thailand). We are grateful to A. M. Krieg (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA, USA) for providing CpG ODN.

REFERENCES

- Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis HL. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccine. *Trends Microbiol* 1998; **6**:73-7.
- Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; **147**: 1759-64.
- Sparwasser T, Mithke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Macrophages sense pathogens via DNA motive: induction of tumor necrosis factor- α mediated shock. *Eur J Immunol* 1997; **27**:1671-9.
- Sparwasser T, Koch FS, Vabulas RM *et al.* Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; **28**:2045-54.
- Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996; **157**:2116-22.
- Wagner H. Toll meets bacterial CpG DNA. *Immunity* 2001; **14**:499-502.
- Rock FL, Hardiman G, Limans C, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:588-93.
- Medzhitov R, Preston Hurlbut P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**:394-7.
- Yi AK, Tuetken R, Redford L, Kirch I, Krieg AM. CpG motif in bacterial DNA activates leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998; **160**:4755-61.
- Hemmi H, Takeuchi O, Karsch T *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; **408**:740-5.
- Schnare M, Holt AC, Eakeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor MyD88. *Curr Biol* 2000; **10**:1139-47.
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* 2000; **192**:595-600.
- Yi AK, Krieg AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinase by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol* 1998; **161**:1493-7.

- 14 Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; **11**:115–22.
- 15 Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin induced maturation of MyD88-deficient dendritic cell. *J Immunol* 2001; **166**:5688–94.
- 16 MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**:323–50.
- 17 Shoda LKM, Kegerreis KA, Suarez CE *et al.* DNA from protozoa parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun* 2001; **69**:2162–71.
- 18 Gao JJ, Zuvanich EG, Xue Q, Horn DL, Silverstein R, Morrison DC. Bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 1999; **163**:4095–9.
- 19 Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK *et al.* Delineation of a CpG phosphorothioate oligonucleotide for activating primate immune response *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2000; **164**:1617–24.
- 20 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; **126**:131–8.
- 21 Ruff MR, Gifford GE. Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J Immunol* 1980; **125**:1671–7.
- 22 Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; **6**:3051–64.
- 23 Macfarlan DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine and structurally related compound. *J Immunol* 1998; **160**:1122–31.
- 24 Wagner H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 1999; **73**:329–68.
- 25 Krieg AM, Yi AK, Hartman G. Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA. *Pharmacol Ther* 1999; **84**:113–20.
- 26 Gallay P, Jongeneel CV, Barras C *et al.* Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocyte. *J Immunol* 1993; **150**:5086–93.
- 27 Han J, Lee JD, Tobis PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 1993; **268**:25009–14.
- 28 Utaisinchaoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Sirisinha S. Kinetic studies of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in macrophages stimulated with *Burkholderia pseudomallei* endotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000; **122**:324–9.
- 29 Hacker H, Mischak H, Miethke T *et al.* CpG DNA specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; **17**:6230–40.
- 30 Zhu F, Pisetsky DS. Role of the heat shock protein 90 in immune response stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Infect Immun* 2001; **69**:5546–52.

CpG ODN enhances uptake of bacteria by mouse macrophages

P. UTAISINCHAROEN^{††}, W. KESPICHAYAWATTANA^{*}, N. ANUNTAGOOL^{*}, P. CHAISURIYA^{*}, S. PICHYANGKUL[‡], A. M. KRIEG[§] & S. SIRISINHA^{††} ^{*}Laboratory of Immunology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, [†]Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, [‡]Department of Immunology and Medicine, US Army Medical Component, AFRIMS, Bangkok, Thailand, [§]Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA, USA

(Accepted for publication 6 January 2003)

SUMMARY

Unmethylated CpG motif in synthetic oligodeoxynucleotide (CpG ODN) or bacterial DNA is well recognized for its role in innate immunity, including enhancing production of NO and cytokines by macrophages. In the present study, we demonstrated the effect of CpG ODN on the phagocytic uptake of bacteria by macrophages. Flow cytometric analysis of mouse macrophages (RAW 264.7) incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella enterica* serovar Typhi or *Escherichia coli* showed that CpG ODN increased the uptake of these bacteria by mouse macrophages. The enhancement of bacterial uptake by CpG ODN was concentration-dependent. The increase of bacterial uptake by CpG ODN-activated macrophages shown above is consistent with the result of bacteria internalization study using a standard antibiotic protection assay. There was also an increase in the rate and degree of multi-nucleated giant cell formation, phenomena which have been shown previously to be unique when the cells were infected with *B. pseudomallei*. These observations may provide significant insights for future investigation into host cell–pathogen interaction.

Keywords CpG ODN *Burkholderia pseudomallei* mouse macrophage phagocytic activity

INTRODUCTION

Bacterial genomic DNA or synthetic oligonucleotide containing unmethylated cytosine followed by guanine (CpG ODN) is now recognized as a potent immunostimulator. This family of compounds can induce the production of a variety of proinflammatory cytokines (both *in vitro* and *in vivo*) including TNF- α , IL-12 and IFN- α [1–4]. Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides in the context of particular flanking sequences (CpG motif) are required for specific activation [5]. Although the mechanism for its action is still not understood fully, current data indicate that the CpG DNA requires complexing with Toll-Like Receptor 9 (TLR 9) [6–10]. The interference of endosomal acidification by chloroquine abolishes cytokine production by suppressing MAPK activation, thus indicating that endocytosis is required for TLR 9 signalling [7,11].

The specific CpG ODN 1826 (5' TCCATGACGTTTCCT GACGTT 3') used in the present study is known to be an excellent immunostimulator in the murine model, both *in vitro* and *in vivo* [12]. In addition to the cytokine production mentioned

above, in the present study we demonstrated that CpG ODN also increased bacterial uptake by macrophages, using *Burkholderia pseudomallei* as a model. *B. pseudomallei* is a causative agent of melioidosis, a potentially fatal disease in tropical regions, e.g. northern Australia and south-east Asian countries. This facultative intracellular Gram-negative bacillus can survive and multiply inside phagocytic and non-phagocytic cells [13]. After internalization, *B. pseudomallei* can escape from the membrane-bound phagosome into the cytoplasm [13]. Although the mechanism for intracellular survival of *B. pseudomallei* in the macrophages is not well understood, recent data suggest that this bacterium can invade macrophages without triggering a substantial quantity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which plays a major role in bacterial intracellular killing [14]. This unique interaction may be related, at least in part, to its unusual lipopolysaccharide (LPS) structure, shown previously to possess a relatively weak macrophage activating activity [15,16]. Moreover, unusual morphological changes of the cells infected with this bacterium have been reported. *B. pseudomallei* is able to induce cell-to-cell fusion, leading to a multi-nucleated giant cell formation (MNGC) in both phagocytic and non-phagocytic cells [17,18]. Staining of the infected cells with rhodamine-conjugated phalloidine indicated the actin rearrangement into a comet-tail formation occurs which most probably facilitates the spreading of *B. pseudomallei* to neighbouring cells [17].

Correspondence: Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand. Fax: 662-701 5977.

E-mail: seput@mahidol.ac.th

MATERIALS AND METHODS

Reagents and cell culture

Mouse macrophage cell line (RAW 264-7) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). If not indicated otherwise, the cells were cultured in Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA) at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere.

B. pseudomallei strain 844 (arabinose-negative strain) was isolated from a patient admitted to Srinagarind Hospital in the melioidosis endemic Khon Kaen province of Thailand. The bacterium was identified originally as *B. pseudomallei* based on its biochemical characteristics, colonial morphology on selective media, antibiotic sensitivity profiles and reaction with polyclonal antibody [15,19,20]. *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. typhi*) and *Escherichia coli* used for comparison throughout these experiments was maintained at Ramathibodi Hospital (Mahidol University, Bangkok, Thailand) and kept as stock culture in our laboratory.

Nuclease-resistant phosphorothioate ODNs were kindly made available by A. M. Krieg (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA, USA). The sequences of the ODNs used were the immunostimulatory CpG ODN 1826 (5' TCCATGACGTTTCCT GACGTT 3') and non-CpG containing ODN 1982 (5' TCCAG GACTTCTCTCAGGTT 3') served as ODN control. The possible contamination with a trace amount of lipopolysaccharide (LPS) in these samples was determined by a *Limulus* amoebocyte lysate assay (LAL assay, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) and expressed as endotoxin units (EU) per ml. The lower limit for the detection of LPS in our laboratory was 0.03 EU/ml. The *Salmonella typhimurium* LPS (Sigma, St Louis, MO, USA) used as reference had an activity of 0.230 EU/ng. Both ODNs used exhibited endotoxic activity less than 7.5×10^{-6} EU/ng.

Labelling of bacteria with fluorescein isothiocyanate (FITC)

B. pseudomallei, *S. typhi* and *E. coli* were cultured in tryptic soy broth (TSB) at 37°C until a concentration of approximately 1×10^9 colony-forming units (CFU)/ml was attained. The bacterial suspension was incubated with an equal volume of 0.1 M carbonate buffer pH 9.5 containing 1 mg of FITC. After 30 min of incubation at 37°C, the FITC-conjugated bacteria were washed thoroughly with phosphate-buffered saline (PBS). The viability of labelled bacteria was determined by colony count and the final concentration was adjusted with PBS to approximately 2.5×10^6 CFU/ml.

Uptake of labelled bacteria by murine macrophages

Macrophages (1×10^6) were seeded in a 24-well plate and incubated overnight at 37°C. The cells were washed three times with PBS and then exposed to FITC conjugated bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of 10 : 1. The plates were centrifuged at 250 g for 10 min to facilitate contact between bacteria and macrophages before incubating at 37°C. After 1 h of incubation, the cells were washed three times with PBS and then fixed with 1% paraformaldehyde in PBS for 30 min before analysing by flow cytometry using FACStar^{PLUS}. A total of 10 000 events were acquired in the list mode using FLYSIS II software. Debris was excluded by light scatter gating. The gated population was analysed for FL1 intensity. The labelled cells counted represented

those associated with bacteria on the surface and/or inside the cells.

Intracellular survival and multiplication of bacteria in mouse macrophages

To determine intracellular survival and multiplication of the bacteria, a standard antibiotic protection assay was performed as described previously [14]. The macrophages (1×10^6) were cultured overnight in a 24-well plate and then exposed to bacteria at MOI 2 : 1. After 1 h of incubation, extracellular bacteria were removed and the cells were washed three times with 2 ml of PBS. Residual bacteria that adhered to the cell surface were killed by incubating in DMEM containing 250 µg/ml kanamycin (GIBCO Laboratories) for 1 h. The cells were washed three times with PBS and the intracellular bacteria were liberated by lysing the macrophages with 0.1% Triton X-100 and plated the released bacteria on tryptic soy agar. The number of intracellular bacteria was determined by bacterial colony counting.

Quantification of multi-nucleated giant cell (MNGC) formation from macrophages infected with *B. pseudomallei*

In order to quantify the degree of MNGC, the macrophages (1×10^6) were cultured first overnight on a coverslip, as described previously [17]. After 1 h of incubation with *B. pseudomallei* at MOI 2 : 1, the macrophages were washed three times with PBS and then incubated in DMEM containing 250 µg/ml kanamycin (GIBCO Laboratories) for 2 h to kill residual extracellular bacteria. The macrophages were incubated further in DMEM containing 20 µg/ml kanamycin before being visualized for MNGC formation by light microscope at a magnification of $\times 400$. At different time intervals, the coverslips were washed with PBS, fixed for 15 min with 1% paraformaldehyde and then washed sequentially with 50% and 90% ethanol for 5 min each. The coverslips were air-dried before staining with Giemsa [17]. For enumeration of MNGC formation, at least 1000 nuclei per coverslip were counted and the percentage of multi-nucleated cells was calculated. The MNGC was defined as the cell possessing more than one nuclei within the same cell boundary.

RESULTS

In order to investigate the effect of CpG ODN (1826) on the ability of macrophages to take up bacteria, the cells were treated overnight with various concentrations of CpG ODN (1826) and non-CpG ODN (1982) before being infected with *B. pseudomallei*, *S. typhi* or *E. coli* conjugated with FITC at 37°C, as described in Materials and methods. As shown in Fig. 1, CpG ODN (1826) was able to increase the percentage of cells associated with all three bacteria. The enhancement of bacterial uptake by CpG ODN (1826) was also found to be dose-dependent. However, when the cells were preactivated with non-CpG containing ODN (1982), the percentage of macrophages associated with bacteria was not enhanced, even when tested at a concentration as high as 1 µg/ml. Similar experiments were carried out at 4°C in order to ensure that the signals originated from the internalized bacteria and not from the bacteria adhered onto the cell surface. The results showed that at 4°C a very low percentage of the cells associated with bacteria was observed, even when the concentration of CpG ODN as high as 1 µg/ml was used (Fig. 1, insert). These observations indicated that the increase in the percentage of

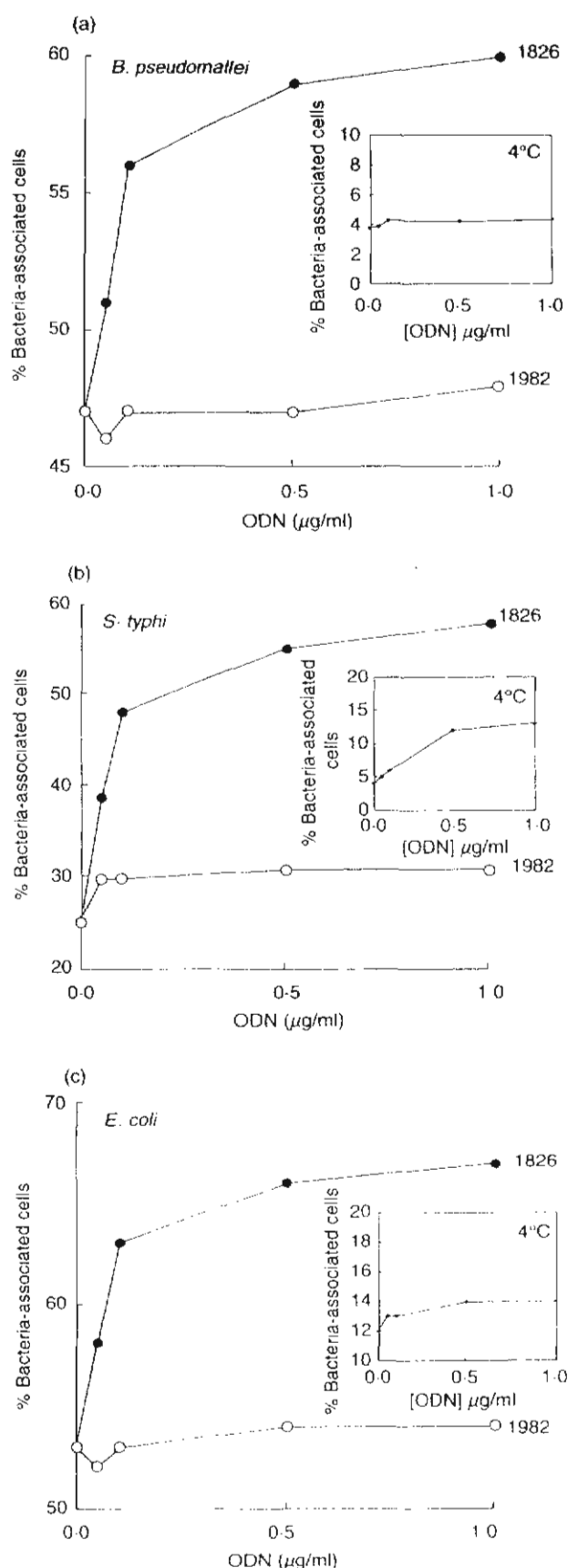


Fig. 1. CpG ODN (1826) enhances percentage of bacteria-associated cells. Mouse macrophages (RAW 264.7) were exposed to live FITC-conjugated *B. pseudomallei* (a), FITC-conjugated *S. typhi* (b) or FITC-conjugated *E. coli* (c) at MOI 10 : 1 as described in Materials and methods. After 1 h of incubation at 37°C, the association of FITC-labelled bacteria with macrophages was analysed by flow cytometry. Macrophages preincubated overnight with CpG ODN (1826) (●) but not with non-CpG ODN (1982) (○) exhibited increased percentage of bacteria-associated cells in a dose-dependent manner. It should be noted that when the experiments were carried out at 4°C instead of 37°C, the only a low level of association could be observed (insert), suggesting that at 37°C, CpG ODN (1826) enhanced bacterial internalization but not adherence. These results are representative of three separate experiments.

macrophage cells associated with bacteria at 37°C was due to internalization and not adherence of FITC-conjugated bacteria.

In order to determine the effect of CpG ODN on intracellular survival and multiplication of bacteria, the macrophages were treated overnight with 1 μg/ml of either CpG ODN, non-CpG ODN or LPS before being infected with *B. pseudomallei* or *S. typhi* at MOI 2 : 1. After 1 h of infection, the macrophages were washed three times and incubated further for 1 h at 37°C in the medium containing 250 μg/ml of kanamycin to kill extracellular bacteria that might remained adhering to the cell surface. The intracellular bacteria were liberated, plated on tryptic soy agar and the colonies were counted as described. It should be mentioned that under this condition, kanamycin was effective in killing more than 99% of both *B. pseudomallei* and *S. typhi* (data not shown). In the presence of CpG ODN the number of *B. pseudomallei* and *S. typhi* inside the macrophages was increased significantly while no such increase was observed in the cells treated with non-CpG ODN or LPS (Fig. 2). However, when the CpG ODN-activated macrophages were pretreated with cytochalasin D, a chemical that inhibits polymerization of microfilament, the number of intracellular bacteria was decreased markedly (Table 1), confirming that the CpG ODN enhanced the bacterial uptake of macrophages. These results are also consistent with the data presented in Fig. 3 showing the CpG ODN enhancement of MNGC formation. We have observed previously that *B. pseudomallei* was able to induce MNGC formation in both phagocytic and non-phagocytic cells [17]. In this experiment, the degree of MNGC formation in *B. pseudomallei*-infected macrophages culture was quantitated after Giemsa staining. The results presented in Fig. 3 showed that when the macrophages preactivated with CpG ODN (1826), as much as 20% of the infected culture exhibited MNGC formation with 4 h. At 8 h after infection, more than 80% of the infected cells were found to be in a stage of MNGC formation. In contrast, in the absence of CpG ODN, no MNGC could be detected at 4 h, but became detectable at 6 h (10%) and increased gradually to 30% at 8 h after infection. Similar results were observed in the macrophages treated with non-CpG. It should be noted that, in the uninfected cells, less than 1% of MNGC was observed in both CpG ODN or non-CpG ODN treated cells. These results suggest that CpG ODN not only accelerated the rate of MNGC but also increased the degree of MNGC formation in the macrophages infected with *B. pseudomallei*.

Chloroquine is an endosomal maturation/acidification inhibitor shown previously to abolish CpG ODN-mediated cytokine production and cell activation [7,11]. In order to investigate the

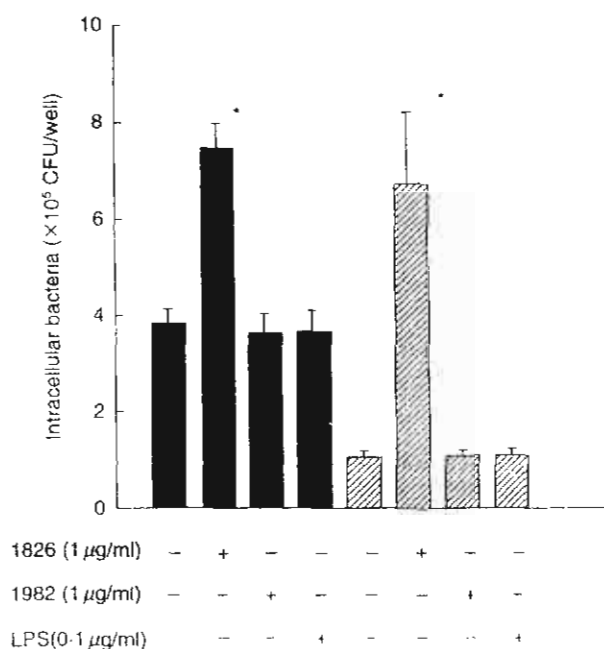


Fig. 2. CpG ODN increases internalization of bacteria. Mouse macrophages were pretreated overnight with 1 µg/ml of CpG ODN (1826), non-CpG containing ODN (1982) or 0.1 µg/ml of LPS before incubating for 1 h with *B. pseudomallei* or *S. typhi* at MOI 2:1. Extracellular bacteria were removed and killed, then intracellular bacteria released after lysis were determined by standard antibiotic protection assay as described in Materials and Methods. Data represent mean ± s.d. of three separate experiments, each carried out in duplicate. **P* < 0.05 by Student's *t*-test. ■, *B. pseudomallei*; ▨, *S. typhi*.

Table 1. Inhibition of CpG ODN-enhanced bacterial uptake by cytochalasin D

Treatment	No. of bacteria (mean ± s.d.)	
	Without cytochalasin D	With cytochalasin D (2.5 µg/ml)
<i>P. pseudomallei</i>	$3.80 \times 10^5 \pm 0.28$	$1.43 \times 10^5 \pm 0.03$
<i>B. pseudomallei</i> + 1826	$7.41 \times 10^5 \pm 0.50$	$1.10 \times 10^5 \pm 0.07$
<i>B. pseudomallei</i> + 1982	$3.55 \times 10^5 \pm 0.41$	$1.19 \times 10^5 \pm 0.10$
<i>S. typhi</i>	$1.02 \times 10^5 \pm 0.14$	$1.28 \times 10^5 \pm 0.20$
<i>S. typhi</i> + 1826	$6.69 \times 10^5 \pm 1.47$	$1.05 \times 10^5 \pm 0.02$
<i>S. typhi</i> + 1982	$1.04 \times 10^5 \pm 0.09$	$1.01 \times 10^5 \pm 0.16$

possible inhibitory effect of chloroquine on the bacterial uptake of macrophages, the macrophages were preincubated first with or without 2 µg/ml of chloroquine for 2 h before being activated with 1 µg/ml of CpG ODN (1826). After overnight incubation, the cells were infected with *B. pseudomallei* or *S. typhi* at MOI 2:1 for 1 h. The extracellular bacteria were removed and the adhering bacteria on the macrophage surface were killed with kanamycin, as described above. After 1 h, the intracellular bacteria were determined by a standard antibiotic protection assay as described. The results presented in Fig. 4 showed that while the chloroquine

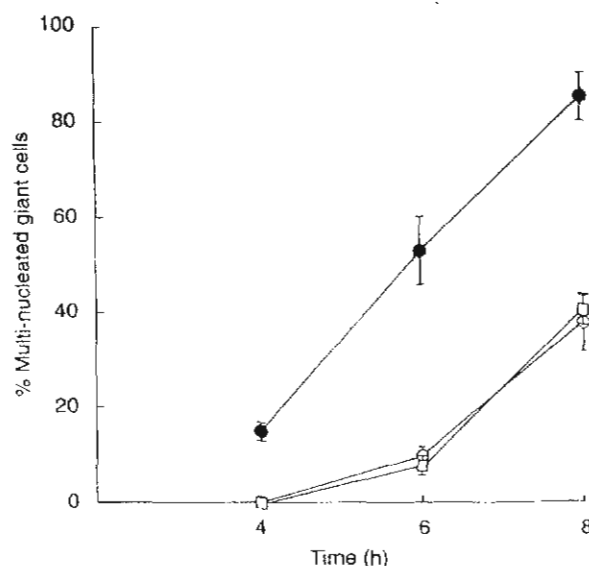


Fig. 3. CpG ODN enhances the rate and extent of multi-nucleated giant cell (MNGC) formation of *B. pseudomallei*-infected macrophages. Mouse macrophages were pretreated overnight with 1 µg/ml of CpG ODN (1826) (●) or non-CpG containing ODN (1982) (○) before being infected with *B. pseudomallei* at MOI 2:1. Untreated cells served as control (□). At 4, 6 and 8 h postinfection, the cells were fixed, stained with Giemsa, and the number of MNGC was determined by microscopic examination (400×). Data represent mean ± s.d. of three separate experiments.

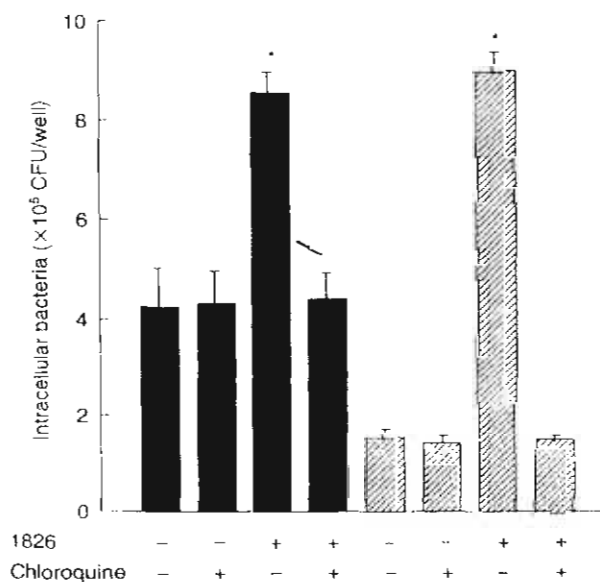


Fig. 4. Effect of chloroquine on bacterial internalization by macrophages preactivated with CpG ODN (1826). Mouse macrophages were pretreated with chloroquine (2 µg/ml) for 2 h before incubating overnight with 1 µg/ml of CpG ODN (1826). The cells were then exposed to either *B. pseudomallei* or *S. typhi* at MOI 2:1 for 1 h. Intracellular bacteria were determined as described. Data represent mean ± s.d. of three separate experiments, each carried out in duplicate. **P* < 0.05 by Student's *t*-test. ■, *B. pseudomallei*; ▨, *S. typhi*.

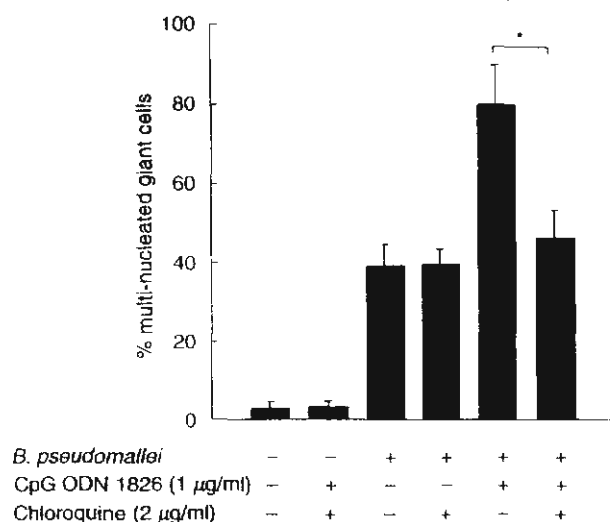


Fig. 5. Chloroquine reduces multinucleated cell formation in CpG ODN-activated macrophages. Mouse macrophages were cultured on coverslips in the presence or absence of 2 µg/ml chloroquine for 2 h before being activated overnight with 1 µg/ml of CpG ODN (1826). The cell cultures were then exposed to *B. pseudomallei* at MOI 2 : 1. After 8 h of exposure, the cells were fixed and stained with Giemsa, and the number of MNGC was determined microscopically (400×). Data represent mean ± s.d. of three separate experiments, each carried out in duplicate. **P* < 0.05 by Student's *t*-test.

could not inhibit the internalization of either *B. pseudomallei* or *S. typhi*, it was able to reduce the number of intracellular bacteria from the CpG ODN (1826)-activated macrophages. Similarly, the enhancement of MNGC formation induced by CpG ODN was also decreased significantly when the infected cells were pretreated with chloroquine (Fig. 5), thus indicating that the increase of MNGC formation by CpG ODN (1826) also required endosomal maturation/acidification (Fig. 5). The circumstantial evidence presented in these experiments support the contention that the CpG ODN enhancement of bacterial uptake by macrophages required endosomal maturation/acidification.

DISCUSSION

Bacterial genomic DNA containing unmethylated cytosine followed by guanine (CpG DNA) is a well-recognized immunomodulator. It appears to function as one of the 'danger signals' to trigger innate immunity against microbial infection, as well as modulating adaptive immune response [1]. Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) in the context of particular flanking sequences (CpG motif) are a required structure for this specific recognition [1,5]. Subsequently, it was shown that the short synthetic oligodeoxynucleotide-containing CpG motif could also serve as a danger signal for the vertebrate immune system [21]. It has been shown that CpG ODN is a potent immunomodulator that induces significant protective immunity in a number of infections caused by bacteria, virus and protozoa. For instance, mice injected with CpG ODN have been shown to respond with a rapid production of IL-12 and IFN-γ leading to enhanced resistance to infection by *Listeria monocytogenes* or *Leishmania major* [22,23]. Activation of the innate immune cells, e.g. macrophages, by CpG DNA or synthetic CpG ODN results in the induction of

an array of proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-12 and type I interferon both *in vivo* and *in vitro* [1–3]. Moreover, the synthetic CpG ODN, including the one used in this study (1826), can also stimulate the production of bactericidal effector substances such as nitric oxide [24]. The molecular mechanism of CpG DNA or CpG ODN in immunostimulation is almost identical to that of the more classical inducers of innate immune system, i.e. LPS [21]. In fact, both the CpG DNA and CpG ODN, like the LPS, can induce septic shock in mice [25]. To activate the immune cells, CpG DNA or CpG ODN requires TLR9 while LPS requires TLR4 [8,9]. In this study, we have demonstrated a novel role of CpG ODN in macrophage activation. The results from flow cytometry, together with those from intracellular bacterial survival and MNGC formation, suggested that CpG ODN (1826) was able to increase uptake of both intracellular (*B. pseudomallei* and *S. typhi*) and extracellular (*E. coli*) by mouse macrophages (Figs 1 and 2). The enhancement of phagocytic activity induced by CpG ODN (1826) was also concentration-dependent (Fig. 1). An increase in the macrophage ability to take up bacteria by CpG ODN (1826) was not observed in the cells activated with a classical immunostimulator such as LPS (data not shown).

To initiate signalling, the CpG DNA-stimulated cells recruit MyD88 to an endosome-like vesicular structure where it co-localizes with CpG DNA [1,5]. Inhibitors of endosomal maturation/acidification, e.g. chloroquine, can prevent cytokine production by inhibiting phosphorylation of p38 and JNK [11]. In the present study, we have demonstrated further that the increase of phagocytic activity and MNGC formation of CpG ODN-activated macrophages (Figs 3 and 4) was abolished when the cells were pretreated with chloroquine, thus suggesting that the enhancement of bacterial uptake by CpG ODN (1826) also requires endosomal maturation/acidification. These observations confirm and extend the data reported previously by other investigators [7,11].

Synthetic CpG containing ODN has been shown to activate the production of several proinflammatory cytokines, such as TNF-α and IL-12. The production of these cytokines by macrophages, in turn, stimulates NK cells to secrete IFN-γ [26]. The latter plays a critical role in immunity against bacterial infection, for instance, by stimulating NO production to interfere with intracellular bacterial survival and multiplication inside the macrophages and MNGC formation induced by *B. pseudomallei* [14]. The enhancement of bacterial uptake by CpG ODN-activated macrophages, together with the stimulation of IFN-γ secretion from NK cells, may eventually result in enhancement of bacterial clearance by the host. However, the exact molecular mechanism by which the CpG DNA or CpG ODN increase the phagocytic activity of macrophages is not understood fully and remains to be investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from Thailand Research Fund (RDG 4530209) and Chulabhorn Research Institute (Thailand).

REFERENCES

- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Ann Rev Immunol* 2002; **20**: 709–60.
- Messina JP, Gilkeson GS, Pletschky DS. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; **147**: 1759–64.