รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการยับยั้ง *Escherichia coli* ดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamase (ESBL)

Antimicrobial ability of bacteriophage against drug resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β-lactamase (ESBL)

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. ศ.ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2558

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย มอบ.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนสถานที่และครุภัณฑ์ในการทำวิจัย ตลอดจนให้เวลาผู้วิจัยและคณะสำหรับการทำงานวิจัย จนสามารถดำเนินงานวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงลงได้

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย เรื่อง "ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการยับยั้ง *Escherichia coli* ดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamase (ESBL)" เป็นโครงการวิจัยที่มีนางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นหัวหน้าโครงการ และมีนายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นผู้ร่วมโครงการ โครงการวิจัยดังกล่าวได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558 โดยได้รับทุนสนับสนุนเป็นจำนวนเงิน 299,200 บาท (สองแสนเก้าหมื่นเก้าพันสองร้อยบาทถ้วน) จากการดำเนินการโครงการวิจัยดังกล่าวเป็นเวลา 1 ปี โดยเริ่มดำเนินการตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 และได้เสร็จสิ้นสมบูรณ์เมื่อ 30 กันยายน 2558 ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ทุกประการ กล่าวคือ สามารถตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *E. coli*-ESBL ได้ ทราบความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ทราบรูปร่างลักษณะของแบคเทอริโอเฟจ และทราบชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ นอกจากนี้แล้วยังสามารถจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ด้วย

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ยังได้นำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในชื่อเรื่อง "A *Siphoviridae* bacteriophage specific to extended-spectrum-β-lactamases-producing *Escherichia coli*" ในวารสาร Journal of Chemical and Pharmaceutical Research ปี 2015 ฉบับที่ 7(11) หน้า 604-608

บทคัดย่อ

Escherichia coli-ESBL (หรือ ESBL-producing *E. coli* หรือ *E. coli*-ESBL) หมายถึง *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamases (ESBL) เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำลายยาในกลุ่ม β-lactam ได้หลากหลายชนิด ด้วยเหตุนี้การรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์นี้ด้วยยาปฏิชีวนะจึงเป็นไปได้ยาก ในช่วงเวลาที่มีการค้นหาวิธีการใหม่ในการควบคุมแบคทีเรียดื้อยา การรักษาโรคด้วยแบคเทอริโอเฟจถือเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli*-ESBL และเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น ในการศึกษานี้สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจได้ 1 ชนิด (ϕUBU-ESBL) จากน้ำที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โดยแบคเทอริโอเฟจนี้สามารถทำให้เกิด plaques ใสขนาดเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตร และยับยั้งได้เฉพาะ *E. coli*-ESBL เท่านั้น แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอสายคู่ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพบว่าแบคเทอริโอเฟจมีหัวแบบ isometric head (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 ± 3.4 นาโนเมตร) และมีหางแบบยืดหดไม่ได้ (ยาวประมาณ 290 ± 15.1 นาโนเมตร) จากลักษณะของสารพันธุกรรมและรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจทำให้สามารถจัดจำแนก ϕUBU-ESBL ไว้ในสกุล *Siphoviridae* การศึกษานี้ได้ให้ข้อมูลพื้นฐานที่แสดงให้เห็นว่า ϕUBU-ESBL มีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL

Abstract

Escherichia coli-ESBL (or ESBL-producing *E. coli* or *E. coli*-ESBL) are *E. coli* strains capable of producing extended-spectrum β-lactamases (ESBL). These enzymes can hinder the effectiveness of many β-lactam drugs. Therefore, it is difficult to use antibiotics to treat the diseases caused by *E. coli*-ESBL. In the midst of finding alternative therapeutic approaches to control drug resistant bacteria, bacteriophage therapy is considered as a most promising one. The aims of this study are to isolate and classify a bacteriophage specific to *E. coli*-ESBL and to examine its host range. In this study, a bacteriopages, ϕUBU-ESBL, was isolated from water collected from a waste water treatment pond. It was found to produce small clear plaques of 1-2 mm in diameter and to inhibit only *E. coli*-ESBL, but not other bacteria used in this study. Its genome was digested by the restriction enzyme *Bam*HI indicating that the genome was double stranded DNA. As revealed by transmission electron microscopy, ϕUBU-ESBL had an isometric head (50 ± 3.4 nm in diameter) with a noncontractile tail (290 ± 15.1 in length). Based on its genomic and morphological characteristics, ϕUBU-ESBL was classified as members in the family *Siphoviridae*. This study provides preliminary information suggesting that ϕUBU-ESBL had potential for further study towards its application as a therapeutic agent against *E. coli*-ESBL infectious diseases.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลการทดลอง	23
วิจารณ์ผลการทดลอง	28
สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	40

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Gastroenteritis ที่เกิดจาก *Escherichia coli*	6
2	การจัดจำแนกชนิดและคุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ	13
3	ตัวอย่างของ phage therapy ที่ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อในคน	17
4	บริษัทที่ทำงานวิจัยและศึกษาเกี่ยวกับ phage และ phage therapy	17
5	เปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจกับยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ	18
6	แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการศึกษา host range ของแบคเทอริโอเฟจ	19
7	แหล่งน้ำตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ	23
8	ความสามารถของ ϕUBU-ESBL ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ	25
9	พืชสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	30
10	ตัวอย่างของพืชสมุนไพรและยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	31
11	ตัวอย่างการนำ bacteriophage cocktail มาใช้ในการฆ่าแบคทีเรีย	32

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ภาพถ่าย *Escherichia coli* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด	3
2	ตำแหน่ง antigenic structure บนเซลล์ *Escherichia coli*	4
3	ตัวอย่างรูปร่างและส่วนประกอบสำคัญของแบคเทอริโอเฟจ	10
4	การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรีย	12
5	การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ	15
6	ลักษณะ clear zone ของ ϕUBU-ESBL เมื่อทดสอบโดยวิธี spot test	24
7	ลักษณะ plaque ของ ϕUBU-ESBL จากการทำ plaque assay	24
8	รูปร่างของ ϕUBU-ESBL ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน	26
9	สารพันธุกรรมของ ϕUBU-ESBL ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI โดยวิธี agarose gel electrophoresis	27

บทนำ

Escherichia coli (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) รูปแท่ง (bacilli) โดยปกติสามารถพบ *E. coli* อาศัยอยู่ในลำไส้ของทั้งคนและสัตว์โดยไม่ทำให้เกิดโรคเรียกว่า normal flora หรือ non-pathogenic strains แต่บางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์และเรียกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคได้นี้ว่า pathogenic strains อาการที่พบบ่อยเมื่อมีการติดเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ (intestinal tract infection) คือ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งมีอาการสำคัญคือ ท้องร่วง (diarrhea) นอกจากนี้ *E. coli* ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อนอกลำไส้ได้ด้วย เช่น โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (respiratory tract infection) และปอดอักเสบ (pneumonia) เป็นต้น การรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* โดยทั่วไปจะต้องทำการแยกเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุจากผู้ป่วยและทดสอบความไวต่อยา (drug sensitivity test) ของ *E. coli* เพื่อเลือกใช้ยาที่เหมาะสมแก่ผู้ป่วย ยาที่นิยมใช้ในการรักษาคือยาในกลุ่ม β-lactams ได้แก่ penicillin, amoxicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin และ nitrofurantoin เป็นต้น

E. coli-ESBL (หรือ ESBL-producing *E. coli*) หมายถึง *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamase (ESBL) เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำลายยาในกลุ่ม β-lactam ได้หลากหลายชนิด และแม้ว่าจะเลือกใช้ยาใน third-generation cephalosporins ซึ่งเป็นยาที่พัฒนาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นจนสามารถทนต่อเอนไซม์ β-lactamase แล้วก็ตาม แต่ *E. coli*-ESBL ก็ยังคงสามารถดื้อยาในกลุ่มนี้ได้ ด้วยเหตุนี้โรคติดเชื้อ *E. coli-ESBL* จึงเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา สาเหตุหลักของการดื้อยาของ *E. coli* ตลอดจนแบคทีเรียบางชนิดในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ตัวอื่น ๆ ด้วย (เช่น *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginasa* และ *Haemophilus influenzae* เป็นต้น) มีอยู่ 2 ประการคือ (1) การคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) กล่าวคือ แบคทีเรียแต่ละชนิดในธรรมชาติมีทั้งชนิดที่ไม่ดื้อยาและชนิดที่ดื้อยาอยู่ปนกัน เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ๆ ยาจะไปมีผลทำให้แบคทีเรียชนิดไม่ดื้อยาถูกกำจัดให้หมดไป และเหลือไว้เพียงแบคทีเรียชนิดที่ดื้อยาเท่านั้น และ (2) การเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยา เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในขนาดและปริมาณที่ไม่เหมาะสมทำให้เชื้อถูกทำลายได้ไม่หมด เชื้อจึงมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมจนสามารถทนต่อการถูกทำลายของยาได้ กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ คือ transformation, transduction และ conjugation

ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียนับเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งในวงการแพทย์ ส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อทั้งในคนสัตว์ด้วยยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพด้อยลงเรื่อย ๆ ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มมองหาทางเลือกใหม่ที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยา ทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากคือ การใช้แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage หรือเรียกสั้น ๆ ว่า phage) และเรียกวิธีการรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคเทอริโอเฟจนี้ว่า bacteriophage therapy หรือ phage therapy โดยอาศัยคุณสมบัติสำคัญของแบคเทอริโอเฟจ คือ (1) มีความจำเพาะเจาะจงต่อโฮสต์เซลล์ (host cell) หรือแบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น และ (2) มีการดำรงชีวิตใน host cell เป็นแบบ lytic cycle กล่าวคือเมื่อแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่ภายในโฮสต์

เซลล์แล้วจะหยุดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียไว้ แล้วสร้างอนุภาคแบคเทอริโอเฟจรุ่นลูก (progeny phage) ให้เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากภายในเซลล์ดังกล่าว และสุดท้ายแบคเทอริโอเฟจจะสร้างสารบางอย่างออกมาทำลายผนังเซลล์ ทำให้แบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตายไปในที่สุด ทั้งนี้ progeny phages ที่ถูกสร้างนั้นก็จะถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ แล้วเข้าไปบุกรุกทำลาย host cells ใหม่ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงนั้นต่อไป ส่งผลให้ host cells เกิดการตายเป็นวงกว้าง และถูกควบคุมหรือกำจัดให้หมดไปในที่สุด รายงานเกี่ยวกับการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ได้แก่ การใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในสัตว์ทดลอง โดยแบคเทอริโอเฟจสามารถทำลายได้ทั้ง *S. aureus* ชนิดที่ไม่ดื้อยาและดื้อยา (methicillin-resistant *S. aureus*) (Capparelli et al., 2007) การใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคติดเชื้อในกระแสเลือดในหนูที่ติดเชื้อ multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (Vinodkumar et al., 2009) และการใช้แบคเทอริโอเฟจในการควบคุมโรคติดเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดและเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบในไก่และในลูกวัว (Barrow et al., 1998) เป็นต้น

ในการศึกษานี้จะตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli*-ESBL ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี โดยจะทำการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำทิ้งและน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งจะมีโอกาสพบแบคเทอริโอเฟจได้มากจากรายงานที่ผ่าน จากนั้นจะนำแบคเทอริโอเฟจที่ตรวจพบนั้นมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้ ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* รูปร่างของแบคเทอริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน และชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะแสดงให้เห็นถึงการมีอยู่จริงของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli*-ESBL และมองเห็นโอกาสหรือความเป็นไปของได้ที่จะนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL ในอนาคต

ตรวจเอกสาร

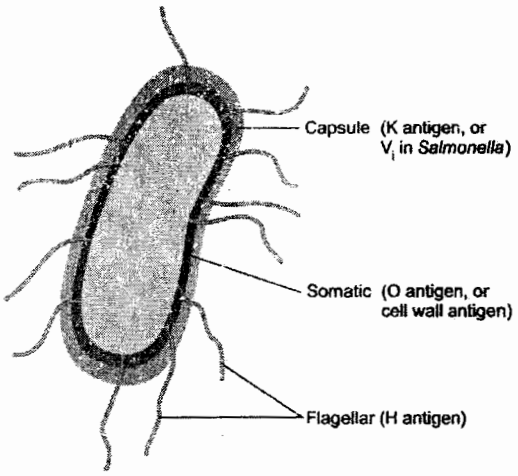
Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) รูปแท่ง (rod-shaped bacterium) (รูปที่ 1) จัดอยู่ใน Enterobacteriaceae family มักอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ โดยไม่ทำให้เกิดโรคหรืออันตรายใด ๆ เรียกว่า normal flora โดยสามารถพบได้ 0.1% ของ normal flora ทั้งหมดในลำไส้ มี *E. coli* เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ทำให้เกิดโรค food poisoning ในคน วิธีการถ่ายทอดเชื้อ *E. coli* ระหว่างบุคคลหรือเส้นทางที่เชื้อเข้าสู่ร่างกายคือ fecal-oral transmission เชื้อ *E. coli* จัดเป็น coliform bacteria ชนิดหนึ่งซึ่งจะออกมากับอุจจาระของคนและสัตว์ โดยเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่นอกร่างกายคนและสัตว์ได้เป็นระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นจึงนิยมใช้เชื้อนี้เป็น indicator organism ในการตรวจสอบการปนเปื้อนอุจจาระ (fecal contamination) ในตัวอย่างเช่น น้ำดื่มและอาหาร เป็นต้น

E. coli เป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัย flagella (peritrichous flagella) และพบ fimbriae (หรือ pili) อยู่รอบ ๆ ตัวเซลล์ บางสายพันธุ์ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารหรือลำไส้ (extra-intestinal infections) อาจพบว่าสร้าง capsule ได้ด้วย *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร non-selective media สามารถ ferment น้ำตาล lactose และให้โคโลนีสีแดงหรือชมพูบนอาหาร MacConkey agar สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือตั้งแต่ 15-45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถทนร้อนได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และบางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิด hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อเจริญบนอาหาร blood agar การจำแนกชนิด *E. coli* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นใน Enterobacteriaceae family ทำได้โดยอาศัยความสามารถในการ ferment น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมี

รูปที่ 1 ภาพถ่าย *Escherichia coli* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg)

โครงสร้างบางอย่างที่อยู่บนผิวเซลล์ของ *E. coli* อาจมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigenic structure) โดยแอนติเจนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการจำแนก *E coli* ออกเป็นกลุ่มย่อย หรือ serotypes ต่าง ๆ และเรียกวิธีการแยกหรือแบ่งกลุ่มแบคทีเรียโดยอาศัยแอนติเจนที่ปรากฏอยู่บนตัว

เซลล์ว่า serotyping ซึ่งการตรวจชนิดของ serotype สามารถทำได้โดยตรวจดูปฏิกิริยา agglutination เมื่อผสมตัวเซลล์แบคทีเรียกับแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific antibody) antigenic structure ที่อยู่บนโครงสร้างของเซลล์ *E. coli* มีอยู่ 3 ชนิด คือ (1) lipopolysaccharide (LPS) หรือ somatic (O) antigens (2) flagella (H) antigen และ (3) capsular (K) antigen ปัจจุบัน *E. coli* มี O antigen มากกว่า 180 ชนิด H antigen มีมากกว่า 50 ชนิด และ K antigen มีสองชนิด การจำแนก *E. coli* ตาม serotype นี้มีประโยชน์สำหรับงานทางด้านระบาดวิทยาเป็นอย่างมาก ตัวอย่างของ *E. coli* serotype ที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไปและพบบ่อยว่าทำให้เกิดโรคท้องร่วง (diarrhea) เช่น *E. coli* O157:H7 เป็นต้น



รูปที่ 2 ตำแหน่ง antigenic structure บนเซลล์ *Escherichia coli*
(ที่มา: http://www.studyblue.com/notes/note/n/a--d-bacteriology-/deck/5115268)

E. coli มีกลไกและความสามารถในการก่อโรค (pathogenic mechanisms & virulence factors) ที่สำคัญอยู่หลายประการ โครงสร้างประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่พบอยู่ที่ O antigen และ K antigen มีส่วนช่วยการปกป้องตัวเซลล์แบคทีเรียมิให้ถูกเก็บกินโดย phagocytic cells (ในกรณีที่ร่างกายยังไม่มี specific antibody แต่ถ้าร่างกายมี specific antibody แล้วเซลล์แบคทีเรียนั้นจะถูกทำลายโดยกระบวนการ opsonization) *E. coli* บางสายพันธุ์ (โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหาร) สามารถสร้าง hemolysin(s) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง และเมื่อเกิดการแตกสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง แบคทีเรียยังได้รับ ferric ions ที่มีอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นธาตุที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์แบคทีเรียอีกด้วย endotoxin ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการทำให้เกิดโรคของ *E. coli* (รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น ๆ ด้วย) โดยความเป็นพิษจะอยู่ที่ lipid A ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งใน LPS โดยจะถูกปล่อยออกมาจาก cell wall เมื่อเซลล์แบคทีเรียตายหรือแตกสลาย endotoxin มีฤทธิ์หรือก่อให้เกิดความปกติที่สำคัญ ได้แก่ ทำให้เกิดไข้ (fever) กระตุ้นคอมพลีเมนต์ (complement) กระตุ้นให้เลือดแข็งตัวกลายเป็นลิ่มเลือดในหลอดเลือด ทำให้เลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ลดลง และอาจทำให้เกิดการช็อค (shock) และเสียชีวิตได้ด้วย ปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ การสร้าง exotoxin ซึ่งมีอยู่หลายชนิด (exotoxin บางชนิดมีฤทธิ์คล้ายคลึง

กันกับ exotoxin ที่สร้างจากแบคทีเรียชนิดอื่นใน Enterobacteriaceae family) ได้แก่ heat-stable enterotoxin และ heat-labile enterotoxin เป็นต้น โดย heat-labile enterotoxin มีคุณสมบัติเป็น A-B toxin คือประกอบด้วย A subunit และ B subunit โดย B subunit เป็นเพียงส่วนที่ใช้ในการจับกับผิวเซลล์เป้าหมาย (target cell) และ A subunit มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ซึ่งมีความเป็นพิษโดยตรงเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์เป้าหมายนั้น ตัวอย่างเช่น heat-labile enterotoxin ของ *E. coli* (มีคุณสมบัติคล้ายกับ cholera toxin ที่สร้างจาก *Vibrio cholerae*) มีฤทธิ์ทำให้เกิดกระบวนการ ADP ribosylation ของ G protein มีผลทำให้ระดับ cyclic AMP สูงขึ้น ส่งผลให้การขนส่งอิเลคโตรไลท์ (electrolyte) ของเซลล์เป้าหมายนั้นเสียไป และทำให้เกิดอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำหรือท้องร่วง (diarrhea) เป็นต้น การมี fimbriae (หรือ pili) เพื่อใช้สำหรับยึดเกาะ (adhesion factor) กับโฮสต์เซลล์ก็นับเป็นปัจจัยอีกประการหนึ่งในการช่วยให้เกิดโรค โดยมีรายงานว่า *E. coli* ที่มี colonization factor antigen fimbriae (CFA/I และ CFA/II) มักทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) *E. coli* ที่มี P fimbriae มักก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้นนอกจากที่กล่าวมาแล้วนั้น ปัจจัยอื่น ๆ ในการก่อโรคของ *E. coli* ได้แก่ ความสามารถในการเจริญและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ (intracellular survival and multiplication) และการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial resistance) เป็นต้น

โรคที่เกิดจาก *E. coli* ส่วนใหญ่มักเป็นการติดเชื้อแบบ endogenous infection ซึ่งหมายถึง *E. coli* ที่มีอยู่แล้วในร่างกายนั่นเองที่เป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรค และมักเกิดกับคนที่มีภูมิต้านทานโรคต่ำ (immunocompromised host) โรคที่พบบ่อยว่าเกิดจาก *E. coli* พอสรุปได้ดังนี้ (1) โลหิตเป็นพิษ (septicemia) *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของ septicemia บ่อยที่สุด โดยเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่กระแสเลือดนั้นมักมาจากการติดเชื้อที่เริ่มต้นในทางเดินปัสสาวะหรือทางเดินอาหารก่อน และอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคนี้จะสูงในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ (2) ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) โดยพบว่า 80% ของโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ และส่วนใหญ่ของโรคที่จัดเป็นโรคติดเชื้อจากการพักรักษาตัวในโรงพยาบาล (hospital-acquired infection) มีสาเหตุมาจาก *E. coli* และเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคก็เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารนั่นเอง *E. coli* serotype ที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ คือ O4, O6 และ O75 เนื่องจาก *E. coli* serotype เหล่านี้มักมีปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคคือ ไม่ถูกทำลายโดย specific antibody ใน serum ซึ่งอาจเกิดจากการสร้าง capsule ของเชื้อ การผลิต hemolysins และความสามารถในการจับ (binding) กับ epithelial cells ที่บุอยู่ภายในท่อทางเดินปัสสาวะ (uroepithelial cells) เป็นต้น (3) เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด (neonatal meningitis) *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อย (เช่นเดียวกับ group B streptococci) ว่าเป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด โดยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคนี้มักสร้าง K1 capsular antigen และ (4) กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โรคในกระเพาะอาหารและลำไส้ที่เกิดจาก *E. coli* อาจเป็นไปได้ตั้งแต่อาการไม่รุนแรงจนกระทั่งทำให้เสียชีวิตได้ *E. coli* ที่ก่อให้เกิด gastroenteritis แบ่งตามการทำให้เกิดโรค (pathogenesis) ได้เป็น 5 กลุ่มคือ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) และ enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Gastroenteritis ที่เกิดจาก *Escherichia coli*

Organism	Disease	Pathogenesis
Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)	Traveler's diarrhea; infant diarrhea in underdeveloped countries; watery diarrhea, cramps, nausea, low-grade fever	Heat-stable and/or heat-labile enterotoxins; stimulate guanylate or adenylate cyclase activity with fluid and electrolyte loss
Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)	Fever, cramping, water diarrhea followed by development of dysentery with scant, bloody stools	Plasmid-mediated invasion and destruction of epithelial cells lining colon
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)	Infant diarrhea with fever, nausea, vomiting, nonbloody stools	Plasmid-mediated adherence and destruction of epithelial cells
Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)	Hemorrhagic colitis with severe abdominal cramps, watery diarrhea initially, followed by grossly bloody diarrhea, little or no fever; hemolytic uremic syndrome (HUS)	Mediated by cytotoxic "verotoxin"
Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)	Persistent infant diarrhea, sometimes with gross blood, low-grade fever	Aggregative adherence mediaed by 60 MDa plasmid

(Murray et al., 1994)

enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็น *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคโดยอาศัยฤทธิ์ของ heat-labile และ heat-stable enterotoxin ที่เชื้อสร้าง enterotoxin ทั้งสองชนิดนี้ถูกควบคุมโดยยีนในพลาสมิด (plasmid) และความรุนแรงจะเพิ่มมากขึ้นถ้าเชื้อมี pili ที่ใช้ในการยึดเกาะกับ epithelial cell (ตัวอย่างชนิดหรือ serotypes ของ pili ที่ช่วยเพิ่ม virulence ของเชื้อ ได้แก่ K88 พบในลูกหมู K99 พบในลูกวัว และ CFA/I & CFA/II พบในคน เป็นต้น) อาการที่พบเมื่อมีการติดเชื้อ คือ หลังจากร่างกายได้รับเชื้อ จะมีระยะฟักตัว (incubation period) ประมาณ 1-2 วัน จากนั้นผู้ป่วยจะมีอาการท้องร่วงเป็นเวลา 3-4 วัน อาการอาจไม่รุนแรง และอาจมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียน มีไข้ต่ำ ๆ

enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็น *E. coli* ที่สามารถบุกรุกทำลาย epithelial cells ที่ผนังลำไส้ อาการสำคัญคือ มีไข้ ปวดและเสียดท้อง มีเลือดออกปะปนมาในอุจจาระ (อาการคล้ายกับโรคบิดที่เกิดจากเชื้อ *Shigella dysenteriae*) เชื่อว่า *E. coli* ที่มี O antigen บางชนิดสัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้

enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็น *E. coli* ที่สามารถยึดเกาะได้กับ enterocyte (intestinal absorptive cells) ซึ่งเป็น epithelial cells ที่บุอยู่บริเวณลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ และส่งผลให้เกิดการทำลาย microvilli ตรงบริเวณที่เชื้อเข้าไปยึดเกาะ โมเลกุลที่แบคทีเรียใช้ในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ (adhesion molecules) มีอยู่ 2 ชนิด โดยชนิดหนึ่งถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม และอีกชนิดหนึ่งถูกควบคุมโดยยีนในพลาสมิด enteropathogenic *E. coli* เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยว่าทำให้เกิดโรคท้องร่วงในเด็กโดยเฉพาะในประเทศที่ด้อยพัฒนา

enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็น *E. coli* ที่สามารถสร้างสารพิษที่มีฤทธิ์คล้ายกับ shiga toxin (shiga-like toxin) หรือเรียกว่า verotoxin (ที่มาของชื่อเกิดจากสารพิษนี้สามารถทำให้เกิด cytopathic effect กับ Vero cell line) verotoxin สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ (1) ชนิดที่เหมือนกับ shiga toxin เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันเพียงแค่กรดอะมิโนเพียงตัวเดียวเท่านั้น และ (2) ชนิดที่เหมือนกับ shiga toxin เพียงหกสิบเปอร์เซ็นต์ อาการของโรคที่เกิดจาก enterohemorrhagic *E. coli* อาจเป็นไปได้ตั้งแต่ไม่รุนแรงจนถึงรุนแรง ในกรณีที่รุนแรงมากอาจทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า hemolytic uremic syndrome ซึ่งจะมีอาการ ไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) และเกิดภาวะโลหิตจางชนิด microangiopathic hemolytic anemiaประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของโรคนี้เกิดจาก *E. coli* serotype O157:H7 โรคนี้พบบ่อยในช่วงอากาศร้อน และพบบ่อยในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี สาเหตุมักเกิดจากการกินเนื้อที่ปรุงไม่สุก หรือดื่มนมที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอไรซ์

enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) เมื่อก่อนเคยเรียกว่า enteroadherent *E. coli* เป็น *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในเด็กทารกในประเทศที่กำลังพัฒนา aggregative protein ที่เชื้อสร้างถูกควบคุมโดยยีนในพลาสมิด (60 MDa plasmid)

การรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ขึ้นอยู่กับโรคหรือพยาธิสภาพ โดยปกติการรักษาอาการท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* มักไม่นิยมใช้ยา แต่จะให้ผงน้ำตาลเกลือแร่เพื่อทดแทนการสูญเสียน้ำและอิเลคโตรไลท์ของร่างกาย แต่หากผู้ป่วยมีอาการท้องร่วงจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรง ควรให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เช่น ยาในกลุ่ม fluoroquinolone ร่วมกับการให้ผงน้ำตาลเกลือแร่ การรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินปัสสาวะควรให้ยาในกลุ่ม fluoroquinolone อย่างน้อย 7 วัน ร่วมกับการปรับสภาพปัสสาวะให้เป็นกรดโดยการให้ผู้ป่วยดื่มน้ำผลไม้ที่มีกรดมาก ๆ หรือดื่มน้ำมาก ๆ เพื่อช่วยในการกำจัดเชื้อออกมากับน้ำปัสสาวะ ส่วนทารกที่ติดเชื้อและมีการอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สามารถรักษาด้วยการให้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams เนื่องจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกเป็นเชื้อที่มีการดื้อยาสูง ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะอาจจะต้องทดสอบความไวของเชื้อต่อยา (drug sensitivity) ก่อน และผู้ป่วยควรได้รับยาอย่างต่อเนื่องและครบถ้วนเพื่อป้องกันการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย

ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams เป็นยาที่มีโครงสร้าง β-lactam ring เป็นพื้นฐาน นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรีย ยาในกลุ่มนี้เป็นยาที่มีการพัฒนาอย่างหลากหลาย แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก ๆ คือ (1) penicillins แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก คือ (1.1) natural penicillins ได้แก่ penicillin G, penicillin V ซึ่งยากลุ่มนี้ไม่ทนต่อ penicillinase แต่มีประสิทธิภาพสูงต่อแบคทีเรียแกรมบวกและสไปโรชีต (spirochete) (1.2) penicillinase resistant penicillin เช่น methicillin, oxacillin ใช้ในแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเอนไซม์ penicillinase (1.3) aminopenicillin เช่น ampicillin และ amoxicillin เป็นยาที่ไม่ทนต่อเอนไซม์ penicillinase ใช้ได้ผลดีกับแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด (1.4) extended-spectrum penicillin เช่น piperacillin ใช้ได้ผลกับแบคทีเรียแกรมลบ (2) cephalosporins ยากลุ่มนี้ได้รับการพัฒนาจนสามารถทนต่อเอนไซม์ penicillinase ใช้ได้ดีกับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แบ่งออกเป็น 4 generations ตามความกว้างในการออกฤทธิ์และการทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ดังนี้ (2.1) first generation cephalosporins เช่น cephalothin, cefazolin ใช้ได้กับ

แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Klebsiella* spp., *E. coli* และ *Proteus mirabilis* เป็นต้น ยาใน generation นี้ไม่ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase (2.2) second generation cephalosporins เช่น cefuroxime มีประสิทธิภาพดีกว่า first generation cephalosporins คือ ทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ทำให้มีการออกฤทธิ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้น ส่วน cefoxitin ซึ่งเป็นยาในรุ่นที่สอง สามารถทนต่อ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) ได้ (2.3) third generation cephalosporins เช่น cefpodoxime, ceftriazone มีประสิทธิภาพดี ใช้ได้กับแบคทีเรียแกรมลบและ แกรมบวก (2.4) fourth generation cephalosporins เช่น cefepime มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมลบกว้างกว่า และทนต่อเอนไซม์ cephalosporinase ได้ดี (3) monobactams เช่น azteronam เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งได้ค่อนข้างดี และทนต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ β-lactamase การดื้อยา azteronam อาจพบได้ในเชื้อ *Klebsiella oxytoca* ที่สามารถสร้าง K1 β-lactamase มาทำลายยาได้ และ (4) cabapenems เช่น imipenem และ meropenem เป็นสารที่มี β-lactam ring ที่ออกฤทธิ์กว้าง โดยยาสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี และทนต่อเอนไซม์ β-lactamase รวมทั้ง ESBL นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ β-lactamase ที่เรียกว่า β-lactamase inhibitor เช่น clavulanic acid และ sulbactam ซึ่งมีคุณสมบัติคือ เป็นสารที่ทนต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ β-lactamase ได้ โดยมักใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม β-lactams ซึ่งสารดังกล่าวนี้จะไปจับกับเอนไซม์ β-lactamase ทำให้ยา β-lactam สามารถออกฤทธิ์ได้

ตั้งแต่มีการค้นพบยา penicillin และมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคเมื่อปี ค.ศ. 1940 เป็นต้นมานั้น การรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* ด้วยยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams ถือว่าได้ผลค่อนข้างดี แต่ในช่วงประมาณปี ค.ศ. 1970-1980 เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์รวมถึงแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* หลายชนิดเริ่มมีการพัฒนาตัวเอง จนสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดในกลุ่ม penicillin และ cephalosporin derivatives และเมื่อประมาณ 10 ปีก่อนหน้านี้ แบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะ *E. coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้พัฒนาตนเองจนสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams ได้หลากหลายชนิดมาก โดยแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า extended-spectrum β-lactamase (ESBL) (Ilse et al., 2011) ส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวนี้ทำได้ยากและเป็นปัญหามากขึ้นเรื่อย ๆ จนบางครั้งไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดการดื้อยาได้ ส่งผลให้อัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น สิ้นเปลืองยาและบุคลากรทางการแพทย์ และหากไม่สามารถหาแนวทางมาควบคุมหรือป้องกันการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ได้ ก็จะเหมือนย้อนเข้าสู่ยุคก่อนที่จะมีการค้นพบยาปฏิชีวนะ (pre-antibiotic era) อีกครั้ง

กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโดยทั่วไปอาจแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลัก ๆ คือ (1) การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา (target alteration) การดื้อยาโดยวิธีนี้พบว่าเชื้อมีการสร้างเป้าหมายใหม่เพื่อให้ยาออกฤทธิ์ได้น้อยลง จึงส่งผลให้เชื้อนั้นดื้อต่อยา เนื่องจากยาไม่สามารถจับกับเป้าหมายเดิมที่เคยออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพได้ เช่น การสร้าง PBP 2a (low-affinity penicillin-binding protein) ในเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นต้น (2) การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (antimicrobial detoxification) แบคทีเรียหลายชนิด

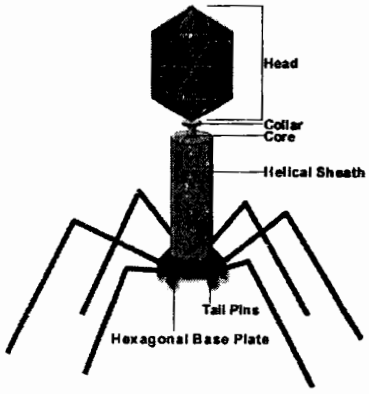
สามารถทำลายยาปฏิชีวนะ ทำให้ยามีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา penicillin จะทำลายยา penicillin ให้กลายเป็น penicilloic acid ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างเอนไซม์ β-lactamase โดยเอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็นหลายประเภทตามชนิดของยา และเอนไซม์นี้ยังอาจสร้างโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม ยีนที่อยู่บนพลาสมิด หรือทรานสโปซอน (transposon) ก็ได้ อีกทั้งยังอาจเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างออกมาตลอดเวลาหรือเป็นเอนไซม์ที่สร้างเฉพาะเมื่อมี substrate เท่านั้นก็ได้ และ (3) การลดการนำยาเข้าสู่เซลล์ (decreased uptake) โดยปกติยาปฏิชีวนะจะออกฤทธิ์ได้จะต้องซึมผ่านเข้าสู่ตัวเซลล์ของแบคทีเรียก่อน ซึ่งวิธีการซึมผ่านเข้าสู่ตัวเซลล์แบคทีเรียนี้อาจเป็นแบบใช้พลังงานหรือไม่ใช้พลังงานก็ได้ ช่องทางที่ยาปฏิชีวนะจะเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย คือ outer membrane protein ที่เรียกว่า porin โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะมี porin ที่สำคัญอยู่ 5 ชนิด คือ OmpC, OmpF, LamD, PhoE และ protein K ซึ่งช่องทางเหล่านี้เป็นทางเข้าของยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่โดยเฉพาะยาใน กลุ่ม β-lactams และ quinolones ทั้งนี้การลดการนำเข้าของยาของแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจเกิดด้วยวิธีการที่แตกต่างกันไป

extended-spectrum β-lactamase (ESBL) พบครั้งแรกประมาณช่วงปี ค.ศ. 1960 เป็นเอนไซม์ที่มักพบว่าสร้างมาจากยีนที่อยู่ใน plasmid ของแบคทีเรียที่ดื้อยา โดยเอนไซม์นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ TEM และ SHV เอนไซม์ TEM-1 และ SHV-1 ถือเป็นต้นแบบหรือเรียกว่า parent enzyme ของแต่ละกลุ่มตามลำดับ ซึ่งทั้ง TEM-1 และ SHV-1 จะมีฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์สามารถดื้อต่อยา ampicillin และหากแบคทีเรียชนิดใดผลิตเอนไซม์ดังกล่าวนี้ในปริมาณมาก อาจมีผลทำให้แบคทีเรียนั้นดื้อต่อยา piperacillin และยาในกลุ่ม narrow-spectrum cephalosporins เช่น cefazolin ได้ด้วย ต่อมาในราวปี ค.ศ. 1970 ถึง 1980 ก็พบว่า TEM-1 และ SHV-1 มีฤทธิ์ขยายเพิ่มขึ้น คือ สามารถทำลายยาในกลุ่ม extended-spectrum cephalosporins เช่น cefotaxime, ceftriaxone และ ceftazidime ได้ด้วย ต่อมาเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาเหล่านี้เป็นระยะเวลานาน ๆ สุดท้ายเชื้อก็สามารถพัฒนาการดื้อยาจนสามารถดื้อต่อยาในกลุ่ม extended-spectrum cephalosporins ที่มีส่วนของ oxyimino group นอกจากนี้ยังพบว่ายีนที่ควบคุมการสร้าง ESBL ยังสามารถพบได้ใน transposon ด้วย โดยยีนที่ควบคุมการดื้อยาสามารถแพร่กระจายไปได้ง่ายและรวดเร็วมากในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเชื้อ *E. coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ในปัจจุบันแบคทีเรียที่สร้าง ESBL ไม่ได้ดื้อยาเพียงแค่ aminopenicillins, ureidopenicillins และ narrow-spectrum cephalosporins เท่านั้นแต่ดื้อต่อทั้ง extended-spectrum cehalosporins และ aztreonam ด้วย ยาที่ยังใช้ได้ผลกับเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL คือ cephamycins และ carbapenems ปัจจุบันมีรายงานว่าพบ ESBL มากกว่า 120 ชนิด โดยแต่ละชนิดมีผล drug sensitivity profile ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่ส่งผลให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ทำได้ค่อนข้างยากกว่าเดิมมาก จากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียตามที่กล่าวมานี้ ส่งผลให้นักวิทยาศาสตร์ต้องพยายามมองหาทางเลือกหรือแนวทางใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อ เพื่อทดแทนหรือลดการใช้หรือการพึ่งพายาปฏิชีวนะให้น้อยลง

แนวทางหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือการนำแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า เฟจ (phage) มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ โดยเรียกวิธีการรักษาโรคติดเชื้อโดยใช้เฟจว่า bacteriophage therapy หรือ phage therapy (Richard,

1999) โดยหลักฐานยืนยันเกี่ยวกับความเป็นไปได้ของการนำ phage therapy มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อนั้นเริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 โดยการศึกษาเกี่ยวกับ phage therapy นั้นในระยะเริ่มแรกมักจะทำการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยเฉพาะในประเทศทางแถบซีกโลกตะวันตก และได้ผลเป็นที่น่าพอใจกับโรคติดเชื้อหลายชนิดที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli, P. aeruginosa, Acinetobacter baumannii, K. pneumoniae, V. vulnificus* และ *Salmonella* spp. และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Enterococcus faecium* และ *S. aureus* เป็นต้น และต่อมาภายหลังก็เริ่มมีการนำ phage therapy มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในคน (Richard, 1999; Slopex and Kucharewicz-Krukowska, 1987) ปัจจุบันแนวโน้มการนำ phage therapy มาใช้ในการรักษายิ่งทวีความจำเป็นมากขึ้น โดยเฉพาะเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิด [multidrug-resistant (MDR) bacteria] ได้แก่ vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), vancomycin intermediate-resistant *S. aureus* (VISA) และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) เป็นต้น (Richard, 1999; Shigenobu et al., 2005)

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัส (virus) ของแบคทีเรีย มีโครงสร้างหรือส่วนประกอบสำคัญคือ สารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลิอิก (nucleic acid) และโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรมเรียกว่า แคปซิด (capsid) ซึ่งอาจมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม เช่น icosahedral เป็นต้น สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจอาจเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง และอาจมีรูปร่างเป็นเส้น (linear) เป็นวง (circular) หรือแบ่งเป็นหลายอัน (segmented) ก็ได้ สารพันธุกรรมที่ถูกหุ้มด้วยแคปซิดนี้บางทีอาจเรียกว่า ส่วนหัว (head) แบคเทอริโอเฟจบางชนิดอาจมีส่วนประกอบเพิ่มเติมคือ มีส่วนซึ่งมีลักษณะเป็นท่อยาวต่อจากส่วนหัว เรียกว่า ส่วนหาง (tail) และบริเวณส่วนหางนี้อาจพบโครงสร้างอื่น ๆ ได้ด้วย เช่น base plate, tail fiber เป็นต้น (รูปที่ 3) การมีหรือไม่มีส่วนหาง และการยืด-หดได้ของส่วนหางสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจได้ด้วย (Ackermann, 2003)



รูปที่ 3 ตัวอย่างรูปร่างและส่วนประกอบสำคัญของแบคเทอริโอเฟจ
(ที่มา: http://sahsrojas.pbworks.com/w/page/3718275/Bacteriophage)

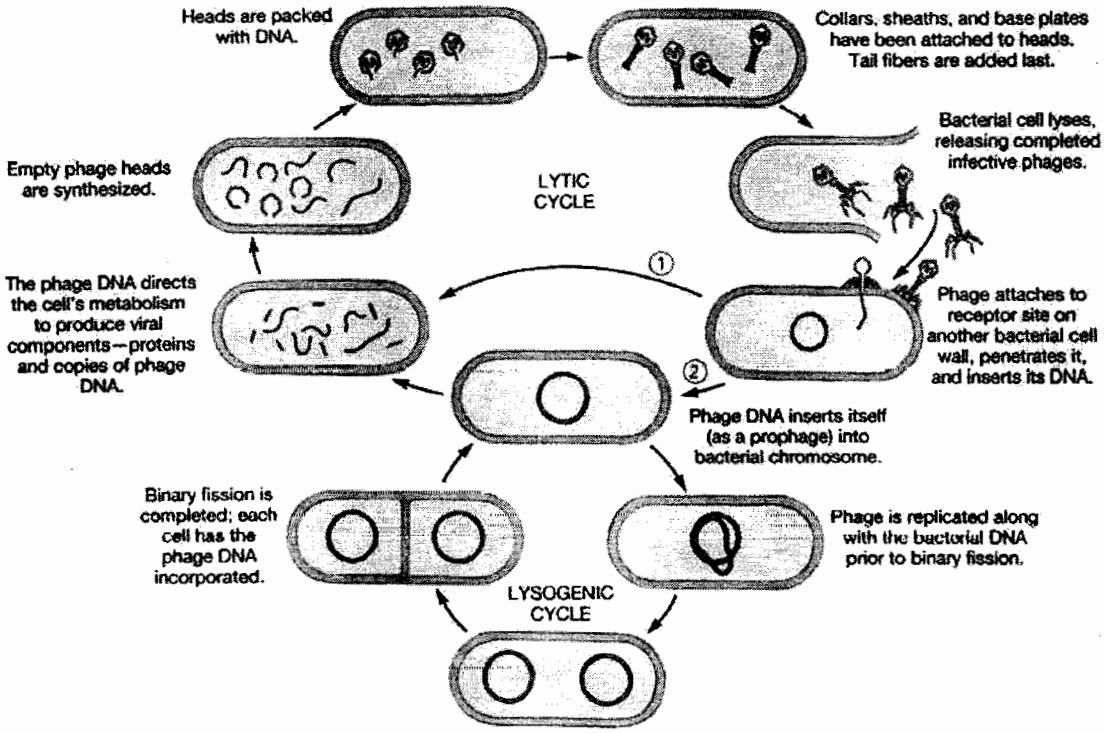
แบคเทอริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์สองท่านในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันคือ ในปี ค.ศ.1915 Dr. Frederick William Twort นักพยาธิวิทยาชาวอังกฤษได้ทำการวิจัยพบไวรัสที่สามารถทำให้แบคทีเรีย *Micrococcus* กลายพันธุ์ และในปี ค.ศ.1917 Dr. Felix Hubert d'Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสค้นพบไวรัสที่สามารถทำให้เซลล์แบคทีเรีย *Shigella* เกิดการ

แตกสลาย (lysis) อีกทั้ง Dr. d'Herelle ยังเป็นบุคคลแรกที่ใช้คำว่า "bacteriophage" ในการเรียกไวรัสที่สามารถบุกรุก (infect) หรือทำลายเซลล์แบคทีเรีย

โดยทั่วไปการบุก (infection) ของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่โฮสต์เซลล์ (host cell) มักจะมีความจำเพาะสูงมาก (highly specific) กล่าวอีกนัยหนึ่งคือแบคเทอริโอเฟจชนิดใดชนิดหนึ่งก็มักจะทำลายแบคทีเรียเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์เซลล์นั้น เกิดขึ้นโดยอาศัยการจับกันระหว่างตำแหน่งที่อยู่บนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจเรียกว่า attachment site กับตำแหน่งที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเรียกว่า receptor site จากนั้นสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจก็จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย และเริ่มต้นเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวน (replication) ของแบคเทอริโอเฟจต่อไป

การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ แบบ lysis (lytic cycle) และแบบ lysogeny (lysogenic cycle) (รูปที่ 4) การเพิ่มจำนวนแบบ lysis เมื่อสารพันธุกรรมถูกนำเข้ามาภายในเซลล์แล้ว กลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของแบคทีเรียโดยปกติจะหยุดชะงักลง เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปควบคุมและใช้กลไกต่าง ๆ เหล่านั้นเพื่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจเท่านั้น โดยเริ่มจากสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจำลองสารพันธุกรรม แล้วจึงสร้างโปรตีนหรือส่วนประกอบของแคปซิดและโครงสร้างอื่น ๆ จากนั้นส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นมาเป็นจำนวนมากนี้จึงมารวมกัน (assembly) กลายเป็นแบคเทอริโอเฟจสมบูรณ์จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์ แบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นใหม่นี้เรียกว่า progeny bacteriophage โดยระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่แบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าสู่เซลล์และเกิด progeny bacteriophage อาจใช้เวลาเพียงเล็กน้อย เช่น 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ และในที่สุดแบคเทอริโอเฟจก็จะสร้างสารบางอย่างออกมาทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จนผนังเซลล์เกิดการแตกสลาย (lysis) และปล่อย progeny bacteriophage จำนวนมากเหล่านั้นออกมานอกเซลล์ จากนั้น progeny bacteriophage ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับแบคเทอริโอเฟจเริ่มแรกที่เข้าสู่เซลล์ ก็พร้อมที่จะเข้าสู่แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่อยู่ข้างเคียงต่อไป (Medigan et al., 1997) การบุกรุกหรือทำลายเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจแบบ lysis นี้ ในที่สุดจะทำให้แบคทีเรียหมดไปจากบริเวณที่มีแบคเทอริโอเฟจชนิดนั้นอยู่ ส่วนการเพิ่มจำนวนแบบ lysogeny แบคเทอริโอเฟจที่สามารถเพิ่มจำนวนแบบนี้ได้เรียกว่า temperate phage เมื่อสารพันธุกรรมถูกนำเข้ามาภายในเซลล์แล้ว แบคเทอริโอเฟจจะนำสารพันธุกรรมนั้นเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจที่แทรกอยู่ในโครโมโซมนี้เรียกว่า prophage และเมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวน สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจก็จะมีการจำลองตัวเองไปพร้อมกัน และยังคงแทรกอยู่ในโครโมโซมเช่นเดิม โดยไม่ทำให้เกิด progeny bacteriophage ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจแบบ lysogeny จึงไม่ทำให้เกิดการแตกสลายหรือการตายของแบคทีเรีย (Vegge et al., 2005) แต่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ (mutation) ของแบคทีเรียได้ ในบางสภาวะ prophage อาจหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียและสามารถกลับเข้าสู่การเพิ่มจำนวนแบบ lysis ได้ เรียกปรากฏการณ์เช่นนี้ว่า induction สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด induction ได้แก่ การกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือสารเคมีบางชนิด เป็นต้น ทั้งนี้แบคเทอริโอเฟจที่นิยมนำไปใช้ในงานทางด้าน phage therapy เพื่อ

หวังผลให้แบคเทอริโอเฟจไป infect แบคทีเรียก่อโรคและทำให้เกิดการตายหรือแตกสลายไปของแบคทีเรียนั้น จึงเป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีการเพิ่มจำนวนแบบ lytic cycle



รูปที่ 4 การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรีย
(ที่มา: http://arthropodsbio11cabe.wikispaces.com/Viruses.)

ในอดีตการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจยังไม่ค่อยมีกฎเกณฑ์ที่ตายตัว แต่ขึ้นอยู่กับว่าจะยึดถือตามเกณฑ์ของนักวิทยาศาสตร์ท่านใด แต่ปัจจุบันการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจเริ่มมีเกณฑ์มาตรฐานมากขึ้น เนื่องจากมีหน่วยงานที่ทำหน้าที่ในการกำหนดเกณฑ์และวิธีการจัดจำแนกไวรัส เพื่อใช้เป็นมาตรฐานเดียวกันคือ International Committee for Taxonomy of Viruses หรือ ICTV โดยได้จัดจำแนกไวรัสออกเป็น 3 order, 61 family และ 241 genus การตั้งชื่อไวรัสโดยทั่วไปจะใช้ภาษาละตินหรือกรีก ชื่อ order จะลงท้ายด้วย *-virales* ชื่อ family จะลงท้ายด้วย *–viridae* และชื่อ genus จะลงท้ายด้วย *–virus* (Ackermann, 2003) แบคเทอริโอเฟจทุกชนิดถูกจัดอยู่ใน order เดียวกัน คือ *Caudovirales* โดยแบ่งออกเป็น 13 family และ 30 genus (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ (1) Tailed phage คือแบคเทอริโอเฟจที่มีหาง (2) Polyhedral phage คือแบคเทอริโอเฟจที่หัวมีรูปร่างหลายเหลี่ยม (3) Filamentous phage คือแบคเทอริโอเฟจที่มีลักษณะคล้ายเส้นใย จึงไม่มีการแบ่งเป็นส่วนหัวหรือหาง และ (4) Pleomorphic phage คือแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (ตารางที่ 2 และรูปที่ 5) ซึ่งรายละเอียดเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจแต่ละกลุ่มจะกล่าวถึงต่อไป แบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded DNA, single-stranded RNA หรือ double-stranded RNA แบคเทอริโอเฟจที่ค้นพบ

แล้วส่วนใหญ่เป็นพวก tailed phage ซึ่งเท่าที่มีรายงานอยู่ในขณะนี้มีอยู่ประมาณ 4950 ชนิด (Ackermann, 2003) นอกจากนี้ยังมีแบคเทอริโอเฟจบางชนิดที่มีเอ็นเวลลอป (envelope) ซึ่งเป็นสารจำพวกไขมันห่อหุ้มแคปซิดไว้อีกชั้นหนึ่ง แต่แบคเทอริโอเฟจแบบนี้พบน้อยมาก

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกชนิดและคุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

Shape	Nucleic acid	Families	Genera	Exam-ples	Members	Characteristics
Tailed	DNA, ds, L	*Myoviridae*	6	T4	1243	Tail contractile
	DNA, ds, L	*Siphoviridae*	6	λ	3011	Tail long, noncontractile
	DNA, ds, L	*Podoviridae*	3	T7	696	Tail short
Polyhedral	DNA, ss, C	*Microviridae*	4	ϕX174	40	-
	DNA, ds, C, T	*Corticoviridae*	1	PM2	3	Complex capsid, lipids
	DNA, ds, L	*Tectiviridae*	1	PRD1	18	Internal lipoprotein vesicle
	RNA, ss, L	*Leviviridae*	2	MS2	39	-
	RNA, ds, L, S	*Cystoviridoe*	1	ϕ6	1	Envelope, lipids
Filamentous	DNA, ss, C	*Inoviridae*	2	Fd	57	Filaments or rods
	DNA, ds, L	*Lipothrixviridae*	1	TTV1	6	Envelope, lipids
	DNA, ds, L	*Rudiviridae*	1	SIRV1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	*Plasmaviridae*	1	L2	6	Envelope, lipids, no capsid
	DNA, ds, C, T	*Fuselloviridae*	1	SSV1	8	Spindle-shaped, no capsid

C = circular; L = linear; S = segmented; T = superhelical; ss = single-stranded; ds = double-stranded

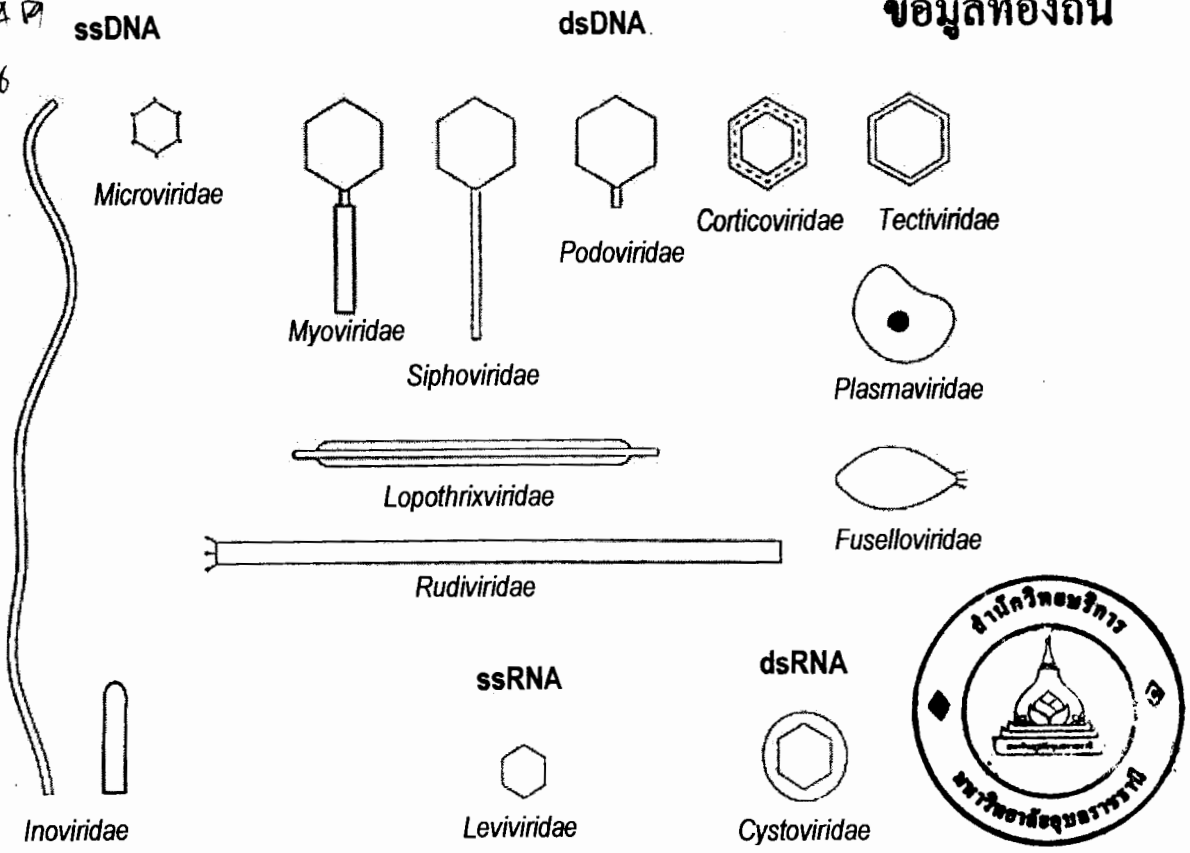
(Ackermann, 2003)

tailed phage เป็นแบคเทอริโอเฟจกลุ่มที่พบมากที่สุด โดยมีอยู่ประมาณ 96% ของแบคเทอริโอเฟจทั้งหมด ลักษณะโดยทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ ส่วนหัวมีลักษณะสมมาตรแบบลูกบาศก์ (cubic symmetry) เรียกว่า icosahedral head โปรตีนโครงสร้างของส่วนหางมีการเรียงตัวแบบเกลียวเรียกว่า helical tail สารพันธุกรรมมีลักษณะเป็นเส้น ชนิด double-stranded DNA ซึ่งมีเพียงอันเดียว สารพันธุกรรมถูกล้อมรอบด้วยแคปซิด แต่ไม่มีเอ็นเวลลอป ขนาดของสารพันธุกรรมและความยาวของส่วนหางแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอเฟจ สารพันธุกรรมอาจมีขนาดตั้งแต่ 17 จนถึงมากกว่า 700 กิโลเบส (kb) และส่วนหางอาจมีความยาวตั้งแต่ 10 ถึง 800 นาโนเมตร (nm) tailed phage แบ่งออกเป็น 3 family คือ (1) *Myoviridae* ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจชนิดที่หางสามารถยืด-หดได้ มี sheath หุ้มรอบหาง และมีแกนกลางอยู่ในส่วนหางเรียกว่า central tube แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้พบอยู่ประมาณ 25% ของ tailed phage ทั้งหมด และแบ่งย่อยออกเป็น 6 genus คือ T4, P1, P2, Mu, SPO1 และ ϕH (2) *Siphoviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาว แต่ไม่สามารถยืด-หดได้ แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดของ tailed phage เนื่องจากพบได้ประมาณ 61% ของ tailed phages ทั้งหมด สามารถแบ่งออกเป็น 6 genus คือ λ, T1, T5, L5, c2 และ ψM และ (3) *Podoviridae* เป็น แบคเทอริโอเฟจที่มีหางสั้น พบได้ประมาณ 14% ของ tailed phage ทั้งหมด แบ่งออกเป็น 3 genus คือ T7, P22 และ ϕ29

polyhedral phage เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม สารพันธุกรรมอาจเป็น single-stranded DNA, double-stranded DNA, single-stranded RNA หรือ double-stranded RNA ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ polyhedral phage แบ่งออกเป็น 5 family ดังนี้ (1) *Microviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจขนาดเล็ก ไม่มีเอ็นเวลลอป สารพันธุกรรมมีเพียงอันเดียว มีลักษณะเป็นวง และเป็น single-stranded DNA แบ่งออกเป็น 4 genus สมาชิกสำคัญของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้ คือ ϕX174 (2) *Corticoviridae* มีสารพันธุกรรมหนึ่งอันเป็น double-stranded DNA ลักษณะเป็นวง ถูกหุ้มด้วยแคปซิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสองชั้นโดยมี lipid bilayer แทรกอยู่ตรงกลางระหว่างชั้นของโปรตีน แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว มีสมาชิกที่สำคัญคือ PM2 (3) *Tectiviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีโครงสร้างของแคปซิดที่แข็งแรงซึ่งภายในมี lipoprotein vesicle เมื่อแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้เกาะที่ผิวของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ lipoprotein vesicle ดังกล่าวจะกลายเป็นท่อที่คล้ายหางของแบคเทอริโอเฟจ (tail-like tube) มีความยาวประมาณ 60 นาโนเมตร ซึ่งเป็นทางให้สารพันธุกรรมเคลื่อนที่ผ่านจากแบคเทอริโอเฟจไปยังโฮสต์เซลล์ แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว มีสมาชิกที่สำคัญคือ PRD1 (4) *Leviviridae* มีสารพันธุกรรมอันเดียว เป็น single-stranded RNA ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้น สารพันธุกรรมถูกหุ้มด้วยแคปซิดซึ่งมีโครงสร้างต่างจาก RNA viruses ทั่วไป มีรูปร่างคล้ายกับ poliovirus แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 genus สมาชิกสำคัญคือ MS2 (5) *Cystoviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded RNA และมีอยู่ถึง 3 อันหรือโมเลกุล (เรียกสารพันธุกรรมลักษณะเช่นนี้ว่าเป็นแบบ segmented) จึงเป็นลักษณะเด่นของแบคเทอริโอเฟจในกลุ่มนี้ แคปซิดถูกหุ้มไว้ด้วยเอ็นเวลลอปซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นไขมัน (lipid-containing envelope) แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ ϕ6

วท/ว
QR
342
ป555ค
2554

วท 4018
ข้อมูลท้องถิ่น



รูปที่ 5 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ
(ที่มา : http://www.smj.ejnal.com/e-journal/word/picture/article/smj/302/pic1.JPG)

filamentous phage เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างเป็นสายหรือคล้ายเส้นใย สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีทั้งแบบ single-stranded DNA และ double-stranded DNA แบ่งออกเป็น 3 family คือ (1) *Inoviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded DNA แบบวง แบ่งเป็น 2 genus ตามชนิดของโฮสต์เซลล์ที่แบคเทอริโอเฟจสามารถบุกรุก คือ *Inovirus* และ *Plectrovirus* สำหรับ *Inovirus* มีอยู่ 42 ชนิด ลักษณะเด่นคือ มีรูปร่างเป็นสายยาว (long filament) อาจแข็ง (rigid) หรือยืดหยุ่นได้ (flexible) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ เป็นแบคเทอริโอเฟจที่ไว (sensitive) ต่อคลอโรฟอร์ม (chloroform) แต่ทน (resistant) ความร้อนได้ดี โฮสต์เซลล์สำหรับแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Clostridium* และ *Propionibacterium* ส่วน *Plectrovirus* มีอยู่ 15 ชนิด ลักษณะเด่นคือ มีรูปร่างเป็นสายสั้น ๆ (short, straight rod) โฮสต์เซลล์สำหรับแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Mycoplasma* โดยทั่วไป แบคเทอริโอเฟจในกลุ่ม *Inoviridae* เมื่อเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์แล้ว progeny bacteriophage จะออกจากเซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์แตก สมาชิกสำคัญของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ fd (2) *Lipothrixviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบบเส้น รูปร่างของแบคเทอริโอ เฟจกลุ่มนี้มักเป็นแบบแท่ง (rod-like shaped) และมีเอ็นเวลลอป มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ TTV1 (3) *Rudiviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบบเส้น มีรูปร่างเป็นแท่งตรงแข็ง (straight, rigid rod) ไม่

มีเอ็นเวลลอป มองดูคล้ายกับ tobacco mosaic virus แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ SIRV1

pleomorphic phage เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน แบคเทอริโอเฟจทุกชนิดในกลุ่มนี้มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบบวง แบ่งออกเป็น 2 family คือ (1) *Plasmaviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่ไม่มีแคปซิด แต่มีเอ็นเวลลอปหุ้มสารพันธุกรรมไว้แทน แบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Mycoplasma* เมื่อแบคเทอริโอเฟจจะบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์ เอ็นเวลลอปของแบคเทอริโอเฟจจะเชื่อม (fuse) กับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของโฮสต์เซลล์ และหลังจากเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แล้วจะออกจากเซลล์โดยวิธี budding ซึ่งไม่ทำให้โฮสต์เซลล์แตก แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ L2 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจกลุ่มที่มีการศึกษาหรือมีข้อมูลน้อยมาก (2) *Fuselloviridae* มีรูปร่างคล้ายผลมะนาว (lemon-shaped) และมีหนามสั้น ๆ (short spike) อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาคแบคเทอริโอเฟจ แคปซิดประกอบด้วยโปรตีน (hydrophobic protein) สองชนิดและไขมันซึ่งได้มาจากส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ แคปซิดถูกทำลายได้ด้วยคลอโรฟอร์ม หลังจากเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แล้วจะออกจากเซลล์โดยวิธี extrusion แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ SSV1

หลังจากที่มีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจได้ไม่นาน ก็เริ่มมีการคิดนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ การศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคเทอริโอเฟจเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคในระยะแรกจะทำให้สัตว์ทดลองก่อน และต่อมาเมื่อเห็นว่าได้ผลดีก็จะเริ่มนำไปใช้กับคน ตัวอย่างเช่น ได้มีผู้ทำการทดลองนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ควบคุมโรคบิด (dysentery) ซึ่งเกิดจาก *Shigella* โดยให้ผู้ป่วยกินแบคเทอริโอเฟจ ผลปรากฏว่าหลังจากการให้กินแบคเทอริโอเฟจแค่เพียงครั้งเดียว อาการของผู้ป่วยก็ทุเลาลงอย่างมากและหายจากโรคภายในเวลาเพียงไม่กี่วัน (Sulakvelidze et al., 2001) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนั้นยังไม่ได้รับการยืนยันหรือตีพิมพ์เผยแพร่ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1921 Richard Bruynoghe และ Joseph Maisin ซึ่งถือว่าเป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ได้นำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคติดเชื้อที่ผิวหนังซึ่งเกิดจาก *Staphylococcus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบบ่อยว่าทำให้เกิดการติดเชื้อหลังผ่าตัด โดยวิธีการนำไปใช้รักษาคือ ฉีดแบคเทอริโอเฟจเข้าทางผิวหนังรอบ ๆ บริเวณแผลผ่าตัด เพื่อควบคุมและลดการติดเชื้อดังกล่าว ผลปรากฏว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถควบคุมการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Sulakvelidze et al., 2001) หลังจากนั้นเป็นต้นมาก็มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายกลุ่มที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ (ตารางที่ 3) และส่งผลให้การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคเป็นที่รู้จักและแพร่หลายมากขึ้น อีกทั้งยังมีหลายบริษัทที่ได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจมาศึกษาอย่างจริงจังและตั้งใจจะผลิตเป็นการค้า เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ ตลอดจนใช้ในการควบคุมหรือรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาซึ่งมีแนวโน้มว่าจะมีเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของ phage therapy ที่ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อในคน

Infection(s)	Etiologic agent(s)	Reference
Suppurative skin infections	*Pseudomonas, Staphylococcus, Klebsiella, Proteus,* and *E. coli*	Cislo et al., 1987
Postoperative wound infections in cancer patiens	*Staphylococcus* and *Pseudomonas*	Kochetkova et al., 1989
Various infections	*Staphylococcus, Klebsiella, E. coli, Pseudomonas,* and *Proteus*	Kucharewicz-Krukowska and Slopek, 1987
Bacterial dysentery and salmonellosis	*Shigella* and *Salmonella*	Miliutina and Vorotyntseva, 1993
Inflammatory urologic disease	*Staphylococcus, E. coli,* and *Proteus*	Perepanova et al., 1995
Gastrointestinal tract, skin, head, and neck infections	*Staphylococcus, Pseudomonas, E. coli, Klebsiella,* and *Salmonella*	Slopek et al., 1987
Cerebrospinal meningitis	*K. pneumoniae*	Stroj et al., 1999
Suppurative infections	*Staphylococcus* and various gram-negative bacteria	Weber-Dabrowska et al., 1987

ตารางที่ 4 บริษัทที่ทำงานวิจัยและศึกษาเกี่ยวกับ phage และ phage therapy

Company	Location	Web site address
Biophage Pharma Inc.	Canada	http://www.biophage.com/
Exponential Biotherapies, Inc	USA	http://www.expobio.com/
Gangagen Inc	USA	http://www.gangagen
Hexal Genentech	Germany	http://www.hexal-gentech.de/
InnoPhage	Portugal	http://www.innophage.com/
Intralytix, Inc	USA	http://www.intralytix.com/
New Horizons Diagnostics Inc	USA	http://www.nhdiag.com/Index.htm
Novolytics Ltd	United Kingdom	http://www.novolytics.co.uk/about_us.html
Phage Biotech Ltd	Israel	http://www.phage-biotech.com/
Phage International, Inc	USA	http://www.phageinternational.com/
Phage Therapy	Georgia	http://www.phagetherapycenter.com/
Targanta Therapeutics Inc	Canada	http://www.targanta.com/
Biochimpharm	Georgia	http://www.biochimpharm.ge/

(Andrew, 2006)

คุณสมบัติสำคัญของแบคเทอริโอเฟจชนิด lytic phage ที่น่าสนใจและทำให้ถูกนำมาใช้ในงาน phage therapy คือ (1) ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียหรือโฮสต์ให้แตกสลายหรือตายไป และ (2) ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจและโฮสต์ และด้วยคุณสมบัติสำคัญทั้งสองประการนี้ แบคเทอริโอเฟจจึงน่าที่จะสามารถนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะได้ (Andrew, 2006) อีกทั้งในทาง

ทฤษฎี แบคเทอริโอเฟจยังมีข้อดีที่เหนือกว่ายาปฏิชีวนะอีกหลายประการด้วย เช่น ไม่ทำลายแบคทีเรียที่เป็น normal flora ซึ่งอาศัยอยู่ในร่างกายคน สามารถเพิ่มจำนวนได้เองเมื่อเจอกับโฮสต์ที่จำเพาะ จึงไม่จำเป็นต้องใช้ขนาดหรือปริมาณสูงในการให้เข้าสู่ร่างกาย และไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ เป็นต้น (ตารางที่ 5) นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่าแบคเทอริโอเฟจให้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อดีกว่ายาปฏิชีวนะทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง (Sandeep, 2006) ตัวอย่างเช่น มีรายงานหนึ่งพบว่าเมื่อทดลองใช้แบคเทอริโอเฟจเพื่อรักษาหนูที่ติดเชื้อ *E. coli* ในปริมาณสูงซึ่งสามารถทำให้หนูตายได้ พบว่าหนูมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 92 เมื่อรักษาด้วยแบคเทอริโอเฟจ แต่มีอัตราการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 33 เมื่อรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Levin and Bull, 1996) และอีกรายงานหนึ่งพบว่าการใช้แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. aureus* เพื่อรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อแบบมีหนองในปอดและเยื่อหุ้มปอด โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งรักษาโดยใช้แบคเทอริโอเฟจและอีกกลุ่มหนึ่งรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ พบว่าการรักษาโรคด้วยแบคเทอริโอเฟจมีอัตราการหายจากโรคสูงถึงร้อยละ 82 ในขณะที่การรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะมีอัตราการหายจากโรคเพียงร้อยละ 64 นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจยังไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย และหากให้แบคเทอริโอเฟจแก่ผู้ป่วยโดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำยังสามารถช่วยให้อัตราการหายจากโรคสูงถึงร้อยละ 95 (Sulakvelidze et al., 2001)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจกับยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ

Bacteriophages	Antibiotics
1. มีความจำเพาะสูง (highly specific) ต่อแบคทีเรียเป้าหมาย (bacterial host or target bacteria)	1. มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแบบไม่จำเพาะ (non-specific or broad spectrum) สามารถทำลายได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) และแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora)
2. สามารถเพิ่มจำนวนได้ตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ จึงทำให้มีความเข้มข้นหรือปริมาณมากพอที่จะฆ่าเชื้อก่อโรคตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อได้	2. ถูกกำจัดโดยกระบวนการเมตาบอลิสมของร่างกาย ทำให้ความเข้มข้นที่เหลืออยู่ในร่างกายไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อก่อโรคตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ
3. ไม่มีผลข้างเคียง (side effect)	3. มีผลข้างเคียง (side effect) ที่รุนแรงหลายอย่าง หรือบางครั้งทำให้เกิดการแพ้ (allergy)
4. การดื้อต่อแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรียจะจำกัดอยู่เพียงแค่แบคทีเรียเป้าหมายที่เท่านั้น	4. การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไม่จำกัดอยู่แค่แบคทีเรียเป้าหมายแต่สามารถแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ด้วย
5. การค้นหาแบคเทอริโอเฟจชนิดใหม่ เพื่อใช้ทำลายแบคทีเรียที่ดื้อต่อแบคเทอริโอเฟจ (phage-resistant bacteria) ใช้เวลาไม่นานและทำได้ง่าย	5. การพัฒนาหรือคิดค้นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อทำลายแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic-resistant bacteria) ต้องใช้เวลานานและทำได้ยาก

(ปาริชาติ พุ่มขจร, 2552)

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้ *Escherichia coli*-ESBL (หรือ ESBL-producing *E. coli*) ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะ และยังใช้แบคทีเรียดังกล่าวในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคเทอริโอเฟจด้วย การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น (host range) ใช้แบคทีเรียทดสอบดังแสดงในตารางที่ 6

แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร BHI broth หรือ BHI agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การเก็บรักษาแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ เก็บในอาหารเหลว BHI broth ซึ่งมี glycerol เป็นส่วนประกอบ 15% (v/v) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการศึกษา host range ของแบคเทอริโอเฟจ

แบคทีเรียทดสอบ
Escherichia coli 0157:H7
Escherichia coli ATCC25922
Escherichia coli K-12
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853
Klebsiella pneumoniae ATCC27736
Klebsiella pneumoniae (Drug resistant strain)
Shigella dysenteriae ATCC13313
Salmonella enteritica serovar Typhi DMST5784
Vibrio cholerae O1, non O139 (DMST2873)
Enterobacter aerogenes (Drug resistant strain)
Acenitobacter baumannii (Drug resistant strain)

การเตรียมน้ำตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บน้ำตัวอย่างจำนวน 18 ตัวอย่างจากแหล่งน้ำต่าง ๆ เช่น น้ำเสีย น้ำทิ้ง น้ำในระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล เป็นต้น น้ำตัวอย่างที่ได้นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนขนาดใหญ่และสารแขวนลอยต่าง ๆ ออกไป เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้สำหรับทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในน้ำตัวอย่างในขั้นต่อไป

การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในน้ำตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในน้ำตัวอย่างใช้วิธี enrichment method ทำโดยนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในขั้นตอนก่อนหน้านี้ (ขั้นตอนการเตรียมน้ำตัวอย่าง) ไปกรองผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองเรียกว่า filtrated sample 1 นำ filtrated sample 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาผสมกับอาหาร BHI broth ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า (double strength BHI broth) ปริมาตร 5

มิลลิลิตร และเติม *E. coli*-ESBL ที่บ่มข้ามคืน (overnight culture) ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า filtrated sample 2 ซึ่งจะนำไปตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *E. coli*-ESBL ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ

การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage detection) ทำโดยวิธี spot test (Chang et. al., 2005) มีวิธีการดังนี้ นำ *E. coli*-ESBL ที่เลี้ยงในอาหาร BHI broth และเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดอาหาร BHI soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.4% และก่อนใช้ให้นำไปหลอมเพื่อให้วุ้นละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากันแล้วเททับให้ทั่วผิวหน้าอาหาร BHI agar รอให้อาหาร BHI soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว (ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที) จากนั้นหยด filtrated sample 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อรอให้ตำแหน่งที่หยด filtrated sample 2 ลงไปนั้นแห้ง แล้วจึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นให้สังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด filtrated sample 2 ถ้ามี clear zone เกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าใน filtrated sample 2 นั้นน่าจะมีแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *E. coli*-ESBL

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจ

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage propagation) และยืนยันว่า filtrated sample 2 ที่ทำให้เกิด clear zone โดยวิธี spot test คือแบคเทอริโอเฟจ ทำโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดหรือลอกตรงบริเวณที่เกิด clear zone (เอาเฉพาะเนื้อวุ้นที่อยู่ชั้นบนซึ่งก็คือชั้นของ soft agar) ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมี *E. coli*-ESBL เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า bacteriophage suspension นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจ

การนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจหรือการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriphage titer) ซึ่งรายงานเป็นค่า plaque-forming unit/ml (pfu/ml) ใช้วิธี double-layer agar method (Adams, 1959) วิธีการคือ นำตัวอย่างที่ต้องการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในอาหาร BHI broth จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหาร BHI soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม *E. coli*-ESBL ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบน

อาหาร BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 20-200 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml) = จำนวน plaque x10 xระดับความเจือจาง

การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น

การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น (host range) ใช้วิธี spot test ดังนี้ นำแบคทีเรียทดสอบ (ตารางที่ 6) ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร BHI soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร BHI agar รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว หยด bacteriophage suspension ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร BHI soft agar ดังกล่าว โดยหยดลงบริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อรอให้ตำแหน่งที่หยด bacteriophage suspension ลงไปนั้นแห้ง นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิด clear zone ตรงตำแหน่งที่หยด bacteriophage suspension ถ้ามี clear zone เกิดขึ้นแสดงว่า แบคเทอริโอเฟจสามารถทำลายแบคทีเรียทดสอบชนิดนั้นได้

การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์

การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ (bacteriophage purification) ทำตามวิธีของ Watanabe และคณะ (1970) ดังนี้ เลี้ยง *E. coli*-ESBL ในอาหาร BHI broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเชื้อมีค่า O.D. 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 จากนั้นเติม bacteriophage suspension ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (10^5 pfu/ml) แล้วนำไปบ่มต่อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 28,500 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เก็บตะกอนมาละลายใน phage buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร สารละลายที่ได้จะเรียกว่า purified bacteriophage ซึ่งจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจในขั้นตอนต่อไป

การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษารูปร่าง (morphology) ของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนทำตามวิธีของ Caso และคณะ (1995) โดยนำ purified bacteriophage 1 หยด (ประมาณ 10 ไมโครลิตร) หยดลงบน grid ที่ฉาบด้วยคาร์บอน (carbon-coated grid) ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมแบบ negative ด้วย 2% (w/v) uranyl acetate (pH 4.0) ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) การจำแนกชนิด

ของแบคเทอริโอเฟจอาศัยเกณฑ์ (criteria) ที่กำหนดโดย International Committee of Taxonomy of Viruses

การสกัดและศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

นำ bacteriophage suspension มาสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ restriction endonucleases *Bam*HI ตามสภาวะที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์กำหนด (Promega) หลังจากสารพันธุกรรมถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมไปศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis

วิธี agarose gel electrophoresis ที่จะใช้ในการศึกษาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ มีวิธีการดังนี้ เตรียม agarose gel (ความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 1 %) นำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ได้หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ผสมกับ DNA loading sample แล้วใส่ลงในช่อง (well) บนแผ่น agarose gel เติม DNA มาตรฐานที่ทราบขนาด (DNA marker: λDNA/*Hin*d III) ลงในช่องข้าง ๆ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris-acetate-EDTA buffer กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยผ่าน agarose gel มีค่าความต่างศักย์คงที่เท่ากับ 100 V และใช้เวลาประมาณ 50 นาที จากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย GelStar (Lonza Bioscience) และดูด้วย Dark Reader transilluminator (Clare Chemical Research)

ผลการทดลอง

การแยกแบคเทอริโอเฟจ

การแยกแบคเทอริโอเฟจจากตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 18 แหล่ง โดยวิธี enrichment method และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*-ESBL โดยวิธี spot test สามารถแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli*-ESBL ได้จากตัวอย่างน้ำซึ่งเก็บมาจากบ่อบำบัดน้ำเสีย 1 แหล่ง (ตารางที่ 7) แบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*-ESBL เมื่อทดสอบโดยวิธี spot test (รูปที่ 6) ซึ่งสังเกตได้จาก clear zone ที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารซึ่งมีเชื้อ *E. coli*-ESBL เจริญอยู่

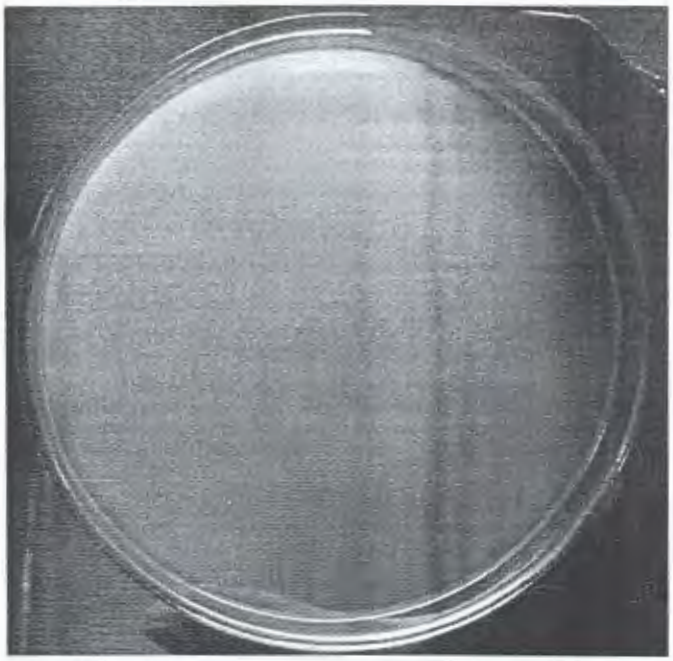
ตารางที่ 7 แหล่งน้ำตัวอย่างที่นำมาแยกแบคเทอริโอเฟจ

แหล่งเก็บน้ำตัวอย่าง*	spot test[a]
1. น้ำเสียจากตลาด (ตัวอย่างที่ 1)	–
2. น้ำเสียจากตลาด (ตัวอย่างที่ 2)	–
3. น้ำเสียจากตลาด (ตัวอย่างที่ 3)	–
4. น้ำเสียจากตลาด (ตัวอย่างที่ 4)	–
5. น้ำทิ้งจากบ้านเรือน (ตัวอย่างที่ 1)	–
6. น้ำทิ้งจากบ้านเรือน (ตัวอย่างที่ 2)	–
7. น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (ตัวอย่างที่ 1)	–
8. น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (ตัวอย่างที่ 2)	–
9. น้ำทิ้งจากร้านอาหาร (ตัวอย่างที่ 1)	–
10. น้ำทิ้งจากร้านอาหาร (ตัวอย่างที่ 2)	–
11. น้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (ตัวอย่างที่ 1)	–
12. น้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (ตัวอย่างที่ 2)	–
13. น้ำเสียจากบ่อบำบัด (ตัวอย่างที่ 1)	–
14. น้ำเสียจากบ่อบำบัด (ตัวอย่างที่ 2)	–
15. น้ำเสียจากบ่อบำบัด (ตัวอย่างที่ 3)	+
16. น้ำเสียจากบ่อบำบัด (ตัวอย่างที่ 4)	–
17. น้ำทิ้งในท่อระบายน้ำ (ตัวอย่างที่ 1)	–
18. น้ำทิ้งในท่อระบายน้ำ (ตัวอย่างที่ 2)	–

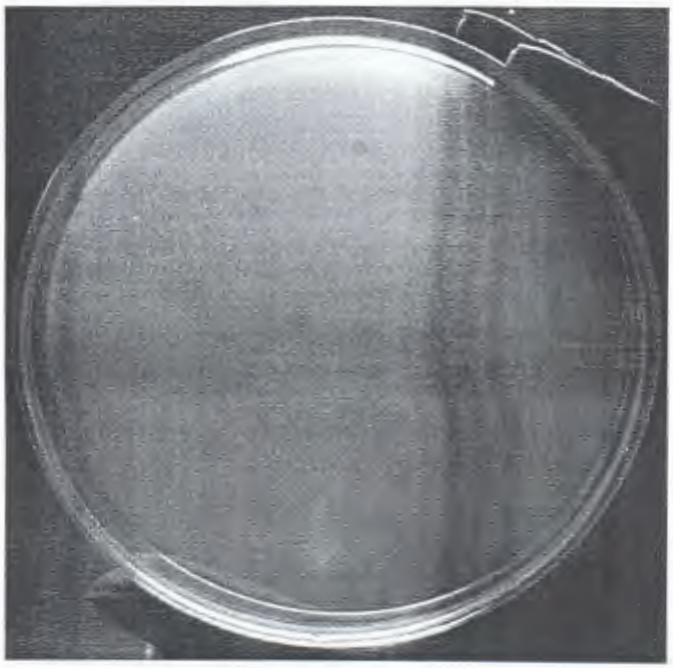
*หมายเลขในวงเล็บของแหล่งน้ำตัวอย่างแต่ละแหล่ง แสดงว่า เก็บตัวอย่างมาต่างเวลา/สถานที่

[a] + = เกิด clear zone

– = ไม่เกิด clear zone



รูปที่ 6 ลักษณะ clear zone ของ ϕUBU-ESBL เมื่อทดสอบโดยวิธี spot test



รูปที่ 7 ลักษณะ plaque ของ ϕUBU-ESBL จากการทำ plaque assay

การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์และการนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจ

เมื่อนำ bacteriophage suspension ที่ให้ผลการทดสอบ spot test เป็นบวก (+) ไปทำ double-layer agar method (plaque assay) พบว่าเกิดจุดใส (plaque) ปรากฏบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อ *E. coli*-ESBL เจริญอยู่ plaque มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร มีลักษณะใส (รูปที่ 7) จากนั้นได้ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์โดยการทำ plaque assay แล้วนำไปเพิ่มจำนวน (bacteriophage propagation) และนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจ พบว่ามีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage titer) เท่ากับ 2.7×10^6 pfu/ml ตั้งชื่อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า ϕUBU-ESBL

การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น

เมื่อนำ ϕUBU-ESBL มาทดสอบความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี spot test พบว่า ϕUBU-ESBL มีความจำเพาะสูง (highly specific) ต่อ *E. coli*-ESBL ทั้งนี้เนื่องจาก phage ดังกล่าวทำลายได้เฉพาะ ต่อ *E. coli*-ESBL เท่านั้นโดยไม่ทำลาย *E. coli* สายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ ϕUBU-ESBL ยังไม่สามารถทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่นำทดสอบด้วย (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความสามารถของ ϕUBU-ESBL ในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

แบคทีเรียทดสอบ	การเกิด inhibition zone[a]
Escherichia coli-ESBL	+
Escherichia coli 0157:H7	-
Escherichia coli ATCC25922	-
Escherichia coli K-12	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	-
Klebsiella pneumoniae ATCC27736	-
Klebsiella pneumoniae (Drug resistant strain)	-
Shigella dysenteriae ATCC13313	-
Salmonella enteritica serovar Typhi DMST5784	-
Vibrio cholerae O1, non O139 (DMST2873)	-
Enterobacter aerogenes (Drug resistant strain)	-
Acenitobacter baumannii (Drug resistant strain)	-

[a] + = เกิด clear zone

- = ไม่เกิด clear zone

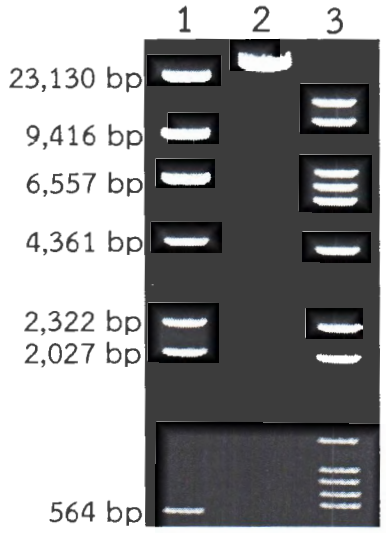
การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

จากการนำ ϕUBU-ESBL ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) พบว่า ϕUBU-ESBL มีรูปร่างลักษณะดังนี้ ส่วนหัว (head) เป็นรูป isometric ในขณะที่ส่วนหาง (tail) มีลักษณะเป็นแบบ noncontractile tail (รูปที่ 8) จากการหาค่าเฉลี่ยของขนาดของส่วนหัว และส่วนหางของ ϕUBU-ESBL (จำนวน 5 particles) พบว่าส่วนหัวของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) เฉลี่ยประมาณ 50 ± 3.4 นาโนเมตร ในขณะที่ส่วนหางมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 10 ± 0.3 นาโนเมตร และมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 290 ± 15.1 นาโนเมตร

รูปที่ 8 รูปร่างของ ϕUBU-ESBL ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Bar = 50 nm)

การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

เมื่อทำการสกัดจีโนมจากแบคเทอริโอเฟจ ϕUBU-ESBL และนำจีโนมดังกล่าวไปตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI ปรากฏว่าจีโนมของ ϕUBU-ESBL ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ดังกล่าว จีโนมของแบคเทอริโอเฟจที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI เมื่อนำไปศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ปรากฏผลดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 สารพันธุกรรมของ ϕUBU-ESBL ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI โดยวิธี agarose gel electrophoresis

Lane 1 = lambda DNA cut with *Hin*dIII

Lane 2 = uncut genome of ϕUBU-ESBL

Lane 3 = genome of ϕUBU-ESBL cut with *Bam*HI

วิจารณ์ผลการทดลอง

การดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก เนื่องจากทำให้การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถทำได้ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการมาตรฐาน จากรายงานวิจัยพบว่าปัจจุบันมีแบคทีเรียก่อโรคหลากหลายสายพันธุ์ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เช่น *Acinetobacter baumanii* (Viehman et al., 2014), *Escherichia coli* (Ayatollahi et al., 2103), *Klebsiella pneumoniae* (Sanchez et al., 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Lister et al., 2009), *Staphylococcus aureus* (David and Daum, 2010) และ *Streptococcus pneumoniae* (Chiou and Hseih, 2003) เป็นต้น

E. coli-ESBL เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น Cephalosporins, Ceftazidime, Cefotaxime และ Ceftriaxone เป็นต้น (Wani et al., 2009) ดังนั้นการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จึงทำได้ยาก และบางครั้งอาจต้องใช้ยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ชนิดร่วมกัน ซึ่งมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงมากขึ้นตามมาด้วย อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการนำยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam (beta lactam antibiotics) มาใช้ร่วมกับสารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase (beta lactamase inhibitor) เพื่อรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase ไปทำลายเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้ *E. coli*-ESBL ไม่สามารถทำลายยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam ได้ และในที่สุดก็จะถูกฆ่าโดยยาปฏิชีวนะดังกล่าว ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam และสารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase ที่ใช้คู่กันและประสบความสำเร็จในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL เป็นครั้งแรกคือ amoxicillin-clavulanic acid หลังจากนั้นจึงมีการทดลองใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam และสารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase คู่อื่น ๆ ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL ในปัจจุบันมีคู่ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam และสารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase ที่นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL หลายคู่ เช่น ampicillin-sulbactam, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, ceftolozane-tazobactam และ imipenem-cilastatin (ชื่อแรกเป็นชื่อของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam ส่วนชื่อหลังเป็นชื่อของสารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase) (Shlaes, 2013) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวนอกจากจะมีประสิทธิภาพที่ไม่ดีแล้ว ยังมีความยุ่งยากในการใช้งาน เช่น จะต้องมีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta lactam และสารยับยั้งเอนไซม์ beta lactamase ทุกครั้งที่จะนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

ด้วยเหตุที่การรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียดื้อยาด้วยยาปฏิชีวนะมักไม่ประสบผลสำเร็จ หรือมีประสิทธิภาพต่ำ การเปลี่ยนยาปฏิชีวนะใหม่ หรือการเพิ่มปริมาณยาปฏิชีวนะเดิมที่แบคทีเรียดื้อก็มักไปจบลงที่ปัญหาเดิม คือแบคทีเรียมีการพัฒนาตัวเองให้ดื้อยาอีก ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการหาวิธีการใหม่ ๆ มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ หรือใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ตัวอย่างเช่น การใช้พืชสมุนไพร หรือสารสกัดจากพืชสมุนไพร หรือการใช้แบคเทอริโอเฟจ เป็นต้น

พืชสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และมีผลข้างเคียงน้อย ในตารางที่ 9 แสดงตัวอย่างของพืชสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ที่ผ่านมายังได้มีการทดลองนำพืชสมุนไพรไปใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรีย และในตารางที่ 10 แสดงตัวอย่างของพืชสมุนไพรและยาปฏิชีวนะที่เมื่อใช้ร่วมกันแล้ว สามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีมาตั้งแต่ในช่วงประมาณปี ค.ศ. 1910 ในรัสเซียและยุโรป ซึ่งเป็นช่วงเวลาก่อนการค้นพบยาปฏิชีวนะ แต่เนื่องด้วยในยุคนั้นการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียด้วยแบคเทอริโอเฟจยังอยู่ในกระบวนการศึกษาวิจัยหรือทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง อาจมีรายงานว่านำมาใช้ในคนบ้างแต่ไม่มากนัก จึงทำให้การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคยังไม่ค่อยเป็นที่แพร่หลายมากนัก และแทบไม่มีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคติดเชื้ออีกเลยหลังจากที่มีการค้นพบยาปฏิชีวนะ โดยยาปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวางนับตั้งแต่ปีค.ศ. 1930 เป็นต้นมา แต่ต่อมาในระยะหลัง ๆ คนมักใช้ยาปฏิชีวนะอย่างผิดวิธี ใช้โดยไม่จำเป็นและปราศจากการควบคุมมาเป็นเวลานาน ทำให้แบคทีเรียจำนวนมากมีการปรับตัวให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นเรื่อย ๆ ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะจำนวนมากไม่สามารถใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนเช่นที่เคยเป็นมา นอกจากนี้การพัฒนายาปฏิชีวนะขึ้นมาใหม่นอกจากจะใช้เวลามากแล้ว ยังต้องใช้งบประมาณมหาศาลอีกด้วย ด้วยเหตุนี้การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย จึงกลับมาได้รับความสนใจอีกครั้งหนึ่ง แต่ในครั้งนี้เน้นไปที่การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ที่ผ่านมามีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายแบคทีเรียดื้อยาได้หลายชนิด เช่น *E. coli* (Rahmani et al., 2015), *S. aureus* (O'Flaherty et al., 2005), *S. pneumoniae* (Djurkovic et al., 2005), *K. pneumoniae* (Jamala et al., 2015) และ *S.* Typhimurium (Shin et al., 2012) เป็นต้น

ตารางที่ 9 พืชสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Common name	Scientific name	Active compound	Target bacteria
Basil	*Ocimum basilicum*	Terpenoids	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Bay	*Laurus nobilis*	Terpenoids	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Black pepper	*Piper nigrum*	Piperine	*Micrococcus, E. coli, Enterococcus faecalis*
Caraway	*Carum carvi*	Coumarins	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Chamomile	*Matricaria cahmomilla*	Anthemic acid	*Microbacterium tuberculosis, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus*
Chilli pepper	*Capsicum annuum*	capsaisin	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Clove	*Syzygium aromaticum*	Eugenol	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Garlic	*Allium sativum*	Allicin, ajoene	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Ginseng	*Panax notoginseng*	Saponins	*E. coli, staphylococcus, Sporothrix schenckii,*
Green tea	*Camellia sinensis*	Catechin	*Streptococcus mutans, Shigella, Vibrio*
Lemon verbena	*Aloysia triphylla*	Terpenoids	*E. coli, Microbacterium tuberculosis, S. aureus*
Licorice	*Glycyrrhiza glabra*	Glabrol	*Microbacterium tuberculosis, S. aureus*
Onion	*Allium cepa*	Allicin	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Peppermint	*Mentha piperita*	Menthol	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Poppy	*Papaver somniferum*	Opium	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Rosemary	*Rosmarinus officinalis*	Terpenoids	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Thyme	*Thymus vulgaris*	caffeic acid, thymol, tannins	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)
Tree bard	*Podocarpus nagi*	Totarol	Gram positive bacteria
Tumeric	*Curcuma longa*	Curcumin	*Several bacteria* (both gram positive and gram negative)

(ดัดแปลงจาก Cowan, 1999)

ตารางที่ 10 ตัวอย่างของพืชสมุนไพรและยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Plant/antibiotic combination	Target bacteria
Eremantus erythropappus/ampicillin	*Staphylococcus aureus*
Oregano/fluoroquinolones, Oregano/doxycycline, Oregano/lincomycin, Oregano/maquindox	*Escherichia coli*
Pelargonium graveolens/norfloxacin	*Bacillus cereus, Staphylococcus aureus*
Lantana montevidensis/aminoglycosides	*Escherichia coli*
Eugenol/vancomycin Eugenol/β-lactam	*Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium*
Croton zehntnezi/gentamicin	*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*
Eucalyptus/chloroxidine digluconate	*Staphylococcus epidimidis*
Zataria multiflora/vancomycin	*Staphylococcus aureus*
Aniba rosaeodora/gentamicin	*Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Acinetobacter baumannii Serratia marcescens, Yersinia enterocilitica*
Pelargonium graveolens/gentamicin	*Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Acinetobacter baumannii Serratia marcescens, Yersinia enterocilitica*
Citrus limon/amikacin *Cinnamomum zeylanicum*/amikacin	*Acenitobacter* spp.
Coriander/chloromphenicol Coriander/ciprofloxacin Coriander/gentamicin Coriander/tetracycline	*Acinetobacter baumannii*

(ดัดแปลงจาก Yap et al., 2014)

การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียมีข้อดีหลายประการ คือ แบคเทอริโอเฟจมีความสามารถ ในการทำลายแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นหากนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรค แบคเทอริโอเฟจก็จะไปทำลายเฉพาะเชื้อก่อโรคเท่านั้น โดยที่ไม่ทำอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในร่างกายของคน และสัตว์ ทั้งยังไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ของคนและสัตว์อีกด้วย การดำรงชีพของแบคเทอริโอเฟจเป็นแบบต้องพึ่งพาเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ดังนั้นเมื่อมีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรค หลังจากที่แบคเทอริโอเฟจทำลายแบคทีเรียก่อโรคแล้ว แบคเทอริโอเฟจก็จะไม่สามารถดำรงชีพต่อไปได้ด้วย ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการมีแบคเทอริโอเฟจตกค้างในร่างกายคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมหลังจากที่มีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรค อีกทั้งในปัจจุบันแทบไม่มีรายงานเกี่ยวกับการปรับตัวของแบคทีเรียก่อโรคให้ดื้อต่อแบคเทอริโอเฟจ

การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้โดยการใช้แบคเทอริโอเฟจเพียงชนิดเดียว หรือโดยการใช้แบคเทอริโอเฟจหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งเรียกว่า bacteriophage cocktail การใช้แบคเทอริโอเฟจหลายชนิดร่วมกันในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกทั้งยังทำให้สามารถฆ่าแบคทีเรียได้หลากหลายสายพันธุ์ในเวลาเดียวกัน (Chan et al., 2013) ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการนำ bacteriophage cocktail มาใช้ในการฆ่าแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ตัวอย่างการนำ bacteriophage cocktail มาใช้ในการฆ่าแบคทีเรีย

Type and number of phage	Target bacteria	Reference
Myophage 1 ชนิด ร่วมกับ podophage 1 ชนิด	*Pseudomonas aeruginosa*	Alemayehu et al., 2012
Myophage 1 ชนิด ร่วมกับ siphophage 2 ชนิด	*Klebsiella pneumoniae*	Gu et al., 2012
Myophage 1 ชนิด, podophage 1 ชนิด และ siphophage 1 ชนิดร่วมกัน	*Escherichia coli*	Maura et al., 2012
Myophage 2 ชนิด ร่วมกับ siphophage 2 ชนิด	*Salmonella* Typhimurium	Hooton et al., 2011
Myophage 1 ชนิด ร่วมกับ siphophage 1 ชนิด	*Enterococcus faecalis*	McLean et al., 2011
Myophage 3 ชนิดร่วมกัน	*Campylobacter jejuni*	Carvalho et al., 2010

การนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจโดยละเอียด เพื่อให้การใช้แบคเทอริโอเฟจมีประสิทธิภาพมากที่สุด และเกิดปัญหาน้อยที่สุด ในการศึกษานี้ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้ ดังนี้ ศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้อง TEM ศึกษาชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ และศึกษา host range ของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้อง TEM และการศึกษาชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจมีประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารพันธุกรรมของ ϕUBU-ESBL เป็นแบบ double stranded DNA ทั้งนี้เนื่องจากสารพันธุกรรมดังกล่าวถูกตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI (ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดเฉพาะ double stranded DNA เท่านั้น) และจากการศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้อง TEM พบว่า ϕUBU-ESBL เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางที่ยืดหดไม่ได้ (noncontractile tail)

แบคเทอริโอเฟจที่มีหางและมีสารพันธุกรรมเป็นแบบ double stranded DNA จัดอยู่ใน order *Caudovirales* ซึ่งประกอบด้วย 3 family ใหญ่ ๆ ตามลักษณะของหาง คือ *Podoviridae* (หางสั้น), *Myoviridae* (หางยาว ยืดหดได้; contractile tail) และ *Siphoviridae* (หางยาว ยืดหดไม่ได้; noncontractile tail) จากผลการศึกษารูปร่างและสารพันธุกรรมของ ϕUBU-ESBL ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวนี้อยู่ใน family *Siphoviridae* แม้ว่าในการศึกษานี้จะพบแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli*-ESBL อยู่ใน family *Siphoviridae* แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมา ก็สามารถพบแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* อยู่ใน family อื่น เช่น *Myoviridae* และ *Podoviridae* ได้ด้วย ตัวอย่างของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* ที่อยู่ใน family *Myoviridae* ได้แก่ PhaxI (Shahrbabak et al., 2013) และตัวอย่างของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* ที่อยู่ใน family *Podoviridae* ได้แก่ vB_EcoP_SU10 (Mirzaei et al., 2013) เป็นต้น

จากการนำ ϕUBU-ESBL ไปศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่า แบคเทอริโอเฟจดังกล่าวสามารถทำลายได้เฉพาะ *E. coli*-ESBL แต่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ คุณสมบัตินี้ทำให้ ϕUBU-ESBL มีความน่าสนใจที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *E. coli*-ESBL ทั้งนี้เนื่องจากความจำเพาะต่อ host ที่สูงของ ϕUBU-ESBL จะทำให้เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ในการรักษาโรค แบคเทอริโอเฟจจะไปทำลายแต่เฉพาะ *E. coli*-ESBL แต่ไม่ทำลายแบคทีเรียอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ที่อยู่ในร่างกายผู้ป่วย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ϕUBU-ESBL มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL อย่างไรก็ตามหากต้องการนำแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวไปใช้งานจริงในสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการศึกษาอีกมาก ไม่ว่าจะเป็นในแง่ของคุณสมบัติเฉพาะตัวของแบคเทอริโอเฟจ ความปลอดภัยในการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต และความคงตัวของแบคเทอริโอเฟจเมื่อเข้าสู่ร่างกายคน หากแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้งานได้จริงในอนาคตจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL

สรุปผลการทดลอง

แบคเทอริโอเฟจ ϕUBU-ESBL ที่แยกได้จากการศึกษานี้ มีความสามารถในการทำลาย *E. coli*-ESBL ได้อย่างจำเพาะ การศึกษารูปร่างลักษณะของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า ϕUBU-ESBL เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาวยืดหดไม่ได้ และการศึกษาชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ พบว่า ϕUBU-ESBL มีสารพันธุกรรมเป็นแบบ double stranded DNA เมื่อนำข้อมูลเกี่ยวกับรูปร่างลักษณะของแบคเทอริโอเฟจมาประกอบกับข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ทำให้สามารถจัดจำแนก ϕUBU-ESBL ให้อยู่ใน family *Siphoviridae* ผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นว่า ϕUBU-ESBL มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ควบคุมและรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli*-ESBL ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ปาริชาติ พุ่มขจร. 2552. การรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคเทอริโอเฟจ. วาสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 21 (2): 94-103.

Ackermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol 154: 245-251.

Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York.

Alemayehu, D., Casey, P.G., McAuliffe, O., Guinane, C.M., Martin, J.G., Shanahan, F., Coffey, A., Ross, R.P. and Hill C. 2012. Bacteriophages ϕMR299–2 and ϕNH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. MBio 3(2): e00029-12.

Andrew, M.K. 2006. Phage therapy-Everything old is new again. Can J Infect Dis Med Microbiol 17: 297-306.

Ayatollahi, J., Shahcheraghi, S.H., Akhondi, R. and Soluti, S.S. 2013. Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated from Children in Shahid Sadoughi Hospital of Yazd. Iran J Ped Hematol Oncol 3(2): 78–82.

Barrow, P., Lovell, M. and Berchieri, A. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin Diag Lab Immunol 5: 294-298.

Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P. and Iannelli, D. 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. Antimicrob Agents Chemother 51: 2765-2773.

Carvalho, C.M., Gannon, B.W., Halfhide, D.E., Santos, S.B., Hayes, C.M., Roe, J.M. and Azeredo, J. 2010. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. BMC Microbiol 10: 232.

Caso, J.L., De Los Reyes-Gavilan, C.G., Herrero, M., Montilla, A., Rodriguez, A. and Suarez, J.E. 1995. Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophage of *Lactobacillus plantarum.* J Dairy Sci 78: 741-750.

Chan, B.K., Abedon, S.T. and Loc-Carrillo, C. 2013. Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiol 8(6): 769-783.

Chang, H.-C., Chen, C.-R., Lin, J.-W., Shen, G.-H., Chang, K.-M., Tseng, Y.-H. and Weng, S.-F. 2005. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage ϕSMA5. Appl Environ Microbiol 71: 1387-1393.

Chiou, C.C. and Hseih, K.S. 2003. Pneumococcal infection in children: rational antibiotic choice for drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Acta Paediatr Taiwan 44(2): 67-74.

Cislo, M., Dabrowski, M., Weber-Dabrowska, B., Woyton, A. 1987. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch Immunol Ther Exp 2: 175-183.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 12(4): 564-582.

David, M.Z. and Daum, R.S. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 23(3): 616–687.

Djurkovic, S., Loeffler, J.M. and Fischetti, V.A. 2005. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. Antimicrob Agents Chemother 49(3): 1225-1228.

Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., Sun, C. and Feng, X. 2012. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. PLoS ONE 7(3): e31698.

Hooton, S.P., Atterbury, R.J. and Connerton, I.F. 2011. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. Int J Food Microbiol 151(2): 157–163.

Ilse, O., Ina, W., Martine, R., Andrew, E., Li, X., Peter, H., Max, H., Paul, S., Christina, V-G., Kim van der, Z., Xander, H. and Jan, K. 2011. Extended-spectrum β-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. Emerg Infect Dis 17: 1216-1222.

Jamala, M., Hussaina, T., Dasb, C.R. and Andleeba, S. 2015. Inhibition of clinical multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilm by *Siphoviridae* bacteriophage Z. Sci Lett 3(2): 122-126.

Kchetkova, V.A., Mamontov, A.S., Moskovtseva, R.L., Erastova, E.L., Trofimov, E.L. and Popov, M.I. 1989. Phagotherapy og postoperative suppurative-inflammatory complications in patients with neoplasms. Sov Med 6: 23-26.

Kucharewicz-Krukowska, A. and Slopek, S. 1987. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. Arch Immunol Ther Exp 5: 553-561.

Levin, B.R. and Bull, J.J. 1996. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriohage and antibiotics. Am Nat 147: 881.

Lister, P.D., Wolter, D.J. and Nancy, D. 2009. Hanson. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin Microbiol Rev 22(4): 582–610.

Maura, D., Galtier, M., Le, B.C. and Debarbieux, L. 2012. Virulent bacteriophages can target O104:H4 enteroaggregative *Escherichia coli* in the mouse intestine. Antimicrob Agents Chemother 56(12): 6235–6242.

McLean, S., Dunn, L., Palombo, E. 2011. Bacteriophage biocontrol has the potential to reduce enterococci on hospital fabrics, plastic and glass. World J Microbiol Biotechnol 27: 1713–1717.

Medigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Inc. New Jersey.

Miliutina, L.N. and Vorotyntseva, N.V. 1993. Current strategy and tactics of etiotropic therapy of acute intestinal infections in children. Antibiot Khimioter 1: 46-53.

Mirzaei, M.K., Eriksson, H., Kasuga, K., Haggard-Ljungquist, E. and Nilsson, A.S. 2014. Genomic, proteomic, morphological, and phylogenetic analyses of vB_EcoP_SU10, a *Podoviridae* phage with C3 morphology. PLoS One 9(12): e116294.

Murray, P.R., Kobayashi, G.S. and Pfaller, M.A. 1994. Medical Microbiology. Mosby-Year Book, Inc., England.

O'Flaherty, S., Ross, R.P., Meaney, W., Fitzgerald, G.F., Elbreki, M.F. and Coffey, A. 2005. Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant *Staphylococci* from hospitals. Appl Environ Microbiol 71(4): 1836-1842.

Perepanova, T.S., Darbeeva, O.S., Kotliarova, G.A., Kondrat'eva, E.M., Maiskaia, L.M. and Malysheva, V.F. 1995. The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflammatory urologic disease. Urol Nefrol 5: 14-17.

Rahmani, R., Zarrini, G., Sheikhzadeh, F. and Aghamohammadzadeh, N. 2015. Effective phages as green antimicrobial agents against antibiotic-resistant hospital *Escherichia coli*. Jundishapur J Microbiol 8(2): e17744.

Richard, M.C. 1999. Phage therapy: Past history and future prospects. Arch Immunol Ther Exp 47: 267-274.

Sanchez, G.V., Master, R.N., Clark, R.B., Fyyaz, M., Duvvuri, P., Ekta, G. and Bordon, J. 2013. *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998-2010. Emerg Infect Dis 19(1):133-136.

Sandeep, K. 2006. Bacteriophage precision drug against bacterial infections. Curr Sci 90: 631-633.

Shahrbabak, S.S., Khodabandehlou, Z., Shahverdi, A.R., Skurnik, M., Ackermann, H.W., Varjosalo, M., Yazdi, M.T. and Sepehrizadeh, Z. 2013. Isolation, characterization and complete genome sequence of PhaxI: a phage of Escherichia coli O157: H7. Microbiology 159: 1629-1638.

Shigenobu, M., Mohammad, R., Jumpei, U., Shingo, S., Takako, U., Masayuki, K., Masahiko, I., Toshikazu, T., Mikiya, F., Hiroshi, W. and Shosuke, I. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious disease. J Infect Chemother 11: 211-219.

Shin, H., Lee, J.H., Lim, J.A., Kim, H. and Ryua, S. 2012. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bacteriophage SPN1S. J Virol 86(2): 1284-1285.

Shlaes, D.M. 2013. New β-lactam-β-lactamase inhibitor combinations in clinical development. Ann NY Acad Sci 1277: 105-114.

Slopex, S. and Kucharewicz-Krukowska, A. 1987. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. Arch Immunol Ther Exp 35: 553-561.

Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. and Kucharewicz-Krukowska, A. 1987. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the year 1981-1986. Arch Immunol Ther Exp 35: 569-583.

Stroj, L., Weber-Dabrowska, B., Partyka, K., Mulczyk, M., Wojcik, M. 1999. Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn. Neurol Neurochir Pol 3: 693-698.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J.G.Jr. 2001. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother 45: 649-659.

Vegge, C.S., Brondsted, L., Neve, H., Mc Grath, S., van Sinderen, D. and Vogensen, F.K. 2005. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. J Bacteiol 187: 4187-4197.

Viehman, J.A., Nguyen, M.H. and Doi, Y. 2014.Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Drugs 74(12):1315-1333.

Vinodkumar, C.S., Suneeta Kalsurmath and Neelaguna, Y.F. 2009. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginasa* septicemia in mice. Indian J Pathol Microbiol 51: 360-366.

Wani, K.A., Thakur, M.A., Siraj Fayaz, A., Fomdia, B., Gulnaz, B. and Maroof, P. 2009. Extended spectrum β-Lactamase mediated resistance in *Escherichia Coli* in a tertiary care hospital. Int J Health Sci (Qassim) 3(2): 155–163.

Watanabe, K., Takesue, S., Jin-Nai, K. and Yoshikawa, T. 1970. Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei.* Appl Microbiol 20: 409-415

Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. and Slopek, S. 1987. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. Arch Immunol Ther Exp 35: 563-568.

Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C. and Lim, S.H.E. 2014. Essential oils, a new horizon combating bacterial antibiotic resistance. Open Microbiol J 8: 6-14.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ได้นำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในชื่อเรื่อง "A *Siphoviridae* bacteriophage specific to Extended-spectrum-β-lactamases-producing *Escherichia coli*" ในวารสาร Journal of Chemical and Pharmaceutical Research ปี 2015 ฉบับที่ 7(11) หน้า 604-608

Available online www.jocpr.com

Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015, 7(11):604-608

Research Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

A *Siphoviridae* bacteriophage specific to extended-spectrum β-lactamases-producing *Escherichia coli*

Parichat Phumkhachorn and Pongsak Rattanachaikunsopon*

Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand

ABSTRACT

Extended-spectrum β-lactamases-producing Escherichia coli (ESBL-producing E. coli) pose a threat to antibiotic based therapeutic approach because of their multidrug resistance properties. The bacteriophage therapy has recently become a promising alternative therapeutic approach. The aims of this study are to isolate and classify a bacteriophage specific to ESBL-producing E. coli and to examine its host range. In this study, a bacteriophage, ϕUBU-ESBL, was isolated from water collected from a wastewater treatment pond. It was found to produce small clear plaques of 1-2 mm in diameter and to inhibit only E. coli-ESBL, but not other bacteria used in this study. Its genome was digested by the restriction enzyme BamHI indicating that the genome was double stranded DNA. As revealed by transmission electron microscopy, ϕUBU-ESBL had an isometric head (50 ± 3.4 nm in diameter) with a noncontractile tail (290 ± 15.1 in length). Based on its genomic and morphological characteristics, ϕUBU-ESBL was classified as a member in the family Siphoviridae. This study provides preliminary information showing that ϕUBU-ESBL had potential for further study towards its application as a therapeutic agent against ESBL-producing E. coli infectious diseases.

Keywords: Bacteriophage, *Escherichia coli*, extended-spectrum β-lactamases

INTRODUCTION

Extended-spectrum β-lactamases-producing *Escherichia coli* (ESBL-producing *E. coli*) are antibiotic resistant strains of *E. coli* having ability to manufacture an enzyme called extended-spectrum β-lactamases. Currently, they have caused a global health problem because they are emerging worldwide and resistant to many antibiotics. They are resistant to all penicillins, to cephalosporins (including third and fourth generation agents), and to aztreonam. Furthermore, they are often cross-resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and quinolones [1]. ESBL-producing *E. coli* can cause a wide range of infections, ranging from urinary tract infections to severe blood poisoning [1, 2]. Infections with ESBL-producing *E. coli* most commonly occur in the elderly, people who have recently been in hospitals, and people who receive or have received antibiotic treatment. Since most antibiotics are ineffective in treating ESBL-producing *E. coli* infections, alternative antimicrobial agents against the bacteria are required.

The emergence of ESBL-producing *E. coli* has urged scientists to search for alternative therapeutic approaches to combat infectious diseases caused by the problematic bacteria. One of the potential candidates is bacteriophage therapy (or phage therapy). This therapeutic approach uses bacteriophages, bacterial viruses, as antimicrobial agents to inhibit bacterial growth or to kill bacteria [3]. Since the discovery by Twort in 1915 and by d'Hérelle in 1917, bacteriophages have been used for treatment and prophylaxis of various bacterial infectious diseases. Therapeutic phages have been reported to have advantages over antibiotics [4]. Chances of developing serious side effects by bacteriophages are miniscule because of their high host specificity. Moreover, small doses of bacteriophages can be used effectively because they are self-replicating in their target bacterial cells. Several reports have shown the ability of bacteriophages to kill drug resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* [5], *Klebsiella pneumoniae* [6],

Streptococcus pneumoniae [7], *Pseudomonas aeruginosa* [8] and *Vibrio parahaemolyticus* [10]. Therefore, it is of interest to find a bacteriophage for use as a therapeutic agent to control ESBL-producing *E. coli*.

This study aims to isolate a bacteriophage specific to ESBL-producing *E. coli* from wastewater and to partially characterize the bacteriophage in some aspects such as host range, morphology and genome. The bacteriophage from this study may be useful as a potential therapeutic agent for controlling ESBL-producing *E. coli* infections.

EXPERIMENTAL SECTION

Bacterial strains and culture conditions

ESBL-producing *E. coli* used in this study was kindly gifted by Sappasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani, Thailand. It is a clinical strain isolated from a patient suffering from its infection. It was used as the host for bacteriophage isolation. The bacterial strains listed in Table 1 were used in bacteriophage host range determination. All of the bacteria were cultured in Brain Heart Infusion broth (BHI broth) at 37°C and kept as glycerol (20% v/v) stock at -20°C until use.

Bacteriophage isolation

Bacteriophage isolation was conducted according to the protocol previously described by Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon [10]. A total of 18 wastewater samples used for bacteriophage isolation were collected from various sources such as animal farms, houses and wastewater treatment ponds in hospitals and industries in Ubon Ratchathani, Thailand. Ten ml of each sample was centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter (SartoriousAG, Goettingen, Germany). Five ml of the filtrate was added to an equal volume of double strength BHI broth. One hundred µl of ESBL-producing *E. coli* overnight culture was added to the mixture and incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the culture was centrifuged at 3,500 rpm for 10 min and the supernatant was filtered through a 0.45 µm-pore-size membrane filter. The resulting filtrate was used for examining the presence of bacteriophage by spot test method.

Spot test method

Spot test method was performed for detection of bacteriophage in the prepared filtrate samples. In brief, 100 µl of a log phase ESBL-producing *E. coli* culture was added to 5 ml of pre-warmed (60°C) soft agar (0.4% agar), gently mixed, and overlaid onto a BHI agar plate. After allowing the soft agar to solidify for 20 min, 10 µl of each prepared filtrate sample was spotted onto top agar layer. The spotted sample was allowed to dry and the plate was incubated at 37°C for 24 h before observing the presence of a clear zone. A clear zone at the spot area, representing the lysis of host cells, indicates the activity of bacteriophage. The filtrate sample giving a positive result was subjected to plaque assay to confirm the presence of a bacteriophage in the sample.

Plaque assay

The filtrate sample giving a positive result from the bacteriophage isolation experiment was subjected to ten-fold serial dilution using BHI broth as a diluent. One hundred µl of the suitable dilution and 100 µl of log phase ESBL-producing *E. coli* culture were added into 5 ml of pre-warmed (60°C) soft agar (0.4% agar) and mixed well. The mixture was poured onto the surface of a BHI agar plate. The plate was incubated at 37°C for 24 h to allow plaques to form. The formation of plaques indicates the presence of a bacteriophage in the filtrate sample. The number of plaques was used to calculate the bacteriophage titer expressed in plaque forming unit (PFU)/ml.

Bacteriophage purification

After plaque assay, a single plaque was picked and added into phosphate buffered saline (pH 7.0) followed by dilution and re-plating for two rounds of further single plaque isolation. The final single plaque isolate was picked and transferred into a tube containing 10 ml of log phase ESBL-producing *E. coli* culture in BHI broth. The tube was then incubated at 37°C for 24 h to allow bacterial cell lysis to occur. The bacteriophage lysate was centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. The supernatant was filtrated through 0.45 µm-pore-size membrane filter. The resulting filtrate containing purified bacteriophage, called bacteriophage suspension, was kept at 4°C.

Bacteriophage host range determination

The spot test method (as described above) was used to determine the bacteriophage host range by using 10 bacterial strains listed in Table 1 as tested hosts.

Analysis of bacteriophage genome

Bacteriophage genome was extracted by using PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The purified genome was tested for its sensitivity to the restriction enzyme *Bam*HI, RNase A and nuclease S1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The results were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis.

Examination of bacteriophage morphology

The bacteriophage morphology was examined by transmission electron microscopy using the protocol previously described by Somnate et al. [11] with some modifications. A 10 µl aliquote of purified bacteriophage suspension was spotted on top of a Formvarcoated copper grid (Proscitech, Brisbane, Queensland, Australia) and allowed to adsorb for 3 min at room temperature. The bacteriophage was stained by 2% uranyl acetate. The stained bacteriophage was examined by JEOL JEM-1230 Electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV accelerating voltage. The bacteriophage size was determined from the average of five independent measurements.

RESULTS

Bacteriophage isolation

Eighteen wastewater samples were used to screen for a bacteriophage specific to ESBL-producing *E. coli*. By using spot test method, only one sample (collected from a hospital's wastewater treatment pond) gave a positive result producing an inhibition zone on the lawn of ESBL-producing *E. coli* (Figure 1a). When the filtrate prepared from the sample was subjected to plaque assay using ESBL-producing *E. coli* as a host, it produced clear plaques of 0.1-0.2 mm in diameter, indicating the presence of a bacteriophage in the filtrate (Figure 1b). The bacteriophage were designated ϕUBU-ESBL.

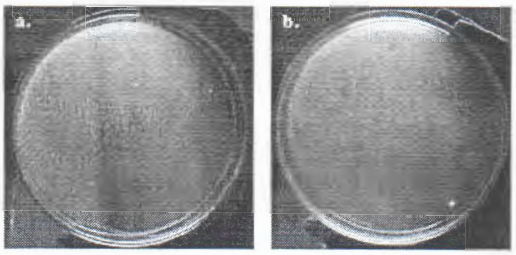


Figure 1: An inhibition zone (a) and plaques (b) on the lawn of ESBL-producing *E. coli* produced by ϕUBU-ESBL

Bacteriophage host range determination

Host range of ϕUBU-ESBL was determined by testing its lytic activity against the bacterial strains listed in Table 1. The bacteriophage had no lytic activity against all of the tested bacteria, suggesting that the bacteriophage was highly specific to ESBL-producing *E. coli*.

Table 1: Lytic acitivity of ϕUBU-ESBL against different bacterial host strains

Bacterial host strain[a]	Lytic activity[b]
Acenitobacter baumannii (Drug resistant strain)	-
Enterobacter aerogenes (Drug resistant strain)	-
Escherichia coli ATCC25922	-
Escherichia coli 0157:H7 ATCC35150	-
Klebsiella pneumoniae ATCC27736	-
Klebsiella pneumoniae (Drug resistant strain)	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	-
Salmonella enteritica serovar Typhi DMST5784	-
Shigella dysenteriae ATCC13313	-
Vibrio cholerae O1, non O139 DMST2873	-

[a] *ATCC = American Type Culture Collection; DMST = Department of Medical Sciences Thailand; all drug resistant strains gifted by Sappasitthiprasong Hospital, Thailand*

[b] *+ = have lytic activity; - = have no lytic activity*

Analysis of bacteriophage genome

Sensitivity to nucleic acid digesting enzymes of the genome extracted from ϕUBU-ESBL was studied. The result demonstrated that the genome was digested by the restriction enzyme *Bam*HI (Figure 2). However, it was not digested by RNase A and nuclease S1.

Examination of bacteriophage morphology

Analysis of bacteriophage morphology by transmission electron microscopy revealed that ϕUBU-ESBL was a tailed bacteriophage. It had an isometric head (50 ± 3.4 nm in diameter) with a noncontractile tail (290 ± 15.1 in length) (Figure 3). No collar, base plate and tail fiber were observed.

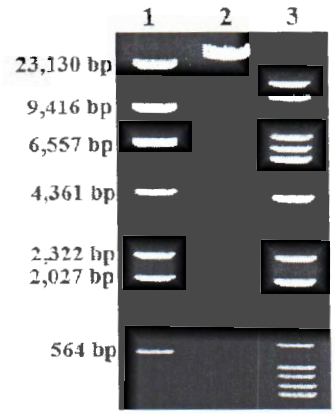


Figure 2: Restriction enzyme digestion analysis of ϕUBU-ESBL genome. Lane 1, Lambda DNA digested with *Hin*dIII (DNA marker); lane 2, uncut ϕUBU-ESBL genome; lane 3, ϕUBU-ESBL genome cut with *Bam*HI

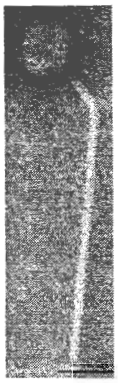


Figure 3: Morphology of ϕUBU-ESBL genome as studied by transmission electron microscopy. (Bar = 50 nm)

DISCUSSION

The therapeutic approach based on antibiotics has been threatened by the emergence of ESBL-producing *E. coli* worldwide in recent years because of their multidrug resistance properties. This problem has urged scientists to look for alternative therapeutic approaches to fight against ESBL-producing *E. coli* infectious diseases. One of the promising approaches is bacteriophage therapy that is the therapeutic and prophylactic use of lytic bacteriophages to treat pathogenic bacterial infections [12, 13, 14]. Here, we screened for a bacteriophage capable of inactivating ESBL-producing *E. coli*. Although several bacteriophages specific to ESBL-producing *E. coli* have been isolated [15, 16, 17], our work is still important because the previously isolated bacteriophages may not have infectivity against our ESBL-producing *E. coli* strain due to the high host specificity of the bacteriophages. Moreover, having many bacteriophages specific to ESBL-producing *E. coli* in hand can benefit the improvement of bacteriophage therapy against ESBL-producing *E. coli* by using them as cocktails of different bacteriophages that have broad spectrum against many strains of ESBL-producing *E. coli*.

In this study, ϕUBU-ESBL, a bacteriophage specific to patient-derived ESBL-producing *E. coli*, was isolated from a wastewater sample collected from a hospital's wastewater treatment pond. The finding of ϕUBU-ESBL in different place from which its specific bacterial host was isolated is not an unusual result because it has been known for a long time that bacteriophages are wide spread in the environment. Several previous works reported the isolation of bacteriophages from different places where their specific hosts exit. For examples, bacteriophage ϕkpdr1 specific to *Klebsiella pneumoniae* DR1 derived from a hospitalized patient was isolated from a sewage water sample [6] and bacteriophage ST1 specific to *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 derived from feces of a patient suffering from food poisoning was isolated from a water sample collected from a swine lagoon [11].

Bacteriophage host range is one of the parameters needed to be considered when a bacteriophage is selected to be used as a therapeutic agent. In this study, it was found that ϕUBU-ESBL had a very narrow host range. It inhibited only its specific host, ESBL-producing *E. coli*, but not the other tested bacteria. The high host specificity of ϕUBU-ESBL makes the bacteriophage a potential candidate for use as a therapeutic agent against ESBL-producing *E. coli*. Theoretically, it is harmless to the eukaryotic hosts undergoing bacteriophage therapy, and it should not affect the beneficial normal flora of the host. It also has few, if any, side effects, as opposed to drugs, and does not stress the liver [4].

In order to classify ϕUBU-ESBL, information on its genome and morphology are required. The digestion of ϕUBU-ESBL genome by the restriction enzyme *Bam*HI suggested that it was double stranded DNA. This result was confirmed by the nondigestability of the genome by RNase A (an RNA digesting enzyme) and nuclease S1 (a single stranded DNA/RNA digesting enzyme). As examined by transmission electron microscopy, ϕUBU-ESBL had an isometric head with a noncontractile tail. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses, tailed bacteriophages with double stranded DNA are classified in the *Caudovirales* order [18]. This order contains three families including *Myoviridae* (with long, contractile tail), *Siphoviridae* (with long, noncontractile tail), and *Podoviridae* (with short tail). Based on its genomic and morphological characteristics, ϕUBU-ESBL was tentatively classified as a member of the *Siphoviridae* family.

CONCLUSION

In conclusion, ϕUBU-ESBL can be a potential candidate for being use as a therapeutic agent against ESBL-producing *E. coli* based on its high host specificity. This property benefits the bacteriophage to cause few, if any, effects on eukaryotic hosts and normal flora residing in the hosts. Furthermore, ϕUBU-ESBL and other previously isolated ESBL-producing *E. coli* bacteriophages can be used together as bacteriophage cocktails to broaden inhibitory spectrum against many strains of ESBL-producing *E. coli*. However, more bacteriophage characterization and in vivo testing for the infectivity of ϕUBU-ESBL are required in order to use it as a therapeutic agent. Some of them are underway in our laboratory.

Acknowledgements
The authors are grateful for the financial support (project ID 163766) provided by the National Research Council of Thailand (NRCT).

REFERENCES

[1] SC Picozzi; S Casellato; M Rossini, G Paola; M Tejada; E Costa; L Carmignani. *Urol. Ann.*, **2014**, 6(2), 107-112.
[2] M Melzer; I Petersen. *J. Infect.*, **2007**, 55(3), 254-259.
[3] A Sulakvelidze; Z Alavidze; J Glenn Morris Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45(3), 649-659.
[4] C Loc-Carrillo; ST Abedon. *Bacteriophage.*, **2011**, 1(2), 111-114.
[5] Z Kazmierczak; A Gorski; K Dabrowska. *Viruses.*, **2014**, 6(7), 2551–2570.
[6] W Thamniamton; V Boonsarn; P Phumkhachorn; P Rattanachaikunsopon. *Int. J. Curr. Res. Rev.*, **2010**, 2, 30-43.
[7] S Djurkovic; JM Loeffler; VA Fischetti. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49(3), 1225-1228.
[8] CS Vinodkumar; S Kalsurmath; YF Neelagund. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, **2008**, 51(3), 360-366.
[9] JW Jun; TH Shin; JH Kim; SP Shin; JE Han; GJ Heo; M De Zoysa; GW Shin; JY Chai; SC Park SC. *J. Infect. Dis.*, **2014**, 210(1), 72-78.
[10] P Phumkhachorn; P Rattanachaikunsopon. *J. Pure Appl. Microbiol.*, **2014**, 8(Spl. Edn. 2), 371-379.
[11] T Somnate; P Phumkhachorn; P Rattanachaikunsopon. *J. Pure Appl. Microbiol.*, **2014**, 8(2),1131-1139.
[12] ST Abedon; C Thomas-Abedon. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2010**, 11(1), 28-47.
[13] JJ Gill; P Hyman. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2010** 11(1), 2-14.
[14] LD Goodridge. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2010**, 11(1), 15-27.
[15] J Wang; B Hu; M Xu; Q Yan; S Liu; X Zhu; Z Sun; D Tao; L Ding; E Reed; J Gong; QQ Li; J Hu. *Int. J. Mol. Med.*, **2006**, 17(2), 347-355.
[16] F Pouillot; M Chomton; H Blois; C Courroux; J Noelig; P Bidet; E Bingen; S Bonacorsi. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2012**, 56(7), 3568-3575.
[17] D Fitzgerald-Hughes; D Bolkvadze; N Balarjishvili; L Leshkasheli; M Ryan; L Burke; N Stevens; H Humphreys; M Kutateladze. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2014**, 69(4), 1148-1150.
[18] HW Ackermann. *Methods Mol. Biol.*, **2009**, 501, 127-140.

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยบูรพา