



การใช้แบคทีเรียโอเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง
Shigella dysenteriae

ประพัชรา พรนิคม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



USE OF BACTERIOPHAGE AND ANTIBIOTIC FOR INHIBITING
SHIGELLA DYSENTERIAE

PRAPHATCHARA PORNNIKOM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN BIOSCIENCE

FACULTY OF SCIENCE

UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2019

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง การใช้แบบเคเทอรีโอเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง *Shigella dysenteriae*

ผู้วิจัย นางสาวประพัชรา พรนิคม

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรรัตน์ บุตรพรหม	ประธานกรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ)

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร)

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชริตา ปุกหุด)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2562

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยช่วยให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนสนับสนุนการจัดหาเอกสาร วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งดูแลเอาใจใส่อย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและถ่ายทอดวิชาความรู้และประสบการณ์หรือเทคนิคต่าง ๆ จนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการจัดหาเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยช่วยเหลือเอาใจใส่ เป็นกำลังใจที่สำคัญและสนับสนุนด้านทุนทรัพย์ทางการศึกษามาโดยตลอด

ประพัชรา พรนิคม

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง *Shigella dysenteriae*
 ผู้วิจัย : ประพัชรา พรนิคม
 ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
 สาขาวิชา : วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก : ผู้ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร
 คำสำคัญ : แบคทีริโอเฟจ, ไมโอไวรัส, ชิเจลล่า, ชิเจลโลซิส

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากโรงพยาบาลประชารักษ์เวชการ เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอเฟจที่แยกได้ และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีริโอเฟจในการยับยั้ง *S. dysenteriae* เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ampicillin จากการแยกแบคทีริโอเฟจจำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากโรงพยาบาลประชารักษ์เวชการ จังหวัดศรีสะเกษ พบไลติกแบคทีริโอเฟจ 1 ชนิด ซึ่งให้ชื่อว่า bacteriophage SD1 แบคทีริโอเฟจดังกล่าวจัดเป็นแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Shigella* เนื่องจากยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดในสกุล *Shigella* ได้ แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียในสกุลอื่น สารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 เป็นดีเอ็นเอสายคู่ เนื่องจากถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I เมื่อศึกษาแบคทีริโอเฟจดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหางยาว และหางสามารถยึดติดได้จากข้อมูลเกี่ยวกับสารพันธุกรรม และรูปร่างของแบคทีริโอเฟจทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage SD1 ให้อยู่ใน family Myoviridae เมื่อนำ bacteriophage SD1 และ ampicillin เพียงอย่างเดียวมายับยั้ง *S. dysenteriae* พบว่าค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง *S. dysenteriae* ได้ มีค่าเท่ากับ 10^4 PFU/ml และ 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อนำ bacteriophage SD1 และ ampicillin มาใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S. dysenteriae* พบว่าความเข้มข้นของ bacteriophage SD1 และ ampicillin ที่ต้องใช้มีค่าลดลง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10^3 PFU/ml และ 15.625 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า bacteriophage SD1 และ ampicillin มีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

ABSTRACT

TITLE : USE OF BACTERIOPHAGE AND ANTIBIOTIC FOR INHIBITING
Shigella dysenteriae

AUTHOR : PRAPHATCHARA PORNNIKOM

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOSCIENCE

ADVISOR : PROF. PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON, Ph.D.

CO ADVISOR : ASST. PROF. PARICHAT PHUMKHACHORN, Ph.D.

KEYWORD : BACTERIOPHAGE, MYOVIRIDAE, *Shigella*, SHIGELLOSIS

This study aimed to isolate a bacteriophage specific to *Shigella dysenteriae* from a hospital water sample, to partially characterize the isolated bacteriophage and to test its inhibitory ability against *S. dysenteriae* when used in combination with ampicillin. From the isolation of a bacteriophage specific to *S. dysenteriae* from a waste water collected from Pracharakwetchakan Hospital, Sisaket province, a lytic bacteriophage, designated bacteriophage SD1, was obtained. The isolated bacteriophage was a *Shigella* specific bacteriophage because it inhibited all bacterial species in the genus *Shigella*, but not bacteria in other genera. The genetic material of bacteriophage SD1 was double stranded DNA due to the fact that it was digested by *Pst*I. When the bacteriophage was studied by a transmission electron microscope, it was found to be a tailed bacteriophage with a contractile tail. Based on its genetic material and morphology, bacteriophage SD1 was classified as a member of the family Myoviridae. When bacteriophage SD1 and ampicillin were used alone to inhibit *S. dysenteriae*, the minimal inhibitory concentrations of bacteriophage SD1 and ampicillin were 10^4 PFU/ml and 31.25 µg/µl, respectively. However, when bacteriophage SD1 and ampicillin were used together to inhibit *S. dysenteriae*, the inhibitory concentrations of bacteriophage SD1 and ampicillin were decrease which are 10^3 PFU/ml and 15.625 µg/µl, respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 <i>Shigella</i>	4
2.2 Bacteriophage	20
2.3 ยาปฏิชีวนะ	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ	43
3.2 ยาปฏิชีวนะ	43
3.3 การแยกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความสามารถในการทำลาย <i>S. dysenteriae</i> จากน้ำเสีย	43
3.4 การตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. dysenteriae</i> โดยวิธี spot test	43
3.5 การแยกแบคทีเรียโอฟาจ และการเตรียม bacteriophage suspension	44
3.6 การหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟาจ	44
3.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการยับยั้งแบคทีเรีย อื่น ๆ	45

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8 การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟ	45
3.9 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอฟด้วย transmission electron microscope	45
3.10 การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของแบคทีเรียโอฟในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>	46
3.11 การหาค่า minimal inhibitory concentration ของ ampicillin ในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>	46
3.12 การหาค่า minimal inhibitory concentration ในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i> เมื่อใช้แบคทีเรียโอฟร่วมกับ ampicillin	47
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การตรวจหาและแยกแบคทีเรียโอฟที่มีความสามารถในการทำลาย <i>S. dysenteriae</i> จากน้ำเสีย	48
4.2 การหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอฟ	49
4.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอฟในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น ๆ	49
4.4 การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอฟ	50
4.5 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอฟด้วย transmission electron microscope (TEM)	51
4.6 การหาค่า minimal inhibitory concentration ของแบคทีเรียโอฟในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>	52
4.7 การหาค่า minimal inhibitory concentration ของ ampicillin ในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>	53
4.8 การหาค่า minimal inhibitory concentration ในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i> เมื่อใช้แบคทีเรียโอฟร่วมกับ ampicillin	55

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง	
5.1 สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง	56
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	
ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	75
ข ผลงานทางวิชาการ	77
ประวัติผู้วิจัย	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การทดสอบทางชีวเคมีของ <i>Shigella</i> เทียบกับ <i>Escherichia coli</i>	6
2.2	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Shigella</i> แต่ละ serogroup	7
2.3	ตัวอย่างของปัจจัยก่อโรคที่ถูกควบคุมโดยยีนในพลาสมิดของของ <i>Shigella</i>	13
2.4	แบคทีเรียที่สร้าง shiga toxin และ shiga-like toxin	15
2.5	การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ	23
2.6	ตัวอย่างการใช้แบคทีเรียโอเฟจในการทำลายเชื้อก่อโรค	32
2.7	ตัวอย่างโรคติดเชื้อและการรักษาด้วย phage therapy ในคน	35
2.8	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคทีเรียโอเฟจกับยาปฏิชีวนะ	36
3.1	ปริมาตรของแบคทีเรียโอเฟจ และ ampicillin (ในหน่วยไมโครลิตร) ที่ใช้ในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>	47
4.1	ความสามารถของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ	50
4.2	ความสามารถของ bacteriophage SD1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ <i>S. dysenteriae</i>	53
4.3	ความสามารถของ ampicillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ <i>S. dysenteriae</i>	54
4.4	ความสามารถในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i> เมื่อใช้ bacteriophage SD1 ร่วมกับ ampicillin	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	fimbriae ของ <i>Shigella</i>	5
2.2	แอนติเจนที่พบบนผิวเซลล์แบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่	6
2.3	slide agglutination test	7
2.4	โคโลนีของ <i>Shigella</i> จะไม่มีสี (colorless) บนอาหาร MacConkey agar	8
2.5	ความแตกต่างของสีโคโลนีของ <i>Salmonella</i> และ <i>Shigella</i> บนอาหาร SS agar	9
2.6	<i>Shigella</i> บนอาหาร Triple Sugar Iron agar	9
2.7	การบุกรุกของ <i>Shigella</i> เข้าสู่เนื้อเยื่อ musosa ผ่าน M cell แล้วแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่น	10
2.8	วิธีการหลบหลีกจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของ <i>Shigella</i> สามารถป้องกันการถูกทำลายโดยเอ็นไซม์ใน lysosome และการนำเสนอแอนติเจนโดยโมเลกุล MHC Class II	11
2.9	การหลั่ง invasin เข้าสู่โฮสต์เซลล์ด้วยอาศัย type 3 secretion system (T3SS)	11
2.10	โครงสร้างของ Shiga toxin	15
2.11	กลไกการทำงานของ Shiga toxin	16
2.12	กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย	19
2.13	รูปร่างโดยทั่วไปของแบคทีเรียโอเฟจ	21
2.14	รูปร่างลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจที่อยู่ใน family ต่าง ๆ	24
2.15	การดำรงชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจแบบ lytic cycle	26
2.16	ลักษณะของ plaque ที่ปรากฏบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	26
2.17	กลไกการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียโดยแบคทีเรียโอเฟจ	28
2.18	โครงสร้างของ endolysin โดย N (N-terminal) คือด้านที่ทำหน้าตัด C (C terminal) คือด้านที่จับอย่างจำเพาะ และ L คือ linker	29
2.19	การดำรงชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจแบบ lysogenic cycle	30
2.20	วงจรชีวิตของเฟจแบบ lytic (ซ้าย) และ lysogenic (ขวา)	30
2.21	รูปแบบต่าง ๆ ของการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจเพื่อประโยชน์ด้านการรักษา	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
2.22	กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลินทรีย์
2.23	ผนังของเซลล์แบคทีเรีย
2.24	การยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยยาต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ
2.25	โครงสร้างของ sulfanilamide และ para-aminobenzoic acid (PABA)
4.1	inhibition zone ที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด filtrate 2 ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการป้ายเชื้อ <i>S. dysenteriae</i> ทัวอยู่ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
4.2	ลักษณะ plaque ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี <i>S. dysenteriae</i> เจริญอยู่
4.3	agarose gel แสดงผลของการตัด phage DNA ด้วย restriction enzyme
4.4	รูปร่างของ bacteriophage SD1 ภายใต้กล้อง transmission electron microscope (Bar = 50 nm)
4.5	inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ <i>S. dysenteriae</i> โดย bacteriophage SD1 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ
4.6	inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ <i>S. dysenteriae</i> โดย ampicillin ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Shigella dysenteriae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ในกลุ่ม facultative anaerobe รูปร่างท่อน (rod-shaped) ไม่สร้างสปอร์ (nonspore-forming) ไม่สร้างแคปซูล (non-capsulate) และไม่หมักน้ำตาลแลคโตส (non-lactose ferment) *S. dysenteriae* สามารถสร้างสารพิษ shiga toxin สารพิษดังกล่าวทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบ ท้องร่วง ปวดเกร็งในช่องท้อง อาเจียน และมีไข้ ซึ่งเป็นอาการสำคัญของโรค shigellosis การติดต่อของโรคนี้เกิดจากการได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่มที่ผ่านการปรุงหรือเตรียมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ การรักษาโรค shigellosis มักใช้ยาปฏิชีวนะ โดยยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ ได้แก่ ciprofloxacin ampicillin cotrimoxazole erythromycin tetracycline และ chloramphenicol อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่า มีเชื้อ *S. dysenteriae* หลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวทำให้การรักษาโรคติดเชื้อ *S. dysenteriae* มีความยากลำบากมากขึ้น

ในปัจจุบันมีความสนใจในการนำแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) มาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเรียกวิธีการรักษาดังกล่าวว่า bacteriophage therapy หรือ phage therapy ที่ผ่านมามีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลายเชื้อ *S. dysenteriae* ได้ เช่น แบคทีริโอเฟจ SF-9 ซึ่งแยกได้จากน้ำที่เก็บจากแม่น้ำในเมือง Dhaka ประเทศบังกลาเทศ (Faruque et al., 2003) และ Shiga Shield ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยแบคทีริโอเฟจ 5 ชนิดที่สามารถทำลาย *Shigella* spp. ที่มักพบในอาหาร รวมทั้ง *S. dysenteriae* 4 สายพันธุ์ คือ 2013AM-2809 AM11413 AM17886 และ AM25896 (Soffer et al., 2017) การนำแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียมีข้อดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหลายประการ เช่น แบคทีริโอเฟจไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง หรือก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เนื่องจากการทำลายแบคทีเรียโดยแบคทีริโอเฟจเป็นแบบจำเพาะ กล่าวคือ แบคทีริโอเฟจจะทำลายเฉพาะแบคทีเรียก่อโรค (ซึ่งมี receptor ที่จำเพาะต่อแบคทีริโอเฟจ) เท่านั้น โดยไม่ไปมีผลกระทบต่อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในขณะที่การทำลายแบคทีเรียโดยยาปฏิชีวนะเป็นแบบไม่จำเพาะ กล่าวคือ ยาปฏิชีวนะจะทำลายทั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียประจำถิ่น ดังนั้นผู้ที่ใช้ยาปฏิชีวนะ จึงมักมีอาการข้างเคียงอันเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียประจำถิ่นถูกทำลาย เช่น คลื่นไส้

อาเจียน ท้องเสีย เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถติดต่อบนแบคทีเรียโอเฟลได้ ซึ่งเป็นข้อพึงระวังในการใช้แบคทีเรียโอเฟลในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย การใช้แบคทีเรียโอเฟลร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นแนวทางใหม่ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถติดต่อบนทั้งแบคทีเรียโอเฟลและยาปฏิชีวนะมีน้อย อีกทั้งวิธีดังกล่าวยังช่วยลดปริมาณของแบคทีเรียโอเฟลและยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย หากเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีเรียโอเฟลหรือยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว ที่ผ่านมามีรายงานการใช้แบคทีเรียโอเฟลร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น การใช้แบคทีเรียโอเฟลร่วมกับยาปฏิชีวนะ amikacin (Nouraldin et al., 2016) และยาปฏิชีวนะ gentamycin (Hagens et al., 2006) ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยเหตุนี้การใช้แบคทีเรียโอเฟลร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง *S. dysenteriae* จึงน่าสนใจ และมีความเป็นไปได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาแบคทีเรียโอเฟลจากแหล่งน้ำต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้ง *S. dysenteriae* ได้ และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอเฟลดังกล่าว นอกจากนี้การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟลและยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *S. dysenteriae* เมื่อใช้แบคทีเรียโอเฟล หรือยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว และเมื่อใช้แบคทีเรียโอเฟลและยาปฏิชีวนะร่วมกัน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อตรวจหาแบคทีเรียโอเฟลที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากน้ำเสีย

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟลที่ได้ ซึ่งได้แก่

1.2.2.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

1.2.2.2 การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟล

1.2.2.3 การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟลด้วย transmission electron

microscope

1.2.2.4 เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟล และยาปฏิชีวนะ ampicillin ในการยับยั้งเชื้อ *S. dysenteriae*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ตรวจหาแบคทีเรียโอเฟลที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากน้ำเสีย

1.3.2 ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟลที่ได้ ซึ่งได้แก่

1.3.2.1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

1.3.2.2 สารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟล

1.3.2.3 รูปร่างของแบคทีเรียโอเฟลด้วย transmission electron microscope

1.3.2.3 ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอเฟล และยาปฏิชีวนะ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แบคทีเรียโอเฟลที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* ซึ่งมีฤทธิ์เสริมกับ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Shigella*

2.1.1 การค้นพบ

Shigella เป็นแบคทีเรียที่ถูกค้นพบโดยนักจุลชีววิทยาชาวญี่ปุ่น ชื่อ Koyoshi Shiga เมื่อ ค.ศ.1896 เขาเป็นผู้ที่พบการแพร่ระบาดของโรค sekiri (หมายถึงโรคบิดในภาษาญี่ปุ่น) โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคตรวจพบได้ในอุจจาระของผู้ป่วย และเรียกชื่อในตอนแรกว่า *Bacillus dysenteriae* แต่ต่อมาภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Shigella dysenteriae* type 1 สารพิษที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างเรียกว่า Shiga toxin (Wikipedia, 2018)

2.1.2 ความสำคัญ

Shigella เป็นสาเหตุของโรคบิด (shigellosis หรือ bacillary dysentery) ซึ่งมีความสำคัญคือถ่ายเป็นมูกเลือด (mucoid bloody stool) อาการอื่นที่อาจพบร่วมด้วย ได้แก่ ปวดท้อง มีไข้ อาเจียน ภาวะขาดน้ำ และชัก *Shigella* พบได้ในน้ำที่มีการปนเปื้อนอุจจาระของผู้ที่ติดเชื้อ จัดเป็น food-and waterborne pathogen ติดต่อโดยการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว (fecal-oral route of transmission) โรค shigellosis สามารถพบได้ทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในประเทศด้อยพัฒนาหลายประเทศ โดยมีรายงานว่า *Shigella* spp. ทำให้เกิดโรคบิดได้สูงถึง 165 ล้านราย และเป็นสาเหตุการตาย 1.1 ล้านรายของประชากรทั่วโลกทุกปี shigellosis มีอัตราการตายสูงในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เด็กที่ขาดแคลนอาหารมักมีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายกว่าเด็กปกติ CDC เคยรายงานว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาพบโรค shigellosis ได้ประมาณ 18,000 ราย/ปี แต่เนื่องจากโรคนี้อาจมีอาการไม่รุนแรงจึงไม่มีบันทึกผู้ป่วยที่ไม่ได้มาพบแพทย์ ดังนั้น หากนับรวมผู้ป่วยทุกรายที่ติดเชื้อ *Shigella* อาจมีมากถึง 360,000 ราย/ปี ในทางการระบาดวิทยาการแพร่กระจายของ *Shigella* แต่ละสปีชีส์ในแต่ละพื้นที่บนโลกจะแตกต่างกันไป เช่น *S. sonnei* พบมากที่สุดในประเทศสหรัฐอเมริกา รองลงมาคือ *S. flexneri* *S. dysenteriae* *S. boydii* ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทยพบ *S. sonnei* มากที่สุด รองลงมาคือ *S. flexneri* จากรายงานของกองระบาดวิทยาปี 2539 พบว่ามีผู้ป่วยโรค shigellosis จำนวน 3.4 คนต่อประชากรแสนคน โดยพบอัตราป่วยสูงสุดในปี 2530 (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2561) โรค shigellosis มีความสัมพันธ์กับสภาพอากาศโดยมักพบการระบาดของโรคนี้ได้บ่อยในฤดูร้อน ปัจจุบันพบการดื้อยาของแบคทีเรียมีอัตราสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้การรักษาโรคนี้นี้ยังทำได้ยากขึ้น (Bhunia, 2008)

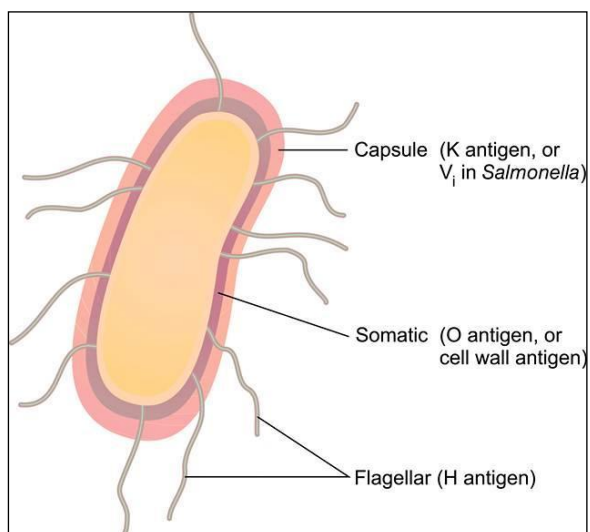
2.1.3 ลักษณะทั่วไป

Shigella เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในในแฟมิลี Enterobacteriaceae ซึ่งมีลักษณะทั่วไปคือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เซลล์มีขนาดกว้าง 0.6 ไมโครเมตร และยาว 2-4 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่เคลื่อนที่มีพิมเบรีย (fimbriae) ขนาด 1-2 ไมโครเมตรอยู่รอบตัวเซลล์ โปรตีนที่บริเวณพิมเบรียจัดเป็น adhesin โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ (adhesion) กับเซลล์ของโฮสต์ (ภาพที่ 2.1) *Shigella* ต่างจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้แก่ ความสามารถในการก่อโรค การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาบางอย่างเพื่อการวินิจฉัยแบคทีเรีย (เช่น การหมักน้ำตาลแลคโตสให้ผลลบ การทดสอบ lysine decarboxylase ให้ผลลบ และการเคลื่อนที่ของเชื้อให้ผลลบ) (ตารางที่ 2.1) และแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ซึ่งทดสอบด้วยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแอนติเจนที่ปรากฏบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae แบ่งเป็น 3 ลักษณะตามตำแหน่งที่พบ (ภาพที่ 2.2) คือ O antigen (หรือ somatic antigen) อยู่ที่ผนังเซลล์ (cell wall) ในส่วน lipopolysaccharide (LPS) ของ outer membrane H antigen อยู่ที่แฟลกเจลลา (flagella) และ K antigen อยู่ที่แคปซูล (capsule) แอนติเจนที่มีบทบาทสำคัญในการจำแนกชนิดของ *Shigella* คือ O antigen ส่วน K antigen มีบทบาทน้อยมาก และ H antigen ไม่มีบทบาทเลยเพราะเชื้อไม่มีแฟลกเจลลา (Asbury and et al., 2018)



ภาพที่ 2.1 fimbriae ของ *Shigella*

ที่มา: Siciliani (2018: Web-Site)



ภาพที่ 2.2 แอนติเจนที่พบบนผิวเซลล์แบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่

ที่มา: The University of British Columbia (2018: Web-Site)

ตารางที่ 2.1 การทดสอบทางชีวเคมีของ *Shigella* เทียบกับ *Escherichia coli* (Gallagher, 2018)

Biochemical tests	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>
Indole	Differential reaction	+
Methyl red	+	+
Voges-Proskauer	—	—
Citrate (Simmons)	—	—
H ₂ S (TSI)	—	—
Urease		—
Phenylalanine deaminase	—	—
Lysine decarboxylase	—	+/-
Arginine dihydrolase	—	-/+
Ornithine decarboxylase	Differential reaction	Differential reaction
Mobility	—	+/-
Acid produced from lactose	—	+

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Shigella* แต่ละ serogroup (Regnum prokaryotae, 2018)

Groups	ONPG	Ornithine decarboxylase	Malonate utilization	Growth on KCN medium	Glucose fermentation	L-rhamnose fermentation	Maltose fermentation	L-arabinose fermentation
<i>S. dysenteriae</i>	d	—	+	—	—	d	[—]	d
<i>S. boydii</i>	—	—	—	—	+	—	[—]	+
<i>S. flexneri</i>	—	—	—	+	+	—	d	d
<i>S. sonnei</i>	+	+	—	—	+	[+]	+	+

หมายเหตุ: Legend: + positive 90-100%

— negative 90-100%

[+] positive 75-89%

[—] negative 75-89%

d positive 25-74% of strains

KCN = potassium cyanide



ภาพที่ 2.3 slide agglutination test: 1 = antiserum ที่จำเพาะต่อ *Shigella* groups/ Serotypes 2 = positive agglutination หมายถึงเกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์
negative agglutination หมายถึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์
ที่มา: ภัทรชัย กิริติสิน, 2561

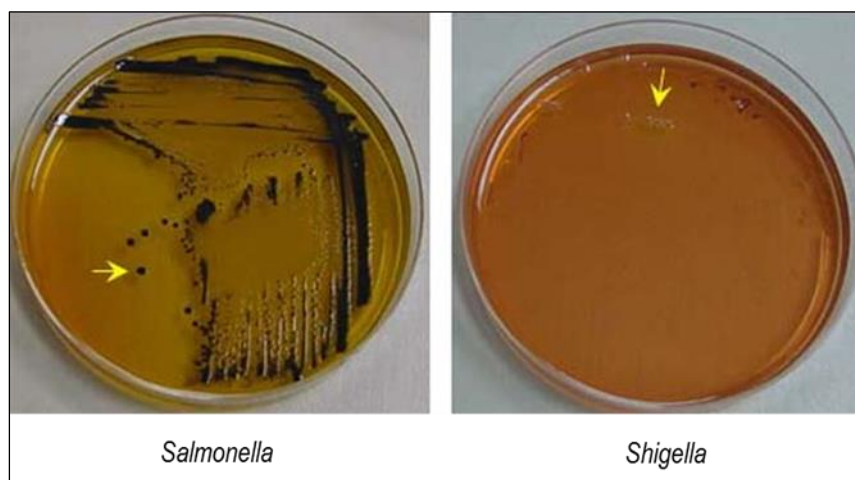
2.1.4 การจำแนกชนิด

ลักษณะ O antigen บนผิวเซลล์ของ *Shigella* สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 4 serogroup และแต่ละ serogroup ยังแบ่งออกเป็นหลาย serotype ได้แก่ group A (*S. dysenteriae* มี 12 serotype) group B (*S. flexneri* มี 6 serotype) group C (*S. boydii* มี 18 serotype) และ group D (*S. sonnei* มี 1 serotype) *Shigella* group A B และ C มีคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาค่อนข้างคล้ายคลึงกัน ยกเว้น group D ซึ่งจะให้ผลบวกกับการทดสอบ β -D-galactosidase (ONPG) และ ornithine decarboxylase (ตารางที่ 2.2) การจำแนกเชื้อทั้ง 4 subgroup ในห้องปฏิบัติการทั่วไปนิยมใช้วิธีทาง serology คือ slide agglutination โดยนำเชื้อมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อแล้วสังเกตปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) บนแผ่นกระจกสไลด์ (ภาพที่ 2.3) (ภัทรชัย กิริตสิน, 2561)



ภาพที่ 2.4 โคโลนีของ *Shigella* จะไม่มีสี (colorless) บนอาหาร MacConkey agar

ที่มา: Tankeshwar (2018: Web-Site)



ภาพที่ 2.5 ความแตกต่างของสีโคโลนีของ *Salmonella* และ *Shigella* บนอาหาร SS agar
ที่มา: Aryal (2018: Web-Site)



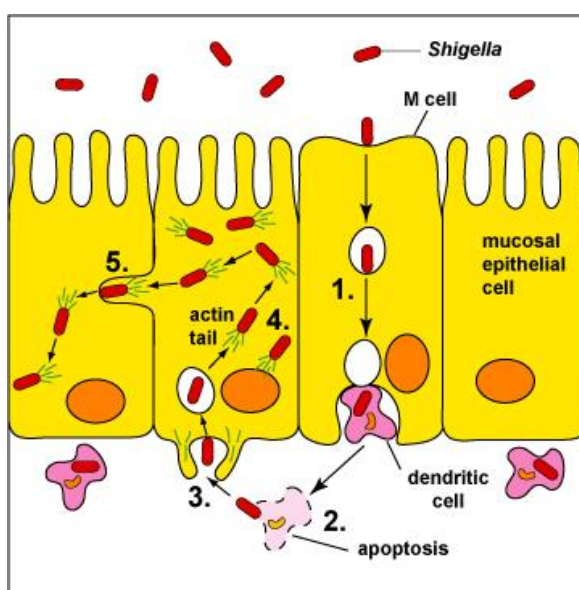
ภาพที่ 2.6 *Shigella* บนอาหาร Triple Sugar Iron agar
ที่มา: Klündt (2018: Web-Site)

2.1.5 การเพาะเลี้ยง

ตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยเพื่อนำมาแยกเชื้อ *Shigella* คืออุจจาระ หรือไม้พันสำลีที่ป้ายมาจากบริเวณรอบทวารหนัก (rectal swab) ของผู้ป่วยที่มีอาการของโรคบิด เนื่องจากเชื้อมักตายง่ายบนไม้พันสำลีที่แห้ง ดังนั้นตัวอย่าง rectal swab อาจเก็บไว้ใน buffered glycerol saline solution เพื่อป้องกันการตายของเชื้อระหว่างการขนส่ง และควรรีบนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกเชื้อทันที อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้สำหรับการการแยกเชื้อ *Shigella* เช่น MacConkey agar (differential medium) ซึ่งมี pH indicator เพื่อใช้แยกความแตกต่างของสีโคโลนีของเชื้อ lactose fermenter (โคโลนีสีชมพู) เช่น *E. coli* ออกจาก non-lactose fermenter (โคโลนีไม่มีสี) เช่น *Shigella* (ภาพที่ 2.4) และ *Salmonella-Shigella* (SS) agar (เป็นทั้ง selective และ differential

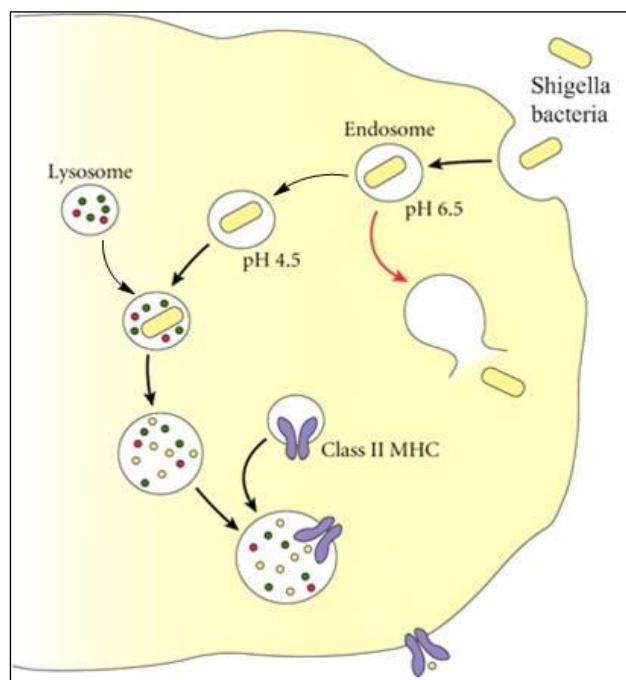
medium) ซึ่งมีส่วนประกอบของเกลือน้ำดี (bile salt) โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) และ บริลเลียนกรีน (brilliant green) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม coliform organism นอกจากนั้นบน SS agar โคโลนีของ *Shigella* จะใสไม่มีสี มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ขอบเรียบ ส่วนโคโลนีของ *Salmonella* อาจพบว่ามีจุดสีดำในโคโลนีหากเชื้อสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) (ภาพที่ 2.5) นอกจาก SS agar แล้ว ยังมี selective agar ชนิดอื่นที่สามารถใช้แยก *Shigella* ได้แก่ XLD agar, DHL agar, Hektoen Enteric (HE) agar และ Desoxycholate citrate agar (DCA) (อรุณ บำรุงตระกูลนนท์, 2561)

เมื่อนำ *Shigella* ไปเลี้ยงในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) agar (differential medium) จะพบลักษณะการเจริญคือ สีแดงบริเวณอาหารที่ลาดเอียง (alkaline slant) สีเหลืองบริเวณก้นหลอด (acid butt) โดยไม่มีแก๊สในเนื้อวุ้น (no bubbles of gas in the agar) (ภาพที่ 2.6) ผลการทดสอบนี้ถือเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าน่าจะเป็น *Shigella* หากต้องการยืนยันชนิดของ *Shigella* ว่าจัดอยู่ใน group หรือ serotype ใดต้องทำการทดสอบ slide agglutination (Klündt, 2018)



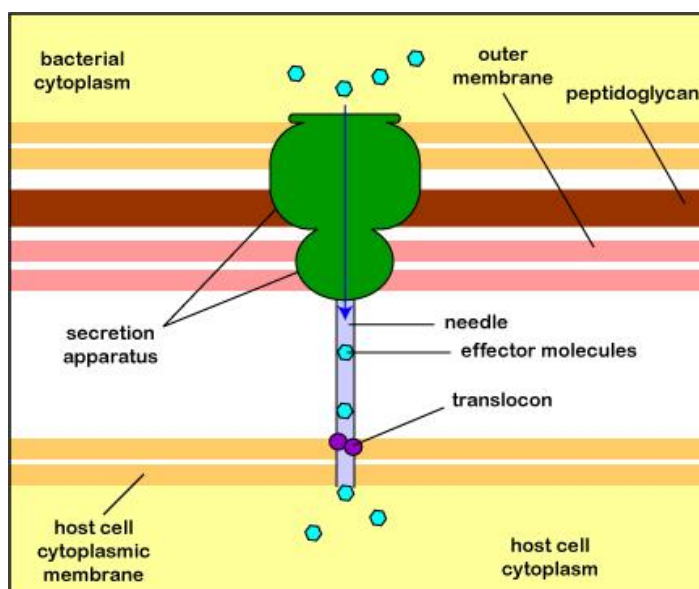
ภาพที่ 2.7 การบุกรุกของ *Shigella* เข้าสู่เนื้อเยื่อ musosa ผ่าน M cell แล้วแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่น

ที่มา: Kaiser (2018: Web-Site)



ภาพที่ 2.8 วิธีการหลบหลีกจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของ *Shigella* สามารถป้องกันการถูกทำลายโดยเอนไซม์ใน lysosome และการนำเสนอแอนติเจนโดยโมเลกุล MHC Class II

ที่มา: The Journal of undergraduate biological studies. (2018: Web-Site)



ภาพที่ 2.9 การหลั่ง invasin เข้าสู่โฮสต์เซลล์โดยอาศัย type 3 secretion system: T3SS

ที่มา: Kaiser (2018: Web-Site)

2.1.6 กลไกการก่อโรคและอาการของโรค

Shigella ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (เช่น ลิง) กลไกการก่อโรคของเชื้อนี้จะคล้ายกับ entero-invasive *E. Coli*: EIEC ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ทำให้เกิดโรคได้ค่อนข้างต่ำ (low infectious dose) เชื่อว่า *Shigella* เพียง 10-100 เซลล์ที่ปนเปื้อนมากับอาหารและเข้าสู่ร่างกายโดยการกินสามารถทำให้เกิดโรคได้ ตำแหน่งที่เชื้อแบคทีเรียบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อคือ M cell ซึ่งจัดเป็น phagocytic cell ชนิดพิเศษที่แทรกอยู่ระหว่าง epithelial cell ในชั้น mucous membrane ของผนังลำไส้ใหญ่บริเวณ Payer's patches ขั้นตอนการบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อของ *Shigella* สรุปได้ดังนี้ (ภาพที่ 2.7) (1) *Shigella* เมื่อสัมผัสกับ M cell จะถูกส่งไปยัง dendritic cell ที่อยู่ใต้ epithelial cell (2) *Shigella* สามารถหลบหลีกออกจาก dendritic cell และอาศัยกลไกบางอย่างไปกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของ dendritic cell (3) *Shigella* หลั่งสารที่เรียกว่า invasin หลายชนิด ไปทำลายผนัง epithelial cell จากทางด้านล่าง (basolateral side) invasin ที่เชื้อหลั่งออกมานั้นกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ actin polymer rearrangements ใน cytoskeleton ของโฮสต์เซลล์ ส่งผลให้ *Shigella* ถูกนำเข้าสู่เซลล์ในรูป endocytic vesicle (endosome หรือ phagosome) ในลักษณะที่คล้ายกับการนำเซลล์แปลกปลอมเข้าสู่ phagocytic cell (4) *Shigella* สามารถหลบออกจาก endosome ก่อนที่ endosome จะไปรวม (fuse) กับ lysosome ซึ่งบรรจุ hydrolytic enzymes จำนวนมากที่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรีย ดังนั้น *Shigella* จึงไม่ถูกทำลายและยังสามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ดังกล่าวได้ด้วย (ภาพที่ 2.8) (5) *Shigella* สามารถเดินทางจากโฮสต์เซลล์หนึ่งไปยังโฮสต์เซลล์อื่นที่อยู่บริเวณข้างเคียงผ่านทาง cell membrane โดยอาศัยกระบวนการที่เรียกว่า actin-based motility ขณะที่ *Shigella* กำลังเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปในชั้น epithelial cell ที่ผนังลำไส้ จะมีผลทำให้ epithelial cell เหล่านั้นเกิดการตายและกระตุ้นให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงที่บริเวณผนังลำไส้ใหญ่ จนแสดงอาการของโรคให้เห็นอย่างเด่นชัด *Shigella* ไม่ค่อยบุกรุกเนื้อเยื่ออื่นนอกลำไส้ ดังนั้นจึงไม่ค่อยพบว่าการติดเชื้อนี้ในกระแสเลือดหรือเชื้อแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นภายในร่างกาย

แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดรวมถึง *Shigella* หลั่ง invasin เข้าสู่ epithelial cell ของโฮสต์โดยอาศัยกลไกที่เรียกว่า type 3 secretion system: T3SS (Pinaud and et al., 2018) (ภาพที่ 2.9) โดยกลไกดังกล่าวนี้แบคทีเรียจะใช้โครงสร้างที่อยู่ภายในเซลล์เรียกว่า secretion apparatus ร่วมกับโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นท่อยาวคล้ายเข็มฉีดยา (hollow needle) แทะผ่าน cell membrane ของโฮสต์ และอาศัย translocon protein เป็นตัวทำให้เกิดรูที่ cell membrane ก่อน จากนั้นจึงปล่อยสาร invasin (หรือ effector molecules ชนิดต่าง ๆ) จากภายในเซลล์แบคทีเรียให้เคลื่อนผ่านไปยังโฮสต์เซลล์ effector molecules ที่สำคัญของ *Shigella* เช่น IpaA IpaB และ IpaC โปรตีนเหล่านี้จัดเป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) ที่สำคัญของ *Shigella* ยีนควบคุมการสร้าง

โปรตีนเหล่านี้อยู่ใน พลาสมิด (ตารางที่ 2.3) หน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้มีหลากหลายและส่งผลเสียต่อโฮสต์เซลล์ เช่น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานหลายอย่างภายในโฮสต์เซลล์ รบกวนการสื่อสารภายในโฮสต์เซลล์ (cellular communication) จนเซลล์ไม่อาจทำหน้าที่ได้ตามปกติ และทำให้เกิดการตายของโฮสต์เซลล์ (Yang and et al., 2015)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างของปัจจัยก่อโรคที่ถูกควบคุมโดยยีนในพลาสมิดของของ *Shigella*

Gene	Protein Product (Molecular weight: MW)	Regulatory or effector function
<i>virF</i>	30 kDa	Positive regulators of the <i>virG</i> and <i>ipa-mix-spa</i> loci
<i>invA (mxiB)</i>	38 kDa	Necessary for invasion: orients <i>ipa</i> gene products in outer membrane
<i>mxiA</i>	76 kDa	Same as above
<i>ippl</i>	18 kDa	Same as above
<i>ipaB</i>	62 kDa	Necessary for invasion: mediates endocytic uptake of <i>Shigella</i>
<i>ipaC</i>	43 kDa	Same as above
<i>ipaA</i>	38 kDa	Same as above
<i>ipaD</i>	78 kDa	Not necessary for invasion (role unknown)
<i>virB</i>	33 kDa	Positive regulator of the <i>virG</i> and <i>ipa-mxi-spa</i> loci
<i>virG (icsA)</i>	120 kDa	Assembles actin tails that propel the bacteria through the cell cytoplasm and into adjacent cells
<i>ipaH</i>	60 kDa	Has 5 alleles; IpaH7.8 facilitates the escape of <i>Shigella</i> from phagocytic vacuoles
<i>shET2</i>	60 kDa	ShET2 enterotoxin

ที่มา: Todar (2018: Web-Site)

ระยะฟักตัว (incubation period) ของโรค shigellosis โดยทั่วไปประมาณ 2-3 วัน แต่อาจยาวนานถึง 8 วันได้ อาการของโรคมักเกิดขึ้นแบบเฉียบพลัน โดยมีอาการเริ่มต้นคือ เสียดท้อง แล้วตามด้วยถ่ายเป็นน้ำ (watery diarrhea) อาการอื่นที่พบร่วมด้วย ได้แก่ มีไข้ ปวดศีรษะ รู้สึกไม่สบาย และเบื่ออาหาร ต่อมาอาการต่าง ๆ เหล่านี้อาจบรรเทาลง ตามด้วยอาการปวดเกร็งในท้อง และถ่ายแต่ละครั้งปริมาณอุจจาระไม่มากแต่อุจจาระมีมูกเลือดปน (bloody mucus stool) ผู้ป่วยอาจมีอาการได้

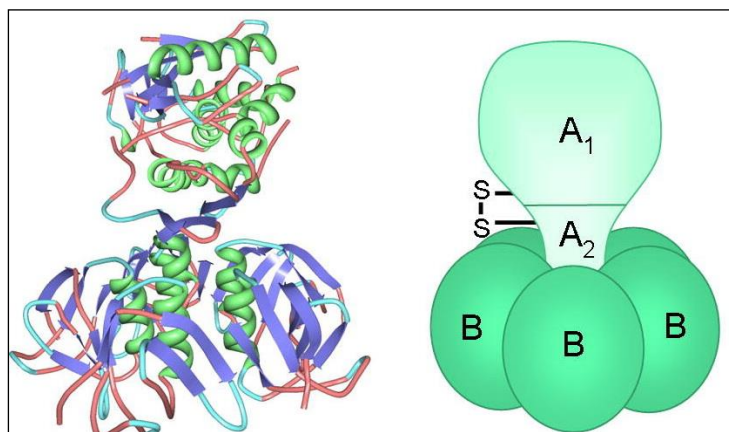
นานถึง 4 วัน แต่บางรายอาจพบอาการได้นานกว่า 2 สัปดาห์ โรคนี้อาจส่งผลให้เกิดอาการแทรกซ้อนเรียกว่าภาวะ Reiter's syndrome (reactive arthritis) ซึ่งเกิดขึ้นได้หลังจากหายจากโรค shigellosis แล้วนานหลายเดือนและพบในผู้ติดเชื้อบางรายเท่านั้น (Reiter's syndrome พบประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. flexneri*) อาการของ Reiter's syndrome อาจคงอยู่ได้นานหลายเดือนหรืออาจเป็นปี อาการที่พบในภาวะนี้ คือ ข้ออักเสบแบบเรื้อรัง (chronic arthritis) (โสภา คำมี, 2561)

ความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของ *Shigella* ต่างสปีชีส์จะแตกต่างกัน โดย *S. dysenteriae* type 1 มักพบที่มีความรุนแรงสูงโดยเฉพาะในเด็กเล็ก และยังพบบ่อยว่า *S. dysenteriae* type 1 สามารถทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนอีกลักษณะหนึ่งเรียกว่า haemolytic uraemic syndrome: HUS ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากผู้ป่วยหายจากโรค shigellosis ที่เกิดจากเชื้อ serotype ดังกล่าว โดยสาเหตุของภาวะนี้เกิดจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลายอย่างผิดปกติ ส่งผลให้เกิดการอุดตันของระบบการกรองของเสียภายในไต และทำให้เกิดไตวาย (kidney failure) จนผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ การติดเชื้อเนื่องจาก *S. flexneri* และ *S. boydii* มีความรุนแรงปานกลาง ส่วนการติดเชื้อเนื่องจาก *S. sonnei* มีความรุนแรงต่ำสุด แม้ว่าอัตราการตายด้วยโรค shigellosis จะค่อนข้างต่ำในประเทศที่พัฒนาแล้ว แต่โรคนี้ก็ยังคงเป็นปัญหาสำคัญและมีอัตราการตายสูงในประเทศกำลังพัฒนาหรือในผู้ที่ป่วยด้วยโรคอื่นอยู่ก่อนแล้ว (โสภา คำมี, 2561)

ตารางที่ 2.4 แบบที่เรียที่สร้าง shiga toxin และ shiga-like toxin

Source Organisms	Gene Designation	Toxin Names	Older Names
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>stx</i>	Shiga toxin (Stx)	Shiga toxin
<i>Escherichia coli</i>	<i>stx1</i>	Shiga toxin 1 (Stx1)	Shiga-like toxin I, Verotoxin 1
	<i>stx2</i>	Shiga toxin2 (Stx2)	Shiga-like toxin II, Verotoxin 2

ที่มา: Todar (2018: Web-Site)

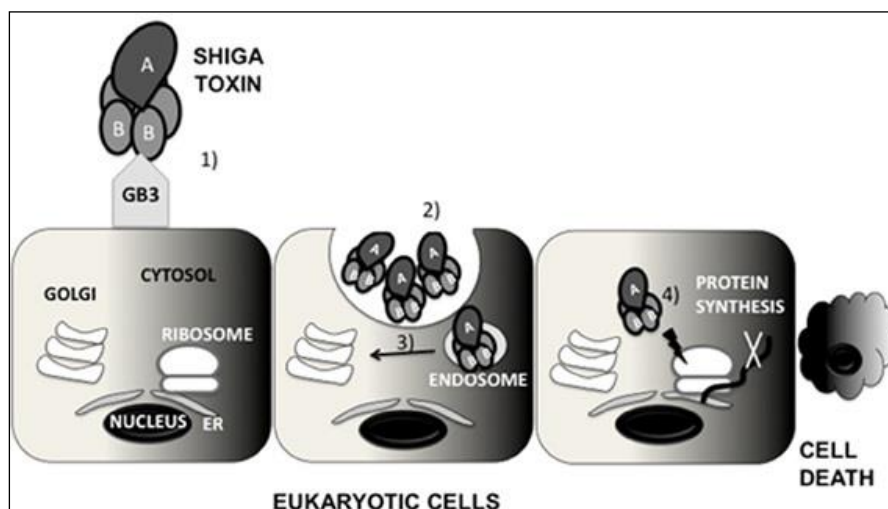


ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของ Shiga toxin

ที่มา: Sandvig and et al. (2010)

2.1.7 ท็อกซิน

แม้ว่า *Shigella* สามารถสร้างท็อกซินได้หลายชนิด แต่ชนิดที่เป็นที่รู้จักกันดีที่สุดสำหรับเชื้อนี้คือ shiga toxin ซึ่งจัดเป็นท็อกซินที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์ (cytotoxin) แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตท็อกซินที่มีฤทธิ์รุนแรง คือ *S. dysenteriae* type 1 ฤทธิ์ของ shiga toxin ใกล้เคียงมากกับ Verotoxin (VT) ที่สร้างจาก verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) ดังนั้นท็อกซินที่สร้างจาก *E. coli* แต่มีฤทธิ์คล้าย shiga toxin จึงถูกเรียกว่า shiga-like toxin (ตารางที่ 2.4) อย่างไรก็ตาม shiga toxin มีข้อแตกต่างจาก VT toxin คือ shiga toxin สร้างจากยีนที่อยู่ในโครโมโซม และมีรายงานว่าธาตุเหล็กมีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน shiga toxin กล่าวคือปริมาณท็อกซินจะถูกสร้างออกมามากเมื่อธาตุเหล็กมีปริมาณจำกัด การศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของ shiga toxin เมื่อฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำหรือทางช่องท้องของหนู (mouse) พบว่ามีค่า LD₅₀ น้อยกว่า 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม อาการของโรค shigellosis ที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ของ shiga toxin ได้แก่ ท้องเสียอย่างรุนแรง (dysentery) ลำไส้ใหญ่อักเสบจนตกเลือด (hemorrhagic colitis) และภาวะ haemolytic uraemic syndrome (Bergan, 2012)



ภาพที่ 2.11 กลไกการทำงานของ Shiga toxin

ที่มา: Pacheco and Sperandio (2012)

Shiga toxin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70.5 kDa จัดเป็น AB₅ toxin ซึ่งประกอบด้วยสองส่วนคือ A (active) subunit และ B (binding) subunit (ภาพที่ 2.10) จับกันด้วยพันธะ non-covalent โดย A subunit มีเพียง 1 monomer และมีฤทธิ์เป็นเอนไซม์ (N-glycosidase activity) ออกฤทธิ์ทำลาย 60S ribosome ในเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตาย ส่วน B subunit มีโครงสร้างเป็น pentamer (ประกอบด้วย 5 monomer) เป็นโครงสร้างที่ใช้จับกับ globotriaosylceramide (Gb3) ซึ่งเป็น receptor ที่พบอยู่บนผิวเซลล์เป้าหมาย (epithelial cell ใน intestinal mucosa) หลังจาก that B subunit จับกับเซลล์เป้าหมายแล้ว Shiga toxin จะถูกนำเข้าไปภายในเซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis และ A subunit จะถูกตัดออกจาก B subunit โดยเอนไซม์ fulin ที่อยู่ในเซลล์ เฉพาะ A1 เท่านั้นที่จะถูกส่งผ่าน Golgi apparatus ไปยัง endoplasmic reticulum (ER) เพื่อไปเจอกับเป้าหมายคือ ribosome (ภาพที่ 2.11) (Siciliani, 2018)

2.1.8 การรักษาและการป้องกัน

การวินิจฉัย *Shigella* ได้ตั้งแต่วัยเริ่มแรกของการติดเชื้อนั้นว่ามีความสำคัญต่อการรักษา ซึ่งการให้น้ำและสารเกลือแร่เพื่อชดเชยที่ร่างกายสูญเสียไปเป็นสิ่งที่ควรให้ความสำคัญมากที่สุด ยาปฏิชีวนะมีส่วนช่วยทำให้ระยะเวลาของการป่วยและการพบเชื้อในอุจจาระสั้นลง แต่ควรเลือกใช้เฉพาะในรายที่มีความรุนแรงของการเจ็บป่วยหรือเพื่อป้องกันผู้สัมผัส เช่น ในศูนย์รับเลี้ยงเด็กหรือสถาบันต่าง ๆ ที่มีข้อบ่งชี้ทางระบาดวิทยาว่าพบการติดต่อยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ตัวได้บ่อย การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะรักษาควรอาศัยผล antibiogram ของเชื้อที่แยกได้ หรือใช้ตาม antimicrobial susceptibility pattern ในท้องถิ่นนั้น และห้ามใช้ยาเพื่อลดการเคลื่อนไหวของลำไส้ เมื่อเพาะเชื้อ

จากอุจจาระพบเชื้อ *Shigella* spp. ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในเด็ก ได้แก่ tetracycline 25-50 มก./กก./วัน นาน 3 วัน หรือ norfloxacin 20 มก./กก./วัน นาน 3 วัน หรือ cotrimoxazole (trimetoprim) 10 มก./กก./วัน นาน 5 วัน furazolidone 5-8 มก./กก./วัน นาน 5 วัน ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในผู้ใหญ่ ได้แก่ tetracycline 500 มก. วันละ 4 ครั้ง นาน 3 วัน หรือ norfloxacin 800 มก./วัน นาน 3-5 วัน หรือ ciprofloxacin 1,000 มก./วัน นาน 3 วัน cotrimoxazole หรือ 160/800 มก. วันละ 2 ครั้ง นาน 3 วัน (สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค, 2561)

ปัญหาเกี่ยวกับโรคบิดมีค่อนข้างหลากหลาย ดังนั้นทุกหน่วยงานสาธารณสุขควรประเมินสถานการณ์เฉพาะท้องถิ่น และให้การป้องกันการแพร่กระจายโรคอย่างเหมาะสม ยังไม่สามารถกำหนดแผนดำเนินงานแบบเดียวกันสำหรับทุกสถานการณ์ ในภาวะที่มีอัตราป่วยตายสูงจากการติดเชื้อ *S. dysenteriae* type 1 ร่วมกับภาวะดื้อยาปฏิชีวนะ ควรมีการค้นหาแหล่งโรค สำหรับการระบาดที่เกิดขึ้นในสถาบันต่าง ๆ และในกรณีไม่ทราบเชื้อสาเหตุที่แน่นอน ควรแยกผู้ป่วยและผู้เริ่มป่วย และทำการเพาะเชื้อซ้ำในผู้ป่วยและผู้ใกล้ชิด การระบาดที่ยากต่อการควบคุมคือการระบาดในเด็กเล็ก (เพราะยังไม่สามารถใช้ส้วมอย่างถูกสุขลักษณะ) ในกลุ่มคนที่มีปัญหาด้านจิตประสาท และในสภาวะที่ขาดแคลนน้ำดื่ม น้ำใช้ (สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค, 2561)

จุดเริ่มต้นของการระบาดของโรค shigellosis มาจาก *Shigella* ในอุจจาระของผู้ป่วยหรือผู้เป็นพาหะ แผลงวันนับเป็นพาหะนำเชื้อที่สำคัญที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม ดังนั้นการควบคุมโรคจึงต้องอาศัยการรักษาสุขอนามัยส่วนบุคคลร่วมกับการควบคุมสิ่งแวดล้อม เช่น (1) ให้ความรู้แก่ประชาชนเกี่ยวกับการรักษาสวนครัวส่วนบุคคลเพื่อป้องกันมิให้เกิดการปนเปื้อนจากอุจจาระไปยังผู้อื่น ให้ความรู้เกี่ยวกับวิธีการเตรียมและปรุงอาหารให้ถูกสุขลักษณะ รณรงค์ให้รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ และล้างมือทุกครั้งก่อนรับประทานอาหาร (2) ผู้ป่วยควรได้รับการรักษาจนตรวจไม่พบเชื้อในอุจจาระติดต่อกันนาน 3 วัน ผู้ประกอบการทุกคนโดยเฉพาะผู้ประกอบการในสถานที่ ที่อาหารถูกแจกจ่ายไปยังคนจำนวนมาก ควรได้รับการตรวจอุจจาระและไม่พบเชื้อติดกัน 6 ครั้ง จึงได้รับอนุญาตให้ประกอบอาหารได้ และควรได้รับการตรวจซ้ำอีกเป็นครั้งคราว (3) การเลี้ยงทารกด้วยนมมารดาสามารถช่วยลดปัญหาการติดเชื้อ *Shigella* ในทารกให้ลดลงได้มาก โดยเฉพาะทารกซึ่งอยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากในน้ำนมมารดามีภูมิคุ้มกันชนิด IgA ที่สามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ดี (โสภา คำมี, 2561)

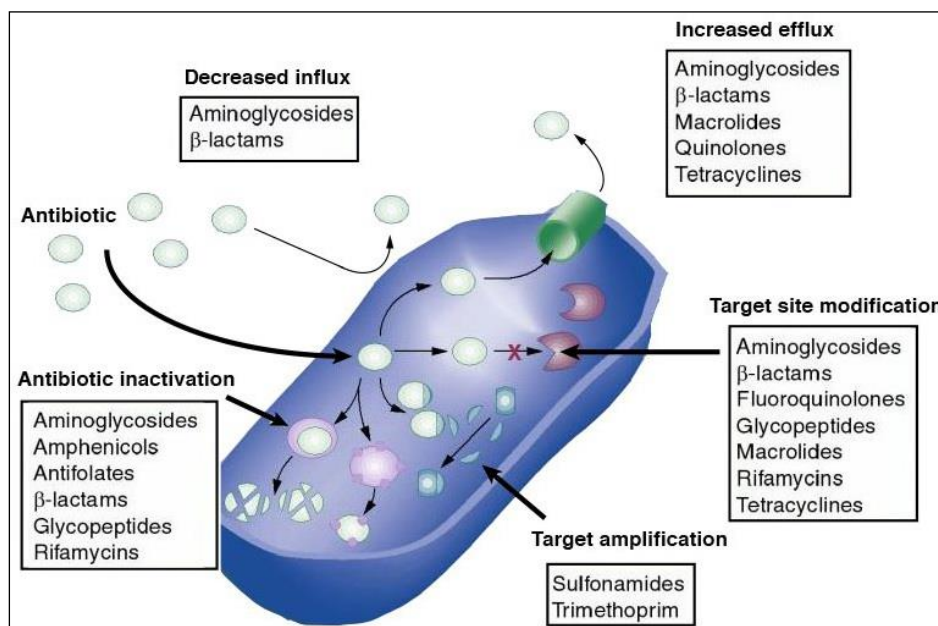
2.1.9 ภูมิคุ้มกันและวัคซีน

ผู้ที่ติดเชื้อ *Shigella* serotype ใดแล้ว จะไม่ติดเชื้อ serotype เดิมซ้ำอีกเป็นเวลานานหลายปี แต่ยังสามารถติดเชื้อ serotype อื่นได้ แอนติบอดีต่อเชื้อสามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือดของผู้ที่เคยได้รับเชื้อ อิมมูโนโกลบูลินที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อนี้คือ secretory IgA ส่วนบทบาทของ cellular immune response ต่อเชื้อ *Shigella* มีน้อยมาก เนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้อง

กับ virulence factors ส่วนใหญ่ (เช่น effector molecules ต่าง ๆ ยกเว้น Shiga toxin) พบอยู่ในพลาสมิด ดังนั้นจึงเชื่อว่าการถ่ายทอดความสามารถในการก่อโรกระหว่าง *Shigella* ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันน่าจะถูกส่งผ่านทางพลาสมิด การที่ *Shigella* มีโครงสร้างของ O antigen ที่แตกต่างกันได้หลากหลาย จึงทำให้เชื่อมีจำนวน serotype ได้มากตามไปด้วย ลักษณะตามธรรมชาติของเชื้อเช่นนี้จึงส่งผลให้เชื้อสามารถหลบหลีกจากการถูกทำลายโดย humoral immune response ได้ง่าย วัคซีนป้องกันโรค shigellosis กำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนา (Todar, 2018)

2.1.10 กลไกการดื้อยา

สาเหตุสำคัญที่ทำให้การติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยทั่วไป มีความรุนแรงและยากต่อการควบคุม คือ เชื้อดื้อยา ดังนั้นเมื่อใช้ยาที่เชื้อดื้อมาทำการรักษา ก็ยังเพิ่มโอกาสให้เชื้อนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้มากยิ่งขึ้นในขณะที่เชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไวต่อยาจะถูกควบคุม การดื้อยาของแบคทีเรียเกิดจากเชื้อมีการพัฒนาสายพันธุ์อยู่ตลอดเวลา กลไกที่เชื้อใช้ในการดื้อยา (antibiotic resistance mechanism) (ภาพที่ 2.12) ได้แก่ (1) decreased influx หมายถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้ยาผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง (2) antibiotic inactivation หมายถึงแบคทีเรียสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ออกไปทำลายหรือยับยั้งฤทธิ์ของยา เช่น สร้างเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส (β -lactamase) ออกมาทำลายยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -lactamase เช่น penicillin cephalosporin monobactam เป็นต้น (3) target site modification/amplification หมายถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างภายในเซลล์ ส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับโครงสร้างนั้นได้ จึงไม่มีผลใด ๆ ต่อเซลล์ (4) increased efflux หมายถึงเพิ่มกลไกการขับยาออกจากเซลล์ให้รวดเร็วขึ้น เพื่อลดความเป็นพิษของยาที่จะเกิดขึ้นกับตัวเซลล์ นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ DNA gyrase ยังมีบทบาทสำคัญทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม quinolones อีกด้วย แบคทีเรียดื้อยาส่วนใหญ่มักได้รับยีนดื้อยา (antibiotic resistant gene) ถ่ายทอดมาทางพลาสมิด (Lin, 2018)



ภาพที่ 2.12 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย

ที่มา: Lin (2018: Web-Site)

อรุณ บำรุงกุลนนท์ (2561) ทดสอบความไวของ *Shigella* spp. ต่อด้านยาจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อเหล่านี้ได้มาจากห้องปฏิบัติการทั่วประเทศไทย และถูกส่งมายังศูนย์ทดสอบยืนยันเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella* แห่งชาติจำนวนทั้งสิ้น 200 สายพันธุ์ โดยรวบรวมไว้ระหว่างปี พ.ศ. 2535-2538 ประกอบด้วย *S. dysenteriae* 21 สายพันธุ์ *S. flexneri* 83 สายพันธุ์ *S. boydii* 20 สายพันธุ์ และ *S. sonnei* 76 สายพันธุ์ ผลการทดสอบพบว่า *S. dysenteriae* มีอัตราการดื้อต่อยา chloramphenicol tetracycline trimethoprim/ sulfamethoxazole (TMP- SMZ) และ streptomycin ร้อยละ 76.20, 90.50, 47.60 และ 23.80 ตามลำดับ *S. flexneri* มีอัตราการดื้อต่อยา ampicillin chloramphenicol tetracycline TMP-SMZ และ streptomycin ร้อยละ 85.50, 81.90, 87.95, 56.60 และ 85.50 ตามลำดับ *S. boydii* มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline TMP-SMZ และ streptomycin ร้อยละ 50, 25 และ 50 ตามลำดับ *S. sonnei* มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline TMP-SMZ และ streptomycin ร้อยละ 43.40, 46 และ 78.90 ตามลำดับ

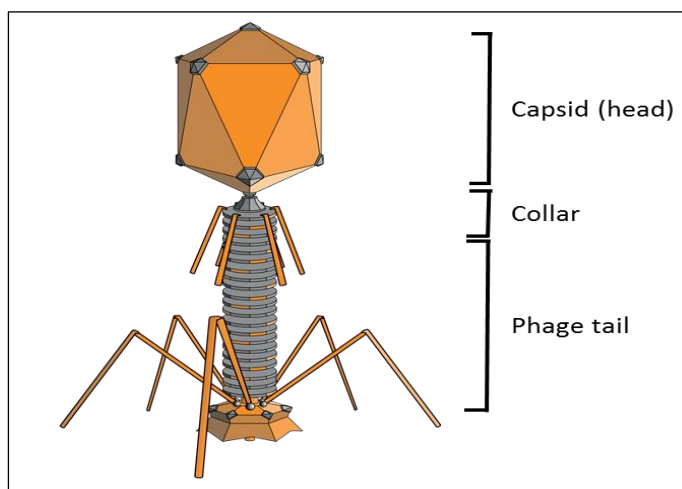
2.2 Bacteriophage

2.2.1 โครงสร้างและส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage หรือ phage) คือ ไวรัสของแบคทีเรีย หรืออาจกล่าวได้ว่า คือ ไวรัสที่สามารถดำรงชีวิตได้โดยใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ (host) แบคทีริโอเฟจสามารถพบได้ทั่วไปทุกหนแห่ง เช่น ในน้ำ ในอากาศ ในดิน และในลำไส้ของคนและสัตว์ เป็นต้น

แบคทีริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรก โดย Dr. Felix Hubert d'Herelle ใน ค.ศ. 1915 โดยเป็นแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบิด (bacillary dysentery) โดยการให้ผู้ป่วยโรคบิดกินแบคทีริโอเฟจที่เตรียมขึ้น คำว่า “bacteriophage” มาจากคำ 2 คำรวมกันคือ “bacteria” และ “phagein” (ภาษา Greek แปลว่า “กิน”) หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่กินแบคทีเรีย หรือทำให้แบคทีเรียตาย

แบคทีริโอเฟจเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ สารพันธุกรรม และ แคปซิด (capsid) สารพันธุกรรม หรือจีโนม (genome) ของแบคทีริโอเฟจอาจเป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ ทำให้สามารถแบ่งแบคทีริโอเฟจออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามชนิดของจีโนม คือ DNA phage และ RNA phage นอกจากนี้จีโนมของแบคทีริโอเฟจยังอาจเป็นสายเดี่ยว (single stranded) หรือสายคู่ (double stranded) และอาจมีลักษณะเป็นเส้นตรง (linear) หรือเป็นวงกลม (circular) ก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีริโอเฟจ จีโนมของแบคทีริโอเฟจถูกห่อหุ้มไว้ด้วยแคปซิด (capsid) ของแบคทีริโอเฟจคือโปรตีนที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มจีโนมของแบคทีริโอเฟจ แคปซิด ส่วนใหญ่ (ยกเว้น filamentous phage) ประกอบด้วยส่วนหัว (head) และส่วนหาง (tail) ส่วนหัวของแคปซิดมีรูปร่างเป็นแบบ polyhedral คือมีลักษณะเป็นรูปทรงหลายเหลี่ยมที่สมมาตร (ภาพที่ 2.13) ในขณะที่ส่วนหางมีลักษณะเป็นท่อกว้าง (hollow tube) ซึ่งจีโนมของแบคทีริโอเฟจสามารถเคลื่อนที่จากส่วนหัวมาตามท่อหาง และสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียได้ขณะที่แบคทีริโอเฟจบุกรุก (infect) เข้าสู่โฮสต์ บริเวณส่วนหางนี้อาจพบโครงสร้างที่แบคทีริโอเฟจใช้ในการยึดเกาะกับเซลล์แบคทีเรีย เช่น base plate, tail pin เป็นต้น โดยโครงสร้างที่ใช้ในการยึดเกาะนี้จะจับกับ receptor ที่อยู่บนเซลล์แบคทีเรีย แบคทีริโอเฟจบางชนิดมีหางที่สามารถยืด-หดได้ (contractile tail) บางชนิดมีหางยาวยืด-หดไม่ได้ (non-contractile tail) บางชนิดมีหางสั้น และบางชนิดไม่มีหาง ซึ่งลักษณะของหางมีส่วนสำคัญในการจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจ (Ackermann, 2001)



ภาพที่ 2.13 รูปร่างโดยทั่วไปของแบคทีริโอเฟจ

ที่มา: University of Leicester (2018: Web-Site)

2.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลาย และมีความแตกต่างกันทั้งรูปร่าง สารพันธุกรรม และการดำรงชีวิต International Committee for Taxonomy of Viruses: ICTV เป็นองค์กรที่ทำหน้าที่กำหนดเกณฑ์การจำแนกไวรัส โดยกำหนดให้ไวรัสมีชื่อ order ลงท้ายด้วย –virales และชื่อ family ลงท้ายด้วย –viridae ไวรัสถูกจำแนกออกเป็น 3 order 61 family และ 241 genus ส่วนแบคทีริโอเฟจถูกจำแนกออกเป็น 13 family และ 30 genus การจำแนกแบคทีริโอเฟจตามเกณฑ์ของ ICTV จะอาศัยรูปร่างร่วมกับชนิดของสารพันธุกรรม (ตารางที่ 2.5 และภาพที่ 2.14) (Ackermann, 2003) แบคทีริโอเฟจสามารถแบ่งตามรูปร่างได้ 4 กลุ่ม คือ (1) tailed phage หมายถึงแบคทีริโอเฟจที่มีหาง (2) polyhedral phage หมายถึงแบคทีริโอเฟจที่มีหัวรูปร่างหลายเหลี่ยม (3) filamentous phage หมายถึงแบคทีริโอเฟจที่มีรูปร่างเป็นสายยาว (4) pleomorphic phage หมายถึงแบคทีริโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (ตารางที่ 2.5 และภาพที่ 2.14) และแบคทีริโอเฟจส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA และมักพบอยู่ในกลุ่ม tailed phage (Ackermann, 2003)

Tailed phage เป็นแบคทีริโอเฟจกลุ่มที่พบมากที่สุด มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีริโอเฟจทั้งหมด ลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีริโอเฟจกลุ่มนี้ คือ ส่วนหัวมีลักษณะสมมาตรแบบลูกบาศก์ (cubic symmetry) อาจเรียกว่า isometric head หรือ polyhedral head หรือ icosahedral head ขึ้นอยู่กับรูปร่างของ capsid โปรตีนโครงสร้างของหางมีการเรียงตัวแบบเกลียว เรียกว่า helical tail มีสารพันธุกรรมแบบ linear double-stranded DNA (dsDNA) มี capsid หุ้มสารพันธุกรรม ไม่มี envelope ขนาดของสารพันธุกรรม และความยาวของหางแตกต่างกันไปตาม

ชนิดของแบคทีริโอเฟจ tailed phage จัดอยู่ใน order Caudovirales แบ่งออกเป็น 3 family คือ (1) Siphoviridae เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหางยาว หางยืด-หดไม่ได้ (noncontractile tail) มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของ tailed phage อยู่ใน family นี้ (2) Myoviridae เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหางที่ส่วนหางสามารถยืด-หดได้ (contractile tail) พบประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ของ tailed phage และ (3) Podoviridae เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหางสั้น (short tail) พบได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ของ tailed phage (Ackermann, 2003)

Polyhedral phage เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีรูปร่างแบบลูกบาศก์ (cubic symmetry) สารพันธุกรรมมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีริโอเฟจ polyhedral phage แบ่งออกเป็น 5 family คือ (1) Microviridae มีสารพันธุกรรมเป็น circular single-stranded DNA (ssDNA) และถูกห่อหุ้มด้วย capsid ซึ่งมีรูปร่างแบบ isometric ลักษณะเด่นของแบคทีริโอเฟจ family นี้คือ ขนาดเล็ก (2) Corticoviridae มีสารพันธุกรรมเป็น circular double-stranded DNA ลักษณะเด่นของแบคทีริโอเฟจใน family นี้คือ capsid ประกอบด้วย ชั้นของโปรตีน 2 ชั้น โดยมีชั้นของ lipid bilayer แทรกอยู่ตรงกลาง (3) Tectiviridae มีสารพันธุกรรมเป็น linear double-stranded DNA ลักษณะเด่นของแบคทีริโอเฟจใน family นี้คือ มี capsid ที่แข็งแรง (rigid protein capsid) และมี lipoprotein vesicles อยู่ภายใน (internal lipoprotein vesicles) ซึ่งในขณะที่แบคทีริโอเฟจใน family นี้เกาะที่ผิวของแบคทีเรีย vesicle ดังกล่าวจะเปลี่ยนไปเป็นท่อ (tail-like tube) ที่มีความยาวประมาณ 60 นาโนเมตร ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นทางให้ DNA ถูกปล่อยจากแบคทีริโอเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (4) Leviviridae มีสารพันธุกรรมเป็น linear, double-strand RNA ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วย capsid ที่มีโครงสร้างแตกต่างจาก RNA virus ทั่วไป แบคทีริโอเฟจใน family นี้มีลักษณะคล้าย polioviruses และ (5) Cystoviridae มีสารพันธุกรรมเป็น linear double-stranded RNA ลักษณะเด่นของแบคทีริโอเฟจใน family นี้คือ มี envelope ล้อมรอบ capsid และแบคทีริโอเฟจใน family นี้สามารถบุกรุกได้เฉพาะ *Pseudomonas syringae* เท่านั้น (Ackermann, 2003)

Filamentous phage เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีรูปร่างเป็นสายยาวหรือคล้ายเส้นใย แบคทีริโอเฟจกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น 3 family คือ (1) Inoviridae มีสารพันธุกรรมเป็น circular, single-stranded DNA แบ่งออกเป็น 2 genus คือ Inovirus และ Plectrovirus ลักษณะเด่นของ Inovirus คือมีรูปร่างเป็นสายยาว (long filament) อาจแข็ง (rigid) หรือยืดหยุ่นได้ (flexible) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีริโอเฟจ แบคทีริโอเฟจนี้ไว (sensitive) ต่อคลอโรฟอร์ม (chloroform) แต่ทนความร้อนได้ดี โอสต์สำหรับแบคทีริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Clostridium* และ *Propionibacterium* ส่วนลักษณะเด่นของ Plectrovirus คือมีรูปร่างเป็นสายสั้นๆ (short straight rod) โอสต์สำหรับแบคทีริโอเฟจกลุ่มนี้คือ Mycoplasma (2) Lipothrixviridae มีสารพันธุกรรม เป็น linear double-

stranded DNA มีรูปร่างเป็นแท่งตรงแข็ง (straight rigid rod) คล้ายกับ tobacco mosaic virus (Ackermann, 2003)

Pleomorphic phage เป็นแบคทีเรียโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน แบคทีเรียโอเฟจทุกชนิดในกลุ่มนี้มีสารพันธุกรรมเป็น circular double-stranded DNA แบ่งออกเป็น 2 family คือ (1) Plasmaviridae เป็นแบคทีเรียโอเฟจที่ไม่มี capsid แต่มี envelope ห่อหุ้มสารพันธุกรรมไว้ โฮสต์ของแบคทีเรียโอเฟจกลุ่มนี้คือ Mycoplasma เมื่อแบคทีเรียโอเฟจจะบุกรุกเข้าสู่โฮสต์ envelope ของแบคทีเรียโอเฟจจะเชื่อม (fuse) เข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของโฮสต์ และหลังจากเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แล้ว progeny phage จะออกจากเซลล์โดยวิธี budding ซึ่งไม่ทำให้เซลล์ของโฮสต์แตก และ (2) Fuselloviridae เป็นแบคทีเรียโอเฟจที่มีรูปร่างคล้ายผลมะนาว (lemon-shaped) และมีหนามสั้น ๆ (short spike) อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาคเฟจ แคปซิดประกอบด้วยโปรตีน (hydrophobic protein) สองชนิดและไขมันซึ่งได้มาจากส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ แคปซิดถูกทำลายได้ด้วย chloroform หลังจากเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แล้ว progeny phage จะออกจากเซลล์โดยวิธี extrusion (Ackermann, 2003)

ตารางที่ 2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอเฟจ (Ackermann, 2003)

Shape	Nucleic acid	Families	Genera	Examples	Members	Characteristics
Tailed	DNA, ds, L	<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Tail contractile
	DNA, ds, L	<i>Siphoviridae</i>	6	λ	3011	Tail long, noncontractile
	DNA, ds, L	<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Tail short
Polyhedral	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	ϕ X174	40	Complex capsid, lipids
	DNA, ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	3	Internal lipoprotein vesicle
	DNA, ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	18	Envelope, lipids
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	
	RNA, ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	ϕ 6	1	
Filamentous	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	Fd	57	Filaments or rods
	DNA, ds, L	<i>Lipothirixviridae</i>	1	TTV1	6	Envelope, lipids
	DNA, ds, L	<i>Rudoviridae</i>	1	SIRV1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	62	Envelope, lipids, no capsid
	DNA, ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	8	Spindle-shaped, no capsid

หมายเหตุ: C = circular

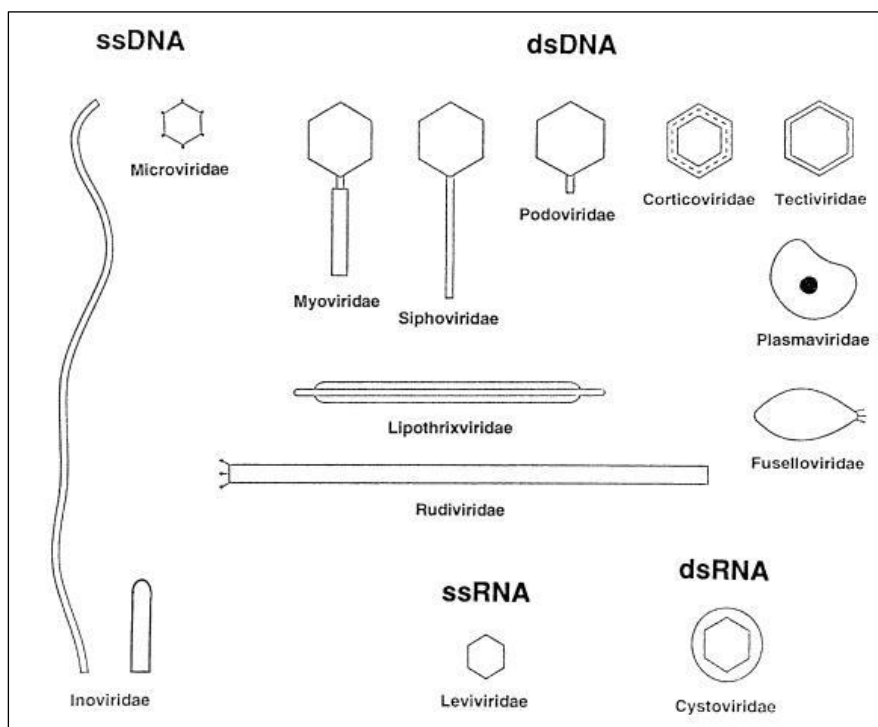
L = linear

S = segmented

T = superhelical

ss = single-stranded

ds = double-stranded



ภาพที่ 2.14 รูปร่างลักษณะของแบคทีริโอเฟจที่อยู่ใน family ต่าง ๆ

ที่มา: นิตยา คำคุ้ม และคณะ (2553)

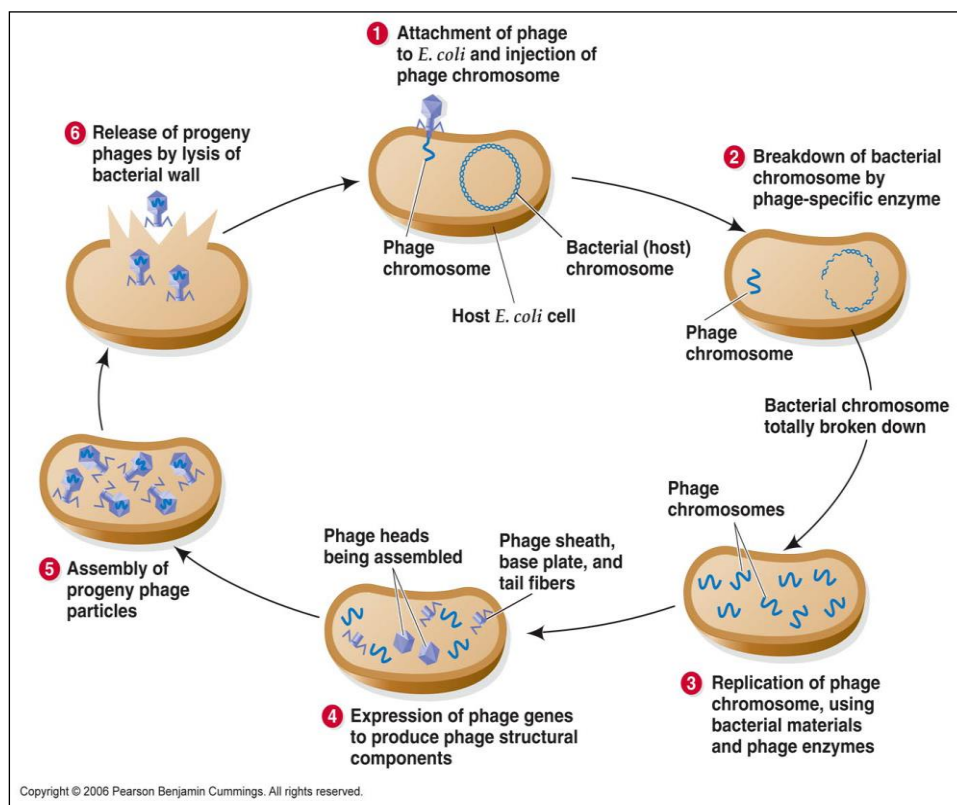
2.2.3 Lytic cycle and Lysogeny

การดำรงชีวิตของแบคทีริโอเฟจไม่มีความแตกต่างจากไวรัสทั่วไป โดยแบคทีริโอเฟจจัดเป็น obligate intracellular parasite หมายถึงต้องเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งก็คือแบคทีเรีย และอาศัยกลไกภายในเซลล์เพื่อการดำรงชีวิต วงจรชีวิต (life cycle) ของแบคทีริโอเฟจอาจเป็นไปได้ 2 แบบ คือ lytic cycle และ lysogenic cycle (หรือ lysogeny) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถแบ่งแบคทีริโอเฟจออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามรูปแบบการดำรงชีวิตในโฮสต์ คือ (1) lytic phage หรือ virulent phage หมายถึงแบคทีริโอเฟจที่ดำรงชีวิตภายในโฮสต์แบบ lytic cycle เช่น T phage และ (2) lysogenic phage หรือ temperate phage หมายถึงแบคทีริโอเฟจที่ดำรงชีวิตภายในโฮสต์แบบ lysogenic cycle เช่น lambda (λ) phage

lytic cycle หมายถึง การดำรงชีวิตของแบคทีริโอเฟจภายในเซลล์ของโฮสต์แบบมีการสร้างแบคทีริโอเฟจใหม่เป็นจำนวนมากภายในเซลล์ แบคทีริโอเฟจที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้ เรียกว่า progeny phage ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนแบคทีริโอเฟจตัวแรกที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการเพิ่มจำนวน (phage replication) ภายในเซลล์แล้ว progeny phage ที่ถูกสร้างขึ้นเหล่านี้จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์โดยแบคทีริโอเฟจจะสร้างสารบางอย่าง (เช่น lysis) ออกมาเพื่อทำลายผนังเซลล์ และทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย (lysis) และตายไปในที่สุด ซึ่งเป็นที่มาของชื่อการ

ดำรงชีวิตแบบนี้ progeny phage ที่ถูกปล่อยออกมาจากแบคทีเรียที่ตายแล้ว ก็จะเข้าสู่เซลล์ใหม่ที่อยู่ข้างเคียงหรือในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้น แล้วเริ่มต้นบุกรุกเซลล์ใหม่เป็นวงจรแบบนี้ต่อไป ด้วยเหตุนี้ lytic phage จึงสามารถทำให้เกิดการตายของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์เป็นวงกว้าง หรือจนกว่าโฮสต์จะหมดไป

lytic cycle ของแบคทีริโอเฟจโดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 6 ขั้นตอนสำคัญดังนี้ (ภาพที่ 2.15) (1) adsorption หรือ attachment เป็นขั้นตอนเริ่มแรกของการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ โดยแบคทีริโอเฟจจะใช้โครงสร้างบางอย่างที่อยู่บนแคปซิด ไปจับกับโครงสร้างบางอย่างที่อยู่บนผิวเซลล์แบคทีเรีย ทั้งนี้โครงสร้างที่แบคทีริโอเฟจใช้ในการยึดเกาะนี้อาจเรียกโดยรวมว่า attachment site และตำแหน่งที่อยู่บนผิวของเซลล์แบคทีเรีย และจำเพาะต่อ attachment site เรียกว่า receptor site ขั้นตอนนี้เป็นตัวกำหนดความจำเพาะ (specificity) ระหว่างแบคทีริโอเฟจและโฮสต์ (2) injection หรือ penetration เป็นขั้นตอนการฉีด (inject) จีโนมของแบคทีริโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์ ซึ่งจีโนมจากส่วนหัวซึ่งอยู่ภายในแคปซิดจะถูกส่งผ่านไปตามท่อหางและเคลื่อนที่เข้าไปในเซลล์ (3) viral genome synthesis เป็นขั้นตอนการสร้างจีโนมของแบคทีริโอเฟจเพื่อให้ได้จำนวนมาก ๆ ทั้งนี้ก่อนที่จะสร้างจีโนม แบคทีริโอเฟจบางชนิดอาจจำเป็นต้องสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์บางอย่างที่จำเป็นต่อการสร้างจีโนมขึ้นมาก่อน อีกทั้งแบคทีริโอเฟจยังสามารถทำให้โครโมโซมของแบคทีเรียถูกทำลายไปได้ด้วย (4) viral protein synthesis เป็นขั้นตอนการสร้างโปรตีนซึ่งถูกควบคุม หรือกำหนดโดยจีโนมของแบคทีริโอเฟจอาศัยกลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์ โปรตีนที่สร้างในช่วงนี้มักเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างหรือส่วนประกอบต่าง ๆ ของแบคทีริโอเฟจ (5) assembly เป็นการนำส่วนประกอบต่าง ๆ ของแบคทีริโอเฟจที่ถูกสร้างขึ้นเป็นจำนวนมากภายในเซลล์มาประกอบ หรือรวมกันให้ได้เป็นอนุภาคแบคทีริโอเฟจที่สมบูรณ์ (complete virion หรือ complete bacteriophage particle) ที่เรียกว่า progeny phage ซึ่งจำนวนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีริโอเฟจ และ (6) release เป็นขั้นตอนการปลดปล่อย progeny phage ออกสู่ภายนอกโดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และเมื่อเลี้ยงแบคทีริโอเฟจที่ใช้วงจรการดำรงชีวิตแบบ lytic cycle ร่วมกับแบคทีเรียแล้วผสมวัฒนธรรมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสังเกตเห็นแบคทีเรียถูกทำลายเป็นวงใส เรียกว่า plaque (ภาพที่ 2.16) (Pearson Benjamin Commings, 2018)



ภาพที่ 2.15 การดำรงชีวิตของแบคทีริโอเฟจแบบ lytic cycle
ที่มา: Pearson Benjamin Cummings (2018: Web-Site)



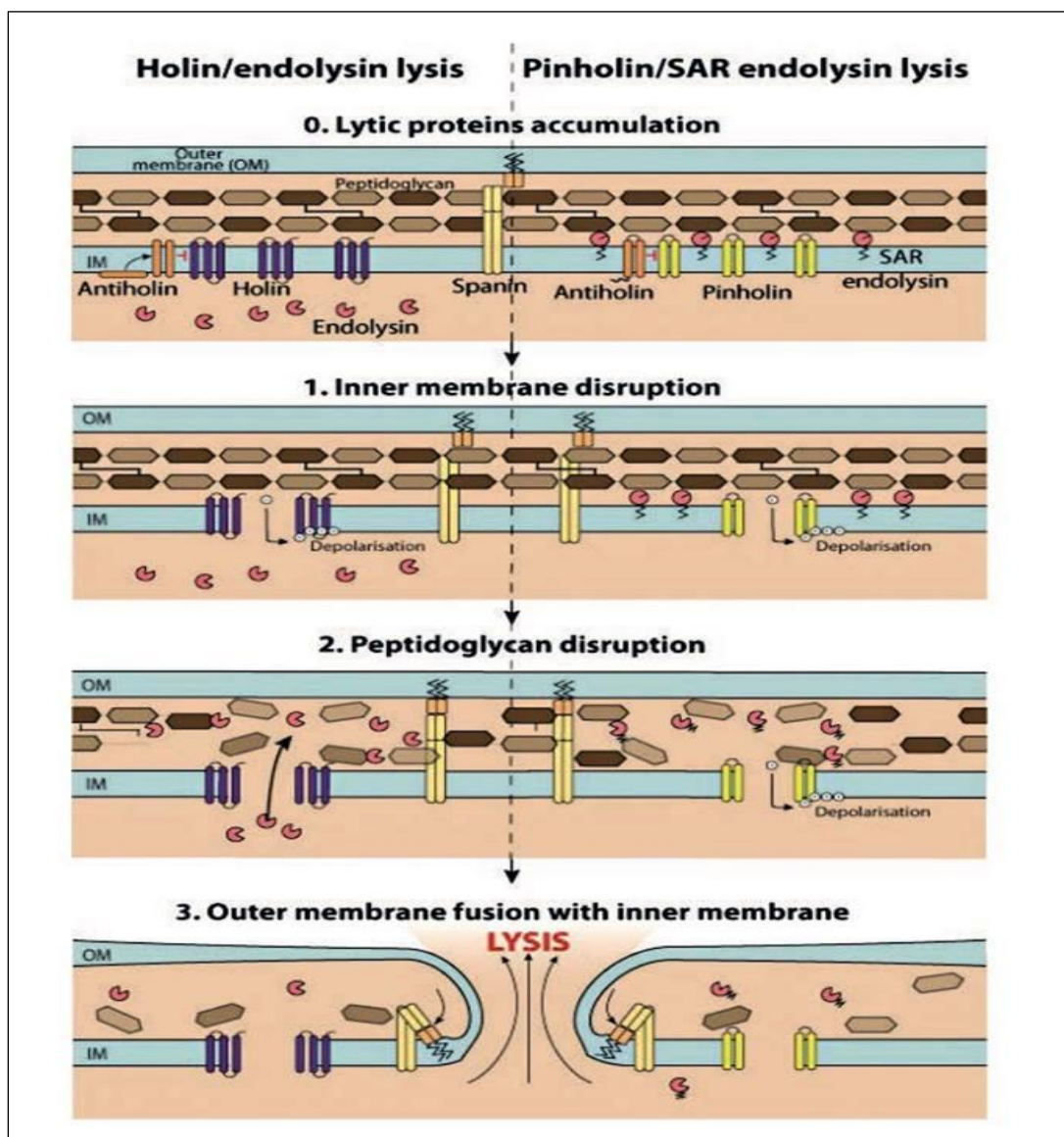
ภาพที่ 2.16 ลักษณะของ plaque ที่ปรากฏบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
ที่มา: นิตยา คำคุ้ม และคณะ (2553)

การทำลายเซลล์แบคทีเรียโดย lytic phage อาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีน (ของแบคทีเรียโอเฟจ) 2 ชนิด คือ holin (หรือ pinholin) และ endolysin

ในกรณีของ holin/endolysin pathway ในระยะแรก holin monomer จะสอดแทรกเข้าไปใน inner membrane ของแบคทีเรีย แล้วประกอบกันเป็น holin oligomers ทำให้เกิดรูขึ้นที่บริเวณ inner membrane ในระยะนี้อาจมี antiholin มาขัดขวางการสร้าง holin oligomers แบคทีเรียโอเฟจจึงมักสร้าง antiholin inhibitor มายับยั้งการทำงานของ antiholin จนกว่าการสร้าง holin oligomers จะเสร็จสิ้น การเกิดรูขึ้นที่บริเวณ inner membrane จะทำให้เกิดกระบวนการ depolarization (การเปลี่ยนแปลงประจุไฟฟ้าภายในเซลล์) ซึ่งส่งผลให้ soluble active endolysin จาก cytoplasm เคลื่อนที่เข้าไปทำลายชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์ เมื่อชั้น peptidoglycan ถูกทำลายไป โปรตีน spanin ที่ฝังตัวในผนังเซลล์ถูกปลดปล่อย และเกิดการม้วนลงมารวมตัวกันของ inner membrane และ outer membrane จนส่งผลให้เกิดการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (ภาพที่ 2.17) (อภิญา นามสาย, 2560)

ในกรณีของ pinholin/SAR endolysin pathway ในระยะแรก pinholin monomer จะสอดแทรกเข้าไปใน inner membrane ของแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้เกิดรูขึ้นที่บริเวณ inner membrane การเกิดรูขึ้นที่บริเวณ inner membrane จะทำให้เกิดกระบวนการ depolarization ซึ่งส่งผลให้ signal-arrest release endolysins (SAR endolysin) หลุดออกจาก inner membrane เพื่อไปทำลายชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์ SAR endolysin เป็น endolysin ชนิดหนึ่งที่ปกติจะเกาะอยู่ที่ผิวของ inner membrane เมื่อชั้น peptidoglycan ถูกทำลายไป โปรตีน spanin ที่ฝังตัวในผนังเซลล์ถูกปลดปล่อย และเกิดการม้วนลงมารวมตัวกันของ inner membrane และ outer membrane จนส่งผลให้เกิดการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (ภาพที่ 2.17) (อภิญา นามสาย, 2560)

การทำลายเซลล์แบคทีเรียโดย lytic phage ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการทำลายเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ซึ่งมี outer membrane โดย lytic phage ส่วนในกรณีของการทำลายเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) โดย lytic phage จะมีส่วนที่แตกต่างกันดังนี้ โดยปกติแล้วเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกไม่มี outer membrane แต่จะมีชั้น peptidoglycan ที่หนาและอยู่ด้านนอกสุด ดังนั้น endolysin จึงสามารถทำงานเป็น exolysin ได้ด้วย โดยย่อย peptidoglycan จากทั้งด้านนอกและด้านในของเซลล์



ภาพที่ 2.17 กลไกการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียโดยแบคทีริโอเฟจ

ที่มา: อภิญา นามสาย (2560)

โครงสร้างและการทำงานของ endolysin หรือ phage lysozyme เป็นเอนไซม์ของแบคทีริโอเฟจที่ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ C-terminal binding domain N-terminal catalytic domain และ L (ภาพที่ 2.18) โดย C-terminal binding domain หรือ substrate recognition ทำหน้าที่จดจำและจับกับ substrate ที่จำเพาะบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และ N-terminal catalytic domain หรือ enzymatic hydrolysis ทำหน้าที่ตัดพันธะหลัก (major bond) บริเวณชั้นของ peptidoglycan ของแบคทีเรียให้แยกออก ส่วน L คือ linker ซึ่งเป็น peptide สายสั้น ๆ ที่เชื่อมระหว่างโครงสร้างทั้งสองส่วนที่กล่าวมาแล้ว (นิตยา คำคุ้ม และคณะ, 2553)

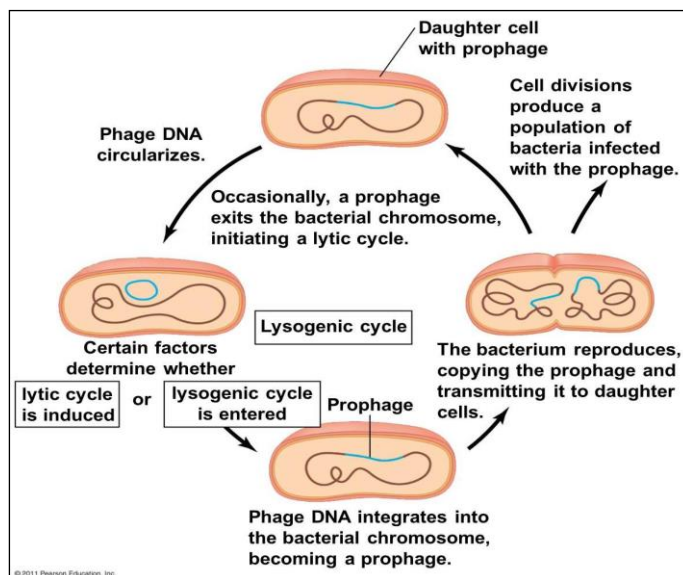


ภาพที่ 2.18 โครงสร้างของ endolysin โดย N (N-terminal) คือด้านที่ทำหน้าตัด C (C terminal) คือด้านที่จับอย่างจำเพาะ และ L คือ linker

ที่มา: นิตยา คำคุ้ม และคณะ (2553)

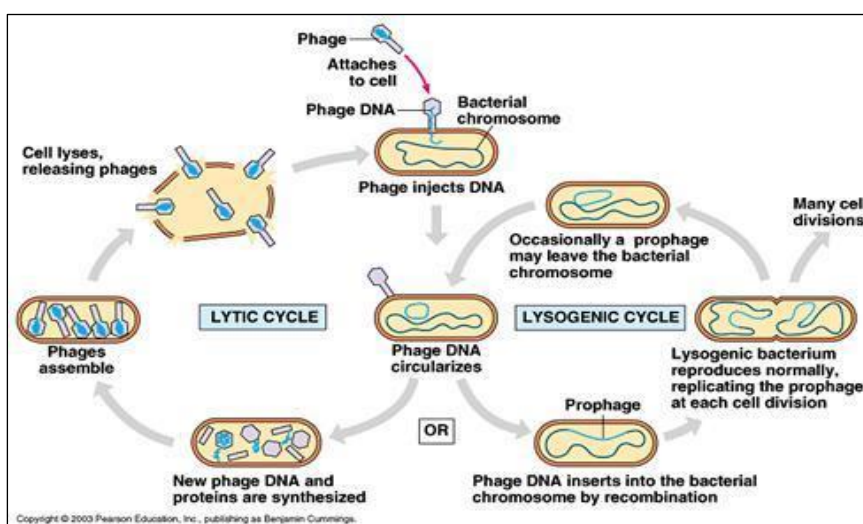
Lysogenic cycle หรือ lysogeny เป็นลักษณะของการดำรงชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจ (ภาพที่ 2.19) การดำรงชีวิตแบบนี้มีขั้นตอน adsorption และ injection เหมือนกับ lytic cycle ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่หลังจากที่จีโนมของแบคทีเรียโอเฟจเข้าสู่ภายในโฮสต์แล้วจะแตกต่างไปจาก lytic cycle กล่าวคือ แบคทีเรียโอเฟจที่ดำรงชีวิตแบบนี้จะไม่มีการสร้าง progeny phage ภายในโฮสต์ จีโนมของแบคทีเรียโอเฟจจะแทรก (integrate) เข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจที่อยู่ในระยะนี้เรียกว่า prophage ส่วนแบคทีเรียที่มี prophage อยู่ภายในเซลล์เรียกว่า lysogen การมี prophage แฝงอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรียเช่นนี้ไม่ผลทำให้เซลล์แตกหรือตาย แต่อาจทำให้แบคทีเรียเกิด mutation (เรียกว่า phage conversion) (Campos and et al., 2010) lysogen สามารถแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไปได้ โดยเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นทุกเซลล์จะยังมี prophage แฝงอยู่เช่นเดิม (daughter cell with prophage) หาก lysogen ถูกเลี้ยงให้เจริญเติบโตในบางสภาวะ (เช่น ขาดสารอาหาร ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV ความร้อนหรือสารเคมี เป็นต้น) จีโนมของแบคทีเรียโอเฟจสามารถกลับเข้าสู่ lytic cycle เพื่อปลดปล่อย progeny phage ออกนอกเซลล์ได้เช่นเดียวกับที่พบใน lytic cycle (Sridhar, 2006) การอยู่ร่วมกันระหว่างโฮสต์และแบคทีเรียโอเฟจ (prophage) สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยแบคทีเรียโอเฟจเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตผ่านทาง lateral หรือ horizontal gene transfer ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย เช่น เปลี่ยนแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (nonpathogenic strain) เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง toxin และไม่ก่อโรคคอติบ เมื่อถูกบุกรุกด้วย β phage ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้งานชีวิตแบบ lysogeny จะกลายพันธุ์ไปเป็น *C. diphtheriae* สายพันธุ์ที่สร้าง toxin และสามารถก่อโรคคอติบได้ นอกจากนี้แล้วยังพบว่าการสร้าง toxin จาก *Clostridium botulinum* ซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (botulism) และการสร้าง toxin จาก β -hemolytic *Streptococcus* group A ซึ่งทำให้เกิดผื่นในโรคไข้ดำอัสแดง (scarlet fever) ยังสามารถเกิดขึ้นได้จากการที่แบคทีเรียถูกบุกรุกโดยแบคทีเรียโอเฟจที่ใช้งานชีวิตแบบ lysogeny ได้เช่นกัน

แบคทีริโอเฟจบางชนิดสามารถใช้วงจรชีวิตทั้งสองแบบ (lytic cycle และ lysogeny) ในการดำรงชีวิตได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อม สารอาหารภายในโฮสต์ โดยเรียกแบคทีริโอเฟจที่ดังกล่าวว่า temperate phage เช่น λ phage (ภาพที่ 2.20)



ภาพที่ 2.19 การดำรงชีวิตของแบคทีริโอเฟจแบบ lysogenic cycle

ที่มา: Pearson Benjamin Cummings (2018: Web-Site)



ภาพที่ 2.20 วงจรชีวิตของเฟจแบบ lytic (ซ้าย) และ lysogenic (ขวา)

ที่มา: นิตยา คำคุ้ม และคณะ (2553)

2.2.4 Bacteriophage Therapy

การค้นพบแบคทีริโอเฟจที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้นั้น เริ่มมีในราว ค.ศ. 1920 เป็นต้นมา แต่หลังจากนั้นประมาณ ค.ศ. 1930 ก็มีการค้นพบยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ (phage therapy) ลดบทบาทลงไป เพราะนักวิทยาศาสตร์ในยุคนั้นคิดว่าปัญหาโรคติดเชื้อแก้ได้ด้วยยาปฏิชีวนะ การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีริโอเฟจจึงเน้นไปทางด้านการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีริโอเฟจ และการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น เช่น การใช้แบคทีริโอเฟจเป็นเครื่องมือสำคัญในงานทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลในงานระบาดวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (phage typing) (Talbot and Parisi, 1976; Hagens and Loessner, 2007) และในงานตรวจวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรีย (diagnosis) (Mcnerney and et al., 2004) เป็นต้น ยกเว้นประเทศรัสเซียและบางประเทศในยุโรปที่ยังมีการศึกษา phage therapy กันอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาเกือบ 100 ปีที่มีการค้นพบแบคทีริโอเฟจ ความสนใจเกี่ยวกับ phage therapy เริ่มกลับมาอีกครั้งในปัจจุบัน เมื่อค้นพบว่าแบคทีเรียก่อโรคจำนวนมากเริ่มดื้อยา แบคทีเรียบางสายพันธุ์ดื้อยาได้หลากหลายชนิด (multi-drug resistant strain) อีกทั้งการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาก็ก่อขึ้นอย่างรวดเร็วจนสามารถพบได้เกือบทั่วโลก ดังนั้นนักวิจัยหลายท่านจึงเริ่มค้นหา และศึกษาเกี่ยวกับ lytic phage กันมากขึ้น เพื่อหวังว่าจะนำแบคทีริโอเฟจไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาและทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อลดการใช้ยาให้น้อยลง

จากวิธีการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจที่กล่าวมา lytic phage เป็นกลุ่มของแบคทีริโอเฟจที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในแง่การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้ เพราะสามารถทำให้เกิดการตายของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ ในขณะที่ lysogenic phage จะไม่สามารถทำเช่นนั้นได้ หลังจากที่มีการค้นพบแบคทีริโอเฟจ ได้มีการค้นพบและศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของ lytic phage รวมทั้งการทดลองนำ lytic phage มาใช้ในงาน phage therapy ทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในสัตว์ทดลอง และในคน ในที่นี้ขอยกตัวอย่างแบคทีริโอเฟจที่เคยมีรายงานว่าสามารถทำลายหรือฆ่าเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้แบคทีริโอเฟจบางชนิดยังสามารถทำลายแบคทีเรียดื้อยาได้ด้วย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างการใช้แบคทีริโอเฟจในการทำลายเชื้อก่อโรค

Bacteriophages	Bacterial hosts	References
SN-1	<i>Streptococcus. mutans</i> ATCC 13338	Winston and Thompson, 1979
BHR1	<i>Escherichia coli</i> AB1157 and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO303	Jensen and et al., 1998
P100	<i>Listeria monocytogenes</i>	Carlton, and et al., 2005
e11/2, e4/1c and pp01 (cocktail of phages)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	O'Flynn, and et al., 2004
CP34	<i>Campylobacter jejuni</i>	Carrillo and et al., 2005
Salmonella phage cocktail	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Wall and et al., 2010
CEV1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Raya and et al., 2006
KH1 and SH1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Sheng and et al., 2006
ESP 1-3	<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29544	Kim, Klumpp and Loessner, 2007
PA13076	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076	Bao, and et al., 2015
NCTC12684	<i>Campylobacter coli</i> NCTC 12668	Orquera and et al., 2012
CP81	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	Orquera and et al., 2012
PY100	<i>Yersinia enterocolitica</i> 83/88/2	Orquera and et al., 2012
M ^{Sa}	<i>Staphylococcus aureus</i> , Methicillin- resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Capparelli and et al., 2007
PA1φ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	Kim and et al., 2012
φAB2	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Multidrug- resistant strains)	Lin and et al., 2010
T1-like bacteriophage	<i>Escherichia coli</i> (Clinical isolates)	Sillankorva and et al., 2011
PHL4	<i>Salmonella enteritidis</i> phage type 13A	Higgins and et al., 2005
φNK5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hung and et al., 2011
HP1	<i>Helicobacter pylori</i>	Heintschel, Nalik and Schmid, 1993

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างการใช้แบคทีริโอเฟจในการทำลายเชื้อก่อโรค (ต่อ)

Bacteriophages	Bacterial hosts	References
Cp-1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Martin, Lopez and Garcia, 1998
5006M	<i>Proteus mirabilis</i>	Pretorius and Coetzee, 1979
φ34	<i>Proteus vulgaris</i>	Coetzee, 1963
PL25, PL26	<i>Providencia alkalifaciens</i>	Coetzee, Smit and Prozesky, 1966
UNL1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Schaffer and et al., 1999
B86	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kilbane, and Miller, 1988
SP24	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spanier, and Cleary, 1983
SFL	<i>Streptococcus faecalis</i>	Frazier and Zimmermann, 1980
KVP40 (Broad-host-range vibriophage)	<i>Vibrio cholera</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio natriegens</i> , and <i>Photobacterium leiognathi</i>	Miller and et al., 2003
KH1, KH4 and KH5	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Kudva and et al., 1999
JFK4	<i>Vibrio cholera</i>	Jensen and et al., 2006
JG004	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Garbe and et al., 2011
SPC35	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium and <i>Escherichia coli</i>	Kim and Ryu, 2011
PsPu-95	<i>Salmonella enterica</i> serovar Pullorum SPU-95	Bao, Zhang and Wang, 2011

การที่แบคทีริโอเฟจมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูงมาก ดังนั้นแบคทีริโอเฟจส่วนใหญ่จึงทำลายแบคทีเรียเป้าหมาย (target bacteria) เพียงชนิดเดียว โดยไม่ไปทำลาย หรือเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียอื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง หรือไม่ได้เป็นสาเหตุของโรค อย่างไรก็ตามแบคทีริโอเฟจบางชนิดก็สามารถทำลายแบคทีเรียในจีส และสปีชีส์เดียวกันได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ และบางชนิดสามารถทำลายแบคทีเรียต่างจีส หรือต่างสปีชีส์กันได้ด้วย แบคทีริโอเฟจที่มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้มากกว่าหนึ่งจีส/สปีชีส์/สายพันธุ์ เรียกว่า broad-host range bacteriophage (Miller and et al., 2003; Garbe and et al., 2014; Kim and Ryu, 2011)

รูปแบบของแบคทีริโอเฟจที่นำไปใช้ในการรักษาโรค อาจทำได้หลายรูปแบบ/วิธีการ ดังนี้ (1) ingestion หมายถึงการให้ผู้ป่วยกิน phage preparation ซึ่งวิธีนี้เริ่มใช้มาตั้งแต่มีการค้นพบ

แบคทีเรียโอฟาจ และสามารถรักษาโรคติดเชื้อ *Shigella dysenteriae* อย่างได้ผล ทั้งนี้การเตรียม phage preparation อาจทำให้แบคทีเรียโอฟาจอยู่ในรูปของเหลว หรือรูปผงโดยการเตรียมด้วยเครื่อง freeze-dryer หรืออัดเป็นยาเม็ด (pill) ในขนาด 10^5 - 10^{11} PFU/dose (Sulakvelidze and Morris, 2001) (2) injection หมายถึงการฉีดแบคทีเรียโอฟาจเข้าไปทางหลอดเลือดดำ (intravenous) หรือตรงตำแหน่งที่ติดเชื้อหรือใกล้ ๆ กับบริเวณที่อาจมีการติดเชื้อ วิธีนี้สามารถป้องกันการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ผิวหนังบริเวณรอบ ๆ แผลผ่าตัดได้ และไม่พบว่ามีผลข้างเคียงใด ๆ (Sulakvelidze and Morris, 2001) (3) aerosol หรือ intrapleural injection หมายถึงการพ่นเข้าทางจมูกหรือฉีดเข้าไปที่เยื่อหุ้มปอด (Abedon and et al., 2011) และ (4) external use หมายถึงการทาเฉพาะที่ เช่น ทาบนผิวหนัง หยอดตา หยอดหู หรือหยอดจมูก เป็นต้น (Sulakvelidze and Morris, 2001) ตัวอย่างโรคติดเชื้อในคนที่มีรายงานว่าเคยมีการทดลองรักษาโดยใช้ phage therapy แสดงไว้ใน (ตารางที่ 2.7)

แบคทีเรียโอฟาจมีคุณสมบัติคล้ายกับยาปฏิชีวนะ ในแง่ของความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย แต่ในทางทฤษฎีเชื่อว่าแบคทีเรียโอฟาจมีข้อดีที่เหนือกว่ายาปฏิชีวนะ อีกทั้งยังมีผลงานวิจัยที่สนับสนุนว่าแบคทีเรียโอฟาจมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในคน และในสัตว์ทดลองดีกว่ายาปฏิชีวนะ (Kochetkova and et al., 1989; Sulakvelidze and Morris, 2001; Inal, 2003) ข้อดีของแบคทีเรียโอฟาจในการรักษาโรคติดเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมีอยู่หลายประการ (ตารางที่ 2.8) (Sulakvelidze and Morris, 2001) ได้แก่ (1) แบคทีเรียโอฟาจมีความจำเพาะ (highly specific) ต่อโฮสต์ (2) แบคทีเรียโอฟาจเพิ่มจำนวนได้เองเมื่อได้เจอกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ (self replication in the bacterial host) ดังนั้นหากแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ยังไม่หมดไป แบคทีเรียโอฟาจก็จะเพิ่มจำนวนไปเรื่อย ๆ และทำลายโฮสต์ให้ลดจำนวนลงเรื่อย ๆ จนกว่าโฮสต์จะหมด หรือเหลือน้อยลงจนไม่เพียงพอที่จะก่อโรคได้ เปรียบเหมือนการให้ยาเพียงครั้งเดียว แต่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคให้หมดได้โดยไม่ต้องให้ซ้ำอีก (3) แบคทีเรียโอฟาจไม่มีผลข้างเคียง (no side effect) ในการใช้รักษาโรคในคนและสัตว์ (4) ไม่มีปัญหาเรื่องการดื้อต่อแบคทีเรียโอฟาจของแบคทีเรีย (phage-resistant bacteria) อีกทั้งยังพบว่า หากแบคทีเรียเกิดการเปลี่ยนแปลง receptor site สำหรับแบคทีเรียโอฟาจ ก็ยังสามารถหาแบคทีเรียโอฟาจตัวใหม่ที่มี attachment site ที่จับกับ receptor site ใหม่ได้นั้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหากแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลง receptor site สำหรับแบคทีเรียโอฟาจ มักมีผลทำให้ความสามารถในการก่อโรค (virulence) ของแบคทีเรียนั้นลดลงอีกด้วย (5) การค้นหา แบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ phage-resistant bacteria ทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่าการพัฒนา ยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิด antibiotics-resistant bacteria

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างโรคติดเชื้อและการรักษาด้วย phage therapy ในคน

Infections	Etiologic agents	References
Bacillary dysentery	<i>Shigella</i>	Babalova and et al., 1968
Infections of skin and nasal mucosa	<i>K. ozaene</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , and <i>K. pneumoniae</i>	Bogovazova, Voroshilova and Bondarenko, 1991
Lung and pleural infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Ioseliani and et al., 1980
Postoperative wound infections in cancer patients	<i>Staphylococcus</i> and <i>Pseudomonas</i>	Kochetkova and et al., 1989
Recurrent subphrenic abscess	<i>E. coli</i>	Kwarcinski and et al., 1994
Intestinal dysbacteriosis	<i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Litvinova, Chtetsova and Kavtreva, 1978
Bacillary dysentery and salmonellosis	<i>Shigella</i> and <i>Salmonella</i>	Miliutina and Vorotyntseva, 1993
Inflammatory urologic disease	<i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Perepanova and et al., 1995
Recurrent subphrenic abscess	<i>E. coli</i>	Kwarcinski and et al., 1994
Intestinal dysbacteriosis	<i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Litvinova, Chtetsova and Kavtreva, 1978
Bacillary dysentery and salmonellosis	<i>Shigella</i> and <i>Salmonella</i>	Miliutina and Vorotyntseva, 1993
Inflammatory urologic disease	<i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Perepanova and et al., 1995
Gastrointestinal tract, skin, head and neck infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> and <i>Salmonella</i>	Slopek and et al., 1983
Cerebrospinal meningitis	<i>K. pneumoniae</i>	Stroj. and et al., 1999
Suppurative infections	<i>Staphylococcus</i> and various gram-negative bacteria	Weber-Dabrowska, Dabrowski and Slopek, 1987

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างโรคติดเชื้อและการรักษาด้วย phage therapy ในคน (ต่อ)

Infections	Etiologic agents	References
Chronic otitis	antibiotic-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Wright and et al., 2009
Cancer patients with bacterial infections	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i>	Weber-Dabrowska, Mulczyk and Górski, 2001
MRSA infections	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)	Mann, 2008
Infections caused by antibiotic-resistant staphylococci	<i>Staphylococcus</i>	O'Flaherty and et al., 2005
Infections in burn wound patients	<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. aureus</i>	Merabishvili and et al., 2009
Burn wound infection and otitis externa	<i>P. aeruginosa</i>	Marza, and et al., 2006

ตารางที่ 2.8 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคทีริโอเฟจกับยาปฏิชีวนะ

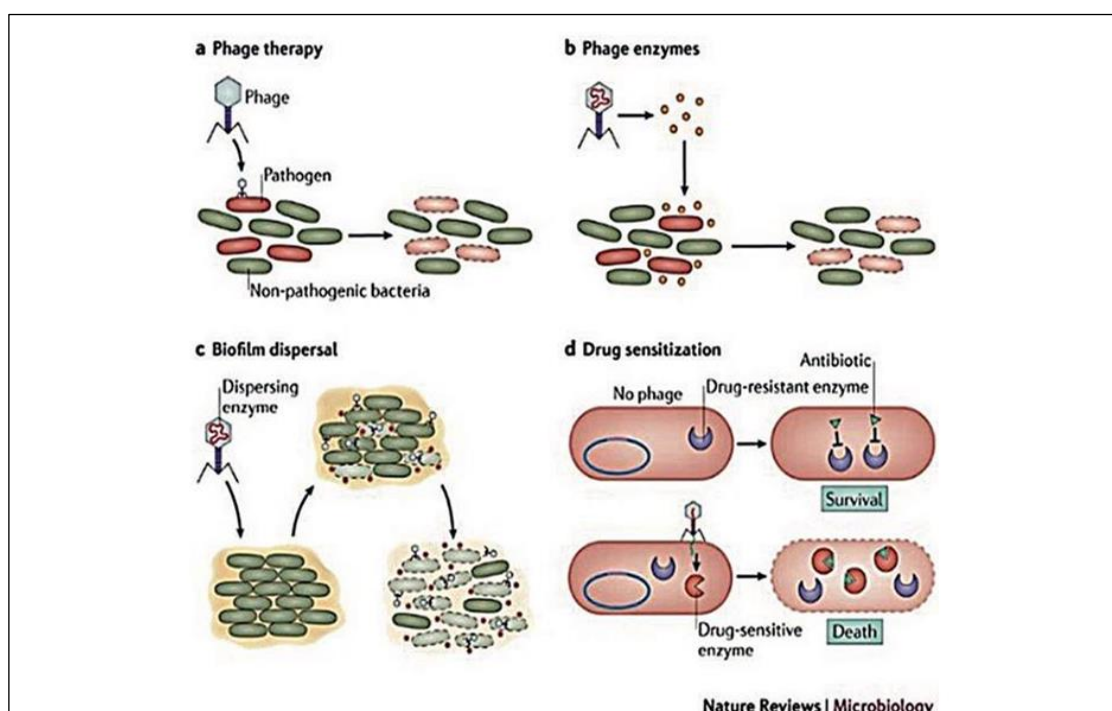
Bacteriophages	Antibiotics
1. มีความจำเพาะสูง (highly specific) ต่อแบคทีเรียเป้าหมาย (target bacteria)	1. มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแบบไม่จำเพาะ (non-specific) สามารถทำลายได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) และแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora)
2. สามารถเพิ่มจำนวนได้ตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ จึงทำให้ความเข้มข้นมากพอที่จะฆ่าเชื้อก่อโรคตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ	2. ถูกกำจัดโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย ทำให้ความเข้มข้นที่เหลืออยู่ในร่างกายไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อก่อโรคตรงตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ
3. ไม่มีผลข้างเคียง (non-side effect)	3. มีผลข้างเคียง (side effect) ที่รุนแรงหลายอย่างหรือบางครั้งทำให้เกิดการแพ้ (allergy)
4. การดื้อต่อแบคทีริโอเฟจของแบคทีเรียจะจำกัดอยู่แค่แบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น	4. การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไม่จำกัดอยู่แค่แบคทีเรียเป้าหมายเพราะฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเป็นแบบ broad-spectrum activity

ตารางที่ 2.8 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคทีริโอเฟจกับยาปฏิชีวนะ (ต่อ)

Bacteriophages	Antibiotics
5. การค้นหาแบคทีริโอเฟจชนิดใหม่ เพื่อใช้ทำลายแบคทีเรียที่ดื้อต่อแบคทีริโอเฟจ (phage-resistant bacteria) ใช้เวลาค่อนข้างน้อย อาจเพียงไม่กี่วันหรือไม่ก็สัปดาห์	5. การพัฒนาหรือคิดค้นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อใช้ทำลายแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic-resistant bacteria) ต้องใช้เวลานาน บางครั้งต้องใช้เวลหลายปี หรือกว่า 10 ปี

ที่มา: ปาริชาติ พุ่มขจร (2552)

การประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อประโยชน์ด้านการรักษามีหลายรูปแบบ เช่น (1) การใช้ lytic phage ในการทำลายแบคทีเรียโดยตรง (2) การใช้เอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีริโอเฟจ เช่น endolysin ในการทำลายแบคทีเรีย (3) การใช้แบคทีริโอเฟจยับยั้งการสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญต่อการก่อโรคของแบคทีเรีย และ (4) การใช้แบคทีริโอเฟจนำยีนที่ทำให้แบคทีเรียดื้อยากลายเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียที่เคยเพื่อทำให้แบคทีเรียดื้อยาถูกทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะ



ภาพที่ 2.21 รูปแบบต่าง ๆ ของการประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อประโยชน์ด้านการรักษา
ที่มา: อภิญา นามสาย (2560)

2.2.5 การใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การรักษาโรคด้วยแบคทีริโอเฟจ และการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การที่แบคทีริโอเฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเป้าหมายสูงทำให้การรักษาโรคด้วยแบคทีริโอเฟจมีทั้งข้อดี และข้อเสีย โดยข้อดีคือ มีผลข้างเคียงน้อย เนื่องจากแบคทีริโอเฟจจะทำลายเฉพาะแบคทีเรียเป้าหมาย โดยไม่มีผลต่อแบคทีเรียอื่น แต่ก็มีข้อเสียคือมีข้อจำกัดในการใช้มาก เนื่องจากแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่ง ๆ อาจมีหลายสายพันธุ์ บางครั้งการใช้แบคทีริโอเฟจเพียงชนิดเดียวก็ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ ส่วนข้อดีของการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค คือ สามารถทำลายแบคทีเรียได้หลายชนิด และหลายสายพันธุ์ ซึ่งข้อดีดังกล่าวบางครั้งถ้าใช้ไม่ถูกต้อง เช่น ใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้เป็นเวลานานเกินไปก็จะทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการที่ยาปฏิชีวนะไปทำลายแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในร่างกาย นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะยังก่อให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียได้ ซึ่งจากข้อดีและข้อเสียของการรักษาโรคด้วยแบคทีริโอเฟจและยาปฏิชีวนะทำให้มีแนวคิดในการนำแบคทีริโอเฟจและยาปฏิชีวนะมาใช้ร่วมกันในการรักษาโรคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรค เนื่องจากโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถดื้อได้ทั้งแบคทีริโอเฟจและยาปฏิชีวนะมีน้อย และอีกทั้งวิธีดังกล่าวยังสามารถช่วยลดปริมาณของแบคทีริโอเฟจและยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีริโอเฟจหรือยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการนำแบคทีริโอเฟจ และยาปฏิชีวนะมาใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค หรือที่เรียกว่า phage-antibiotic synergy เริ่มมีขึ้นหลัง ค.ศ. 2000 โดยนักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่มักใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลากหลายชนิด โดยการสังเกตจากประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรีย หรือประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียในไบโอฟิล์ม เมื่อเทียบกับการใช้แบคทีริโอเฟจหรือยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างงานวิจัยที่น่าสนใจที่เกี่ยวข้อกับการนำแบคทีริโอเฟจและยาปฏิชีวนะมาใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น

งานวิจัยของ Hagens and et al. (2006) ซึ่งทำการทดลองโดยใช้ gentamicin ร่วมกับ bacteriophage ในการทำลาย *Pseudomonas aeruginosa* จากการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) พบว่า *P. aeruginosa* strain O1 และ K มีความไวต่อ gentamicin มากขึ้น หากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวถูกบุกรุกด้วย bacteriophage Pf3 และ Pf1 ก่อน นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาในหนู (in vivo) พบว่า หนูทดลองที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* strain K ในระดับที่ไม่สามารถรักษาได้ด้วย bacteriophage strain K หรือ gentamicin เพียงอย่างเดียว สามารถรักษาได้โดยใช้ bacteriophage Pf1 และ gentamicin ร่วมกัน

งานวิจัยของ Bedi and et al. (2009) ซึ่งทำการทดลองโดยใช้ amoxicillin ร่วมกับ bacteriophage ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *Klebsiella pneumoniae* B5055 จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimal inhibitory concentration: MIC) ของ amoxicillin ที่สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *K. pneumoniae* B5055 คือ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ amoxicillin เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ amoxicillin ร่วมกับ bacteriophage พบว่าความเข้มข้นของ amoxicillin ที่ต้องใช้ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *K. pneumoniae* B5055 มีค่าน้อยกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยของ Nouraldin and et al. (2016) ซึ่งทำการทดลองโดยใช้ amikacin ร่วมกับ bacteriophage ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *Pseudomonas aeruginosa* จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimal inhibitory concentration: MIC) ของ amikacin ที่สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *P. aeruginosa* คือ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ amikacin เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ amikacin ร่วมกับ bacteriophage พบว่าความเข้มข้นของ amikacin ที่ต้องใช้ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ของ *P. aeruginosa* คือ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

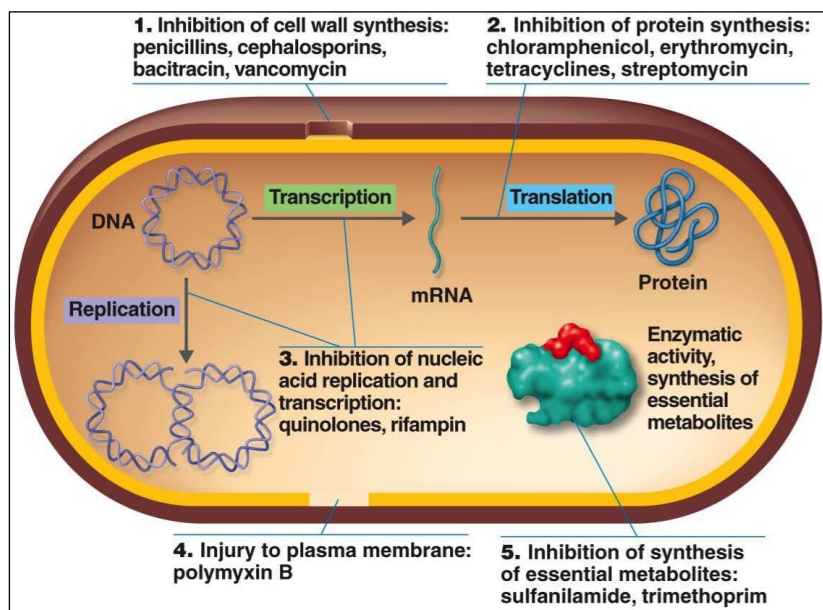
2.3 ยาปฏิชีวนะ

ยาด้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีกลไกออกฤทธิ์ (mechanism of action) ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน แบ่งเป็น 5 กลไก ดังนี้ (ภาพที่ 2.22)

2.3.1 กลไกการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (inhibition of cell wall synthesis)

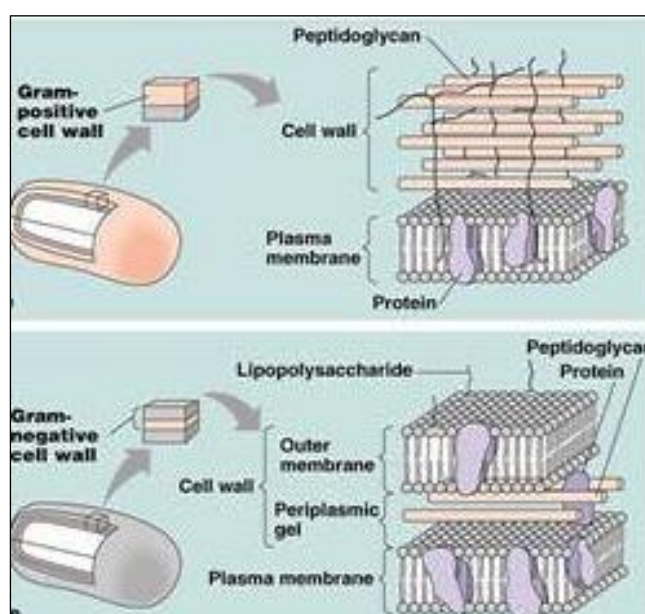
ยาด้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถสร้าง peptidoglycan ได้จะส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียอ่อนแอและทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลายไปในที่สุด ตัวอย่างยาด้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น bacitracin vancomycin ampicillin และ cephalosporins

ยาด้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มักจะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นของ lipopolysaccharide ล้อมรอบ peptidoglycan (ภาพที่ 2.23) จึงทำให้ยาด้านจุลินทรีย์ไม่สามารถผ่านเข้าสู่บริเวณที่มีการสร้าง peptidoglycan ได้ อย่างไรก็ตามยาด้านจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ เช่น bacitracin ไม่สามารถยับยั้ง *Neisseria* spp.



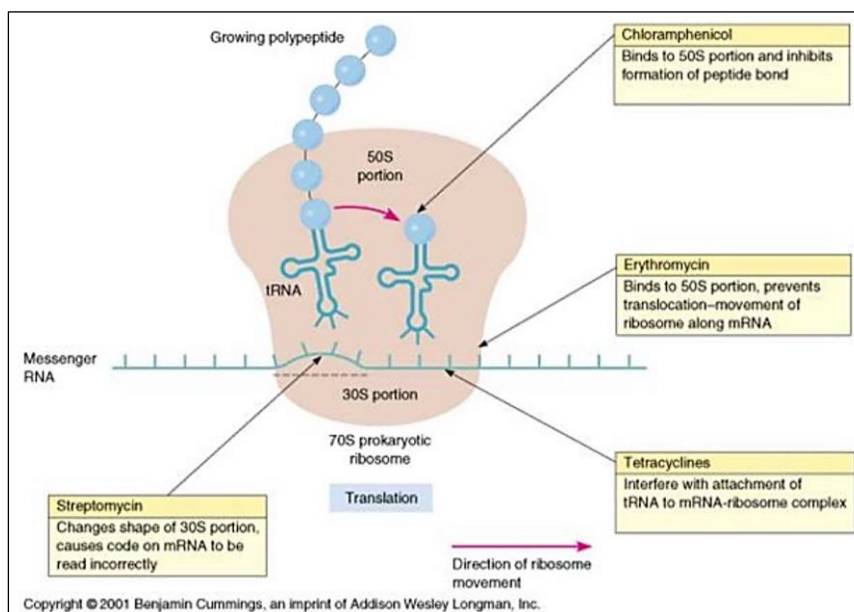
ภาพที่ 2.22 กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลินทรีย์

ที่มา: Study Blue (2019: Web-Site)



ภาพที่ 2.23 ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

ที่มา: The Study Hub (2019: Web-Site)



ภาพที่ 2.24 การยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยยาต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ
ที่มา: Antibiotics LVSM (2019: Web-Site)

2.3.2 กลไกการยับยั้งการสร้างโปรตีน (inhibition of protein synthesis)

ยาต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มักไปมีผลทำให้กระบวนการสร้างโปรตีน (translation) ของแบคทีเรียผิดปกติไป จนทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ ซึ่งส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถดำรงชีวิตได้ ตัวอย่างของยาต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น chloramphenicol, erythromycin, tetracycline และ streptomycin (ภาพที่ 2.24) ยาต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นยาต้านจุลินทรีย์ที่มี broad spectrum of antimicrobial activity ยกเว้น erythromycin ทั้งนี้เนื่องจาก erythromycin ไม่สามารถผ่านผนังแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ ดังนั้นยาชนิดนี้จึงยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Broadetella pertussis*, *Campylobacter* spp., *Chlamydia* spp., *Helicobacter* spp. และ *Legionella* spp. ยาต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดในกลุ่มนี้มีวิธีการยับยั้งการสร้างโปรตีนที่แตกต่างกันดังนี้

chloramphenicol สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนได้โดยไปจับกับ 50S subunit (large subunit) ของ prokaryotic ribosome (70S ribosome) แล้วทำให้ไม่มีการสร้างพันธะ peptide

erythromycin สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนได้โดยการจับกับ 50S subunit (large subunit) ของ prokaryotic ribosome แล้วทำให้ ribosome ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปบน mRNA

tetracycline สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนได้โดยไปรบกวนการจับกันระหว่าง codon ที่อยู่บน mRNA กับ anticodon ที่อยู่บน tRNA

streptomycin สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนได้โดยไปเปลี่ยนรูปร่าง 30S subunit (small subunit) ของ prokaryotic ribosome ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดความผิดพลาดในการถอดรหัสพันธุกรรม (genetic code) เช่น ถอดรหัส codon สำหรับกรดอะมิโนเป็น stop codon ซึ่งส่งผลให้กระบวนการโปรตีนหยุดลง

2.3.3 กลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (injury to the plasma membrane)

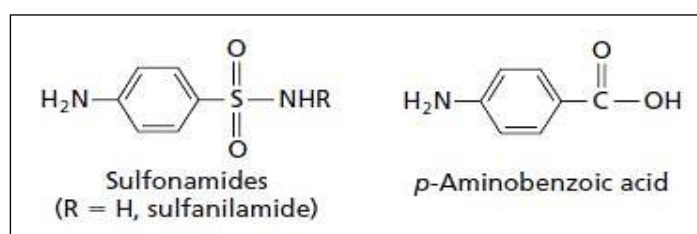
ยาต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ทำให้ความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ในการยอมให้สารผ่านเข้าออกจากเซลล์แบบที่เรีย (membrane permeability) ผิดปกติไป ซึ่งจะส่งผลให้แบคทีเรียสูญเสียสารต่าง ๆ ที่สำคัญออกจากเซลล์ และเซลล์ตายในที่สุด

2.3.4 กลไกการยับยั้งการสร้าง nucleic acid และกระบวนการ transcription (inhibition of nucleic acid replication and transcription)

ยาต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการสร้าง DNA และ RNA ของจุลินทรีย์ ยาต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ DNA gyrase และ rifampin ซึ่งจะไปยับยั้งการสร้าง RNA โดยการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase เป็นต้น

2.3.5 กลไกการยับยั้งการสร้าง metabolite ที่จำเป็น (inhibition of synthesis of essential metabolite)

โดยปกติปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์จะสามารถถูกยับยั้งได้โดยสารที่ โครงสร้างคล้ายกับ substrate ของเอนไซม์ ซึ่งสารดังกล่าวเรียกว่า antimetabolite หรือ competitive inhibitor ยาต้านจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น competitive inhibitor ได้แก่ sulfanilamide (ยาชนิดหนึ่งในกลุ่ม sulfanilamides) ยาต้านจุลินทรีย์ชนิดนี้มีโครงสร้างคล้ายกับ para-aminobenzoic acid: PABA (ภาพที่ 2.25) ซึ่งเป็น substrate ของปฏิกิริยาการสร้าง folic acid จะไปทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide แทนการทำปฏิกิริยากับ PABA จุลินทรีย์จึงไม่สามารถสร้าง folic acid และส่งผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสร้าง purines pyrimidines และกรดอะมิโนหลายชนิด



ภาพที่ 2.25 โครงสร้างของ sulfanilamide และ para-aminobenzoic acid: PABA

ที่มา: The Study Hub (2019: Web-Site)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษานี้ใช้ *Shigella dysenteriae* DMST15111 เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะ การเพาะเลี้ยง *S. dysenteriae* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth หรือ BHI agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การเก็บรักษาแบคทีเรียเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ซึ่งมี glycerol เป็นส่วนประกอบอยู่ 15% (v/v)

3.2 ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ampicillin การเตรียม stock solution ของ ampicillin ทำโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวทำละลาย โดยให้ความเข้มข้นของ stock solution เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บ stock solution ของ ampicillin ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 การแยกแบคทีเรียโอฟาจที่มีความสามารถในการทำลาย *S. dysenteriae* จากน้ำเสีย

นำน้ำตัวอย่างที่ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียโอฟาจซึ่งเป็นน้ำที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียขอโรงพยาบาลประชากรเวชการ จังหวัดศรีสะเกษ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) มากรองด้วย filter membrane ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนที่ได้จากการกรอง (filtrate 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน double strength BHI ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร พร้อมกับเติม *S. dysenteriae* (host cell) อายุ 18-24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใส (supernatant) มากรองด้วย filter membrane ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเก็บของเหลวที่ผ่านการกรอง (phage filtrate 2) ไปใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* โดยวิธี spot test ต่อไป

3.4 การตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* โดยวิธี spot test

นำ *S. dysenteriae* อายุ 18-24 ชั่วโมง ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar โดยใช้ไม้พันสำลี (swab) จากนั้นนำ phage filtrate 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI

agar ที่มีการป้ายเชื้อ *S. dysenteriae* ไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากมีแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จะปรากฏโซนใส (inhibition zone) ตรงบริเวณที่หยด filtrate 2

3.5 การแยกแบคทีเรียโอเฟจ และการเตรียม bacteriophage suspension

นำ filtrate 2 มาทำการเจือจางทีละ 10 เท่า (ten fold dilution) จากนั้นนำ filtrate 2 แต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI soft agar (0.4% agar) ปริมาตร 4 มิลลิตร (ที่ผ่านการหลอม แล้วทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) พร้อมกับเติมแบคทีเรีย *S. dysenteriae* อายุ 18-24 ชั่วโมง ลงไป 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเททับบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ทิ้งไว้ให้ soft agar แข็งตัว แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จะปรากฏ plaque ให้เห็นบนจานเพาะเลี้ยง เลือก plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ (single plaque) มา 1 plaque โดยใช้ปลาย pipette tip เขี่ย plaque ดังกล่าวมาจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม *S. dysenteriae* อายุ 18-24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI soft agar ปริมาตร 4 มิลลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเททับบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ทิ้งไว้ให้ soft agar แข็งตัว แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือก plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ มา 1 plaque ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิตร ซึ่งมี *S. dysenteriae* เจริญอยู่และมีความขุ่น (OD ที่ 600 นาโนเมตร) เท่ากับ 0.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่า bacteriophage suspension การเก็บรักษา bacteriophage suspension ทำได้โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ

การหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ ซึ่งรายงานเป็นค่า plaque-forming unit/ml (PFU/ml) โดยวิธี plaque assay มีวิธีการดังนี้ นำ bacteriophage suspension ที่ต้องการหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจมาทำการเจือจางทีละ 10 เท่า (ten fold dilution) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI soft agar ปริมาตร 4 มิลลิตร เติม *S. dysenteriae* อายุ 18-24 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันแล้วเททับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับ

จากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 30-300 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (PFU/ml) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (PFU/ml) = จำนวน plaque $\times 10 \times$ ระดับความเจือจาง

ตัวอย่างการคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจในหน่วย PFU/ml เช่น ถ้าในการทดลองหาค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ นับจำนวน plaque ได้ 150 อัน ที่ระดับความเจือจาง $1:10^4$ แสดงว่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจมีค่าเท่ากับ $150 \times 10 \times 10^4 = 1.5 \times 10^7$ PFU/ml

3.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC11778 *Escherichia coli* ATCC25922 *Klebsiella pneumoniae* ATCC27736 *Proteus mirabilis* ATCC12453 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 *Salmonella typhi* ATCC19430 *Shigella boydii* DMST28180 *Shigella dysenteriae* DMST15111 *Shigella flexneri* DMST4423 *Shigella sonnei* DMST561 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำมาทำการทดสอบความจำเพาะระหว่างแบคทีเรียกับแบคทีริโอเฟจโดยวิธี spot test โดยการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ อายุ 18-24 ชั่วโมง มาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar จากนั้นหยด bacteriophage suspension ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากแบคทีริโอเฟจสามารถยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นได้ จะเกิดโซนใส (inhibition zone) ตรงบริเวณที่หยด bacteriophage suspension

3.8 การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ

นำ bacteriophage suspension มาสกัดเอาสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด GF-1 viral nucleic acid extraction kit (GF-1 viral nucleic acid extraction kit) ตามวิธีการที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วย *Pst*I แล้วไปนำไปตรวจสอบผลการตัดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel และใช้ VC-lambda/HindIII marker (GF-1 viral nucleic acid extraction kit) เป็น DNA marker

3.9 การศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วย transmission electron microscope

การศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วย transmission electron microscope ทำโดยนำ bacteriophage suspension 1 หยด (ประมาณ 10 ไมโครลิตร) หยดลงบน grid ที่ฉาบด้วยคาร์บอน

(carbon-coated grid) ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมด้วย 1% (w/v) uranyl acetate (pH 4.0) ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วย transmission electron microscope ขนาดของแบคทีเรียโอเฟจเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดขนาดของแบคทีเรียโอเฟจ 5 ตัว

ข้อมูลเกี่ยวกับรูปร่างและสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการทดลองนี้จะถูกนำไปใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียโอเฟจโดยอาศัยเกณฑ์ (criteria) ที่กำหนดโดย International Committee of Taxonomy of Viruses: ICTV

3.10 การหาค่า minimal inhibitory concentration: MIC ของแบคทีเรียโอเฟจในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

การหาค่า minimal inhibitory concentration: MIC ของแบคทีเรียโอเฟจในการยับยั้ง *S. dysenteriae* ทำโดยนำ bacteriophage suspension ที่มีความเข้มข้น 10^8 PFU/ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อให้มีความเจือจางลดลงทีละ 10 เท่า (tenfold dilution) โดยแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จะมีความเข้มข้นดังนี้ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 1 PFU/ml จากนั้นนำแบคทีเรียโอเฟจแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มีการป้าย (swab) culture ของ *S. dysenteriae* ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมงจนทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตโซนใส (inhibition zone) ตรงบริเวณที่หยุดแบคทีเรียโอเฟจ แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า MIC ของแบคทีเรียโอเฟจในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

3.11 การหาค่า minimal inhibitory concentration ของ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

การหาค่า minimal inhibitory concentration: MIC ของ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* ทำโดยนำ ampicillin ที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อให้มีความเจือจางลดลงทีละ 2 เท่า (two fold dilution) โดย ampicillin ที่ได้จะมีความเข้มข้นดังนี้ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 และ 7.815 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำ ampicillin แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มีการป้าย (swab) culture ของ *S. dysenteriae* ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมงจนทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตโซนใส (inhibition zone) ตรงบริเวณที่หยุด ampicillin แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า MIC ของ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

3.12 การหาค่า minimal inhibitory concentration ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

เมื่อใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับ ampicillin

การหาค่า MIC ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* เมื่อใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับ ampicillin ทำโดยนำ bacteriophage suspension มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า คือ MIC, MIC/10, MIC/100 และนำ ampicillin มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่า คือ MIC, MIC/2, MIC/4 จากนั้นนำแบคทีริโอเฟจ และ ampicillin มาผสมกันให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังแสดงในตารางที่ 3.1 นำส่วนผสมแต่ละอันไปหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มีการป้าย (swab) culture ของ *S. dysenteriae* ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง จนทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตโซนใส (inhibition zone) ตรงบริเวณที่หยดส่วนผสมของแบคทีริโอเฟจ และ ampicillin แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า MIC ของแบคทีริโอเฟจ และ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรของแบคทีริโอเฟจ และ ampicillin (ในหน่วยไมโครลิตร) ที่ใช้ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

ปริมาตรของ ampicillin	ปริมาตรของแบคทีริโอเฟจ			
	No phage	MIC/100	MIC/10	MIC
No ampicillin	10/10	10/10	10/10	10/10
MIC/4	10/10	10/10	10/10	10/10
MIC/2	10/10	10/10	10/10	10/10
MIC	10/10	10/10	10/10	10/10

หมายเหตุ: ตัวเลขหน้าเครื่องหมาย / เป็นปริมาตรของ ampicillin (ไมโครลิตร) ส่วนตัวเลขหลังเครื่องหมาย / เป็นปริมาตรของแบคทีริโอเฟจ (ไมโครลิตร) ในกรณีของ no phage และ no ampicillin ให้ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนแบคทีริโอเฟจ และ ampicillin แทนตามลำดับ

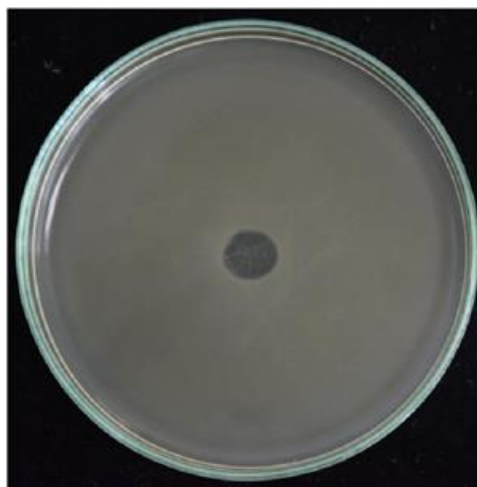
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การตรวจหาและแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความสามารถในการทำลาย *S. dysenteriae* จากน้ำเสีย

จากการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่มีความสามารถในการทำลาย *S. dysenteriae* จากตัวอย่างน้ำ การทดลองนี้ได้ใช้น้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลประชารักษ์เวชการ จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 1 ตัวอย่าง มาใช้เป็นน้ำตัวอย่างสำหรับการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* โดยเมื่อนำ filtrate 2 ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae* โดยวิธี spot test พบว่า filtrate 2 สามารถยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยสังเกตได้จากมี inhibition zone เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด filtrate 2 ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการป้ายเชื้อ *S. dysenteriae* ไว้ทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.1)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าใน filtrate 2 ที่เตรียมได้จากน้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาลประชารักษ์เวชการ จังหวัดศรีสะเกษ น่าจะมีแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* และเมื่อนำ filtrate 2 มาทำ plaque assay ก็พบว่าสามารถทำให้เกิด plaque ขึ้นบนอาหารที่มี *S. dysenteriae* เจริญอยู่ (ภาพที่ 4.2) ผลการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันว่าใน filtrate 2 มีแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* และได้ให้ชื่อแบคทีเรียโอเฟจนี้ว่า bacteriophage SD1



ภาพที่ 4.1 inhibition zone ที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด filtrate 2 ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการป้ายเชื้อ *S. dysenteriae* ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 4.2 ลักษณะ plaque ของ bacteriophage SD1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *S. dysenteriae* เจริญอยู่

4.2 การหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ

จากการหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ ซึ่งรายงานเป็นค่า plaque-forming unit/ml (PFU/ml) โดยวิธี plaque assay โดยนำตัวอย่างแบคทีริโอเฟจมาทำการเจือจางที่ละ 10 เท่า (ten fold dilution) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) พบว่า สามารถนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 80 plaque ที่การเจือจาง 10^6 (เลือกนับจากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 30-300 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้คำนวณค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (PFU/ml) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned}\text{ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (PFU/ml)} &= \text{จำนวน plaque} \times 10 \times \text{ระดับความเจือจาง} \\ &= 80 \times 10 \times 10^6 \\ &= 8 \times 10^8 \text{ PFU/ml}\end{aligned}$$

ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีริโอเฟจมีความเข้มข้นเท่ากับ 8×10^8 PFU/ml

4.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น ๆ

จากการทดสอบความสามารถของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ โดยวิธี spot test พบว่า bacteriophage SD1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shigella* ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งได้แก่ *S. boydii* DMST28180 *S. dysenteriae* DMST15111 *S. flexneri* DMST4423 และ *S. sonnei* DMST561 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองนี้ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ความสามารถของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ

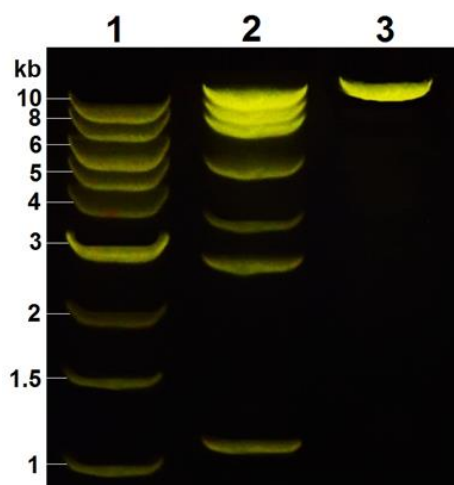
Bacteria	Inhibitory ability
Bacillus cereus ATCC11778	-
Escherichia coli ATCC25922	-
Klebsiella pneumoniae ATCC27736	-
Proteus mirabilis ATCC12453	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	-
Salmonella typhi ATCC19430	-
Shigella boydii DMST28180	+
Shigella dysenteriae DMST15111	+
Shigella flexneri DMST4423	+
Shigella sonnei DMST561	+
Staphylococcus aureus ATCC25923	-

หมายเหตุ: - = ไม่เกิด inhibitory ability

+ = เกิด inhibitory ability

4.4 การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจ

จากการศึกษาสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 โดยการใช้ชุดทดสอบ GF-1 viral nucleic acid extraction kit สกัดเอาสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ออกมา แล้วนำไปตัดด้วย *Pst*I ซึ่งเป็น restriction enzyme ชนิดหนึ่ง เมื่อนำสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ที่ตัด และไม่ได้ตัดด้วย *Pst*I ไปวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ดังกล่าว (ภาพที่ 4.3)

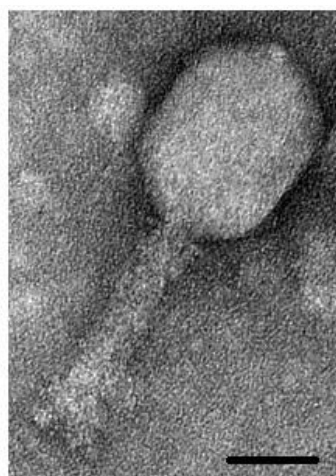


ภาพที่ 4.3 agarose gel แสดงผลของการตัด phage DNA ด้วย restriction enzyme:

1 = 1 kb DNA ladder (VC-lambda/HindIII), 2 = phage DNA cut with *Pst*I, 3 = uncut phage DNA

4.5 การศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วย transmission electron microscope (TEM)

จากการศึกษารูปร่างของ bacteriophage SD1 ด้วย transmission electron microscope : TEM พบว่า bacteriophage SD1 เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหาง หรือ tailed bacteriophage โดยส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม (polyhedral) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 81.23 ± 6.41 และส่วนหางมีลักษณะยาว ยึดหดได้ มีขนาดความกว้างประมาณ 26.01 ± 2.73 และความยาวประมาณ 157.18 ± 14.24 (ภาพที่ 4.4)

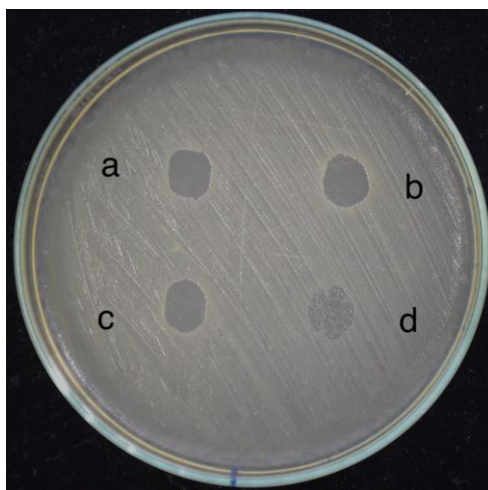


ภาพที่ 4.4 รูปร่างของ bacteriophage SD1 ภายใต้กล้อง transmission electron microscope (Bar = 50 nm)

4.6 การหาค่า minimal inhibitory concentration ของแบคทีริโอเฟจในการยับยั้ง

S. dysenteriae

จากทดลองการหาค่า minimal inhibitory concentration: MIC ของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* โดยนำ bacteriophage SD1 ที่มีความเข้มข้น 10^8 PFU/ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเจือจางลดลงทีละ 10 เท่า (tenfold dilution) และทำ spot test โดยนำแต่ละความเข้มข้นหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการป้ายเชื้อ *S. dysenteriae* สังเกตบริเวณ inhibition zone (ภาพที่ 4.5) ตรงบริเวณที่หยุด bacteriophage SD1 แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า MIC ของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* พบว่า bacteriophage SD1 สามารถยับยั้ง *S. dysenteriae* ได้ที่ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 PFU/ml (ตารางที่ 4.2) จากผลการทดลองนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ค่า MIC ของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* มีค่าเท่ากับ 10^4 PFU/ml



ภาพที่ 4.5 inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae*

โดย bacteriophage SD1 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

(a = 10^8 , b = 10^7 , c = 10^6 , d = 10^5 PFU/ml)

ตารางที่ 4.2 ความสามารถของ bacteriophage SD1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae*

ความเข้มข้นของ bacteriophage SD1 (PFU/ml)	ความสามารถในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>
10^8	+
10^7	+
10^6	+
10^5	+
10^4	+
10^3	-
10^2	-
10	-
1	-

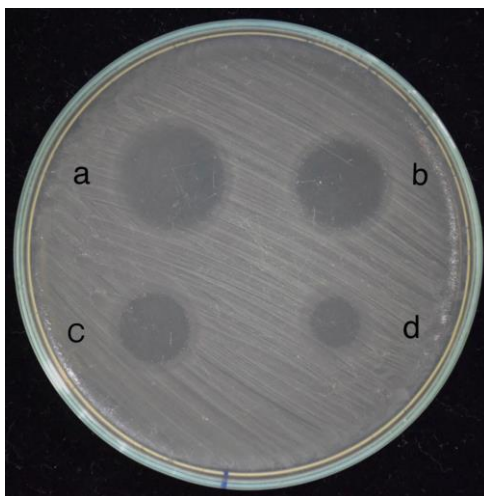
หมายเหตุ: + = มีความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae*;

- = ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

4.7 การหาค่า minimal inhibitory concentration ของ ampicillin ในการยับยั้ง

S. dysenteriae

จากการทดลองหาค่า minimal inhibitory concentration: MIC ของ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* โดยนำ ampicillin ที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two fold dilution) คือมีความเข้มข้นเท่ากับ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 และ 7.815 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำ ampicillin แต่ละความเข้มข้นหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงที่มีการป้าย *S. dysenteriae* สังเกตบริเวณ inhibition zone (ภาพที่ 4.6) ตรงบริเวณที่หยุด ampicillin แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า MIC ของ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* พบว่า ampicillin สามารถยับยั้ง *S. dysenteriae* ได้ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ค่า MIC ของ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* มีค่าเท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 4.6 inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae*
โดย ampicillin ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ
(a = 1000, b = 500, c = 250, d = 125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

ตารางที่ 4.3 ความสามารถของ ampicillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ
S. dysenteriae

ความเข้มข้นของ ampicillin (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	ความสามารถในการยับยั้ง <i>S. dysenteriae</i>
1000	+
500	+
250	+
125	+
62.5	+
31.25	+
15.625	-
7.8125	-
3.90625	-

หมายเหตุ: + = มีความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae*
- = ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

4.8 การหาค่า minimal inhibitory concentration ในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

เมื่อใช้แบคทีริโอเฟจร่วมกับ ampicillin

จากการนำ bacteriophage SD1 และ ampicillin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. dysenteriae* โดยวิธี spot test พบว่าเมื่อใช้ bacteriophage SD1 หรือ ampicillin เพียงอย่างเดียวต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ MIC จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. dysenteriae* ได้ แต่เมื่อนำ bacteriophage SD1 มาใช้ร่วมกับ ampicillin พบว่าสามารถใช้ความเข้มข้นของ bacteriophage SD1 และ ampicillin ที่น้อยกว่าค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. dysenteriae* (ตารางที่ 4.4) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า bacteriophage SD1 และ ampicillin สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae* อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การใช้ bacteriophage SD1 ร่วมกับ ampicillin ในการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae* จะช่วยทำให้อัตราการดื้อยาปฏิชีวนะและอัตราการดื้อ bacteriophage ลดลง

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae* เมื่อใช้ bacteriophage SD1 ร่วมกับ ampicillin

ความเข้มข้นของ ampicillin	ความเข้มข้นของ bacteriophage SD1			
	No phage	MIC/100	MIC/10	MIC
No ampicillin	-	-	-	+
MIC/4	-	-	+	+
MIC/2	-	-	+	+
MIC	+	+	+	+

หมายเหตุ: += มีความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

- = ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

5.1 สรุปและอภิปรายผล

การศึกษานี้แยกไลติกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* ได้ 1 ชนิดจากน้ำเสียที่เก็บจากโรงพยาบาล โดยให้ชื่อว่า bacteriophage SD1 แบคทีเรียโอเฟจดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดในสกุล *Shigella* จากการศึกษาสารพันธุกรรม และรูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจ ทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage SD1 ไว้ใน family Myoviridae การศึกษาความสามารถของ bacteriophage SD1 และ ampicillin ในการยับยั้ง *S. dysenteriae* เมื่อใช้อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว และเมื่อใช้ร่วมกันทำให้สามารถสรุปได้ว่า bacteriophage SD1 และ ampicillin สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้ง *S. dysenteriae*

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีทางเลือกในการยับยั้งการเจริญของ *Shigella dysenteriae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค shigellosis เพื่อทดแทน หรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะมักก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ในปัจจุบันงานวิจัยที่ได้รับความสนใจ และมีการดำเนินการอย่างแพร่หลายมักเกี่ยวข้องกับการค้นหาสิ่งมีชีวิตหรือสารที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตมาใช้แทน หรือร่วมกับยาปฏิชีวนะ เนื่องจากเป็นสิ่งที่มาจากธรรมชาติ และมีความปลอดภัย ตัวอย่างเช่น การใช้สมุนไพร หรือสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Bassole and Juliani 2012) การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก (probiotic bacteria) หรือสารที่สร้างจากแบคทีเรียดังกล่าว เช่น แบคทีเรียโอซิน (bactreiocin) ในการยับยั้งแบคทีเรียปฏิปักษ์ และการใช้แบคทีเรียโอเฟจ ซึ่งเป็นไวรัสของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่จำเพาะ (Lin and et al., 2010) ในบรรดาตัวอย่างของวิธีการทางเลือกที่กล่าวมา การใช้แบคทีเรียโอเฟจในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นวิธีที่ถือว่ามีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยที่สุด ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้

แบคทีเรียโอเฟจจะยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียที่จำเพาะเท่านั้น โดยแบคทีเรียที่จะถูกทำลายโดยแบคทีเรียโอเฟจจะต้องมี receptor ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโอเฟจ ดังนั้นหากนำแบคทีเรียโอเฟจไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของคน หรือสัตว์ แบคทีเรียโอเฟจก็จะทำลายแต่เฉพาะแบคทีเรียก่อโรค โดยไม่ไปมีผลต่อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ทางเดินอาหาร ด้วยเหตุนี้การใช้แบคทีเรียโอเฟจในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจึงสามารถช่วยลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ (Lin and et al., 2010; Sulakvelidze and et al., 2001)

ปริมาณแบคทีริโอเฟจที่ต้องใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายไม่จำเป็นต้องมาก ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแบคทีริโอเฟจพบกับแบคทีเรียเป้าหมาย แบคทีริโอเฟจจะบุกรุกเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย และเพิ่มจำนวนขึ้น ดังนั้นหากมีการติดเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายมาก แบคทีริโอเฟจก็จะเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นตามจำนวนของแบคทีเรียเป้าหมายเอง การใช้ปริมาณแบคทีริโอเฟจที่น้อยในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย นอกจากจะช่วยลดต้นทุนการรักษาโรคแล้ว ยังช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการใช้สารยับยั้งแบคทีเรียในปริมาณมาก (Lin and et al., 2010; Sulakvelidze and et al., 2001)

การใช้แบคทีริโอเฟจในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายจะช่วยลดการตกค้างของแบคทีเรียภายในร่างกายของคน หรือสัตว์ที่ใช้ ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีริโอเฟจต้องอาศัยแบคทีเรียที่จำเพาะ ดังนั้นหากแบคทีริโอเฟจกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายหมดแล้ว แบคทีริโอเฟจก็จะมีแบคทีเรียที่จำเพาะให้เพิ่มจำนวน แบคทีริโอเฟจก็จะลดจำนวนลงเอง ซึ่งต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่เมื่อกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายแล้วจะไม่สามารถลดจำนวนลงได้ และยังคงค้างอยู่ในร่างกายระยะหนึ่งก่อนที่จะถูกกำจัดออกจากร่างกาย (Lin and et al. 2010; Sulakvelidze and et al., 2001)

การใช้แบคทีริโอเฟจในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายมักไม่ทำให้เกิดแบคทีเรียที่ดื้อต่อแบคทีริโอเฟจ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียดื้อต่อแบคทีริโอเฟจน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าแบคทีริโอเฟจเป็นไวรัสที่มีความสามารถในการปรับตัว และการกลายพันธุ์ที่สูงมาก ดังนั้นเมื่อนำแบคทีริโอเฟจไปใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย หากแบคทีเรียเป้าหมายมีการปรับตัวให้ดื้อต่อแบคทีริโอเฟจ แบคทีริโอเฟจก็ต้องปรับตัวเองตามเพื่อให้ยังคงสามารถใช้แบคทีเรียดังกล่าวในการดำรงชีวิต ซึ่งเหตุการณ์เช่นนี้จะไม่พบในกรณีการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย เนื่องจากสารเหล่านั้นเป็นสิ่งที่ไม่มีชีวิต และไม่สามารถปรับตัวตามแบคทีเรียที่มีการปรับตัวเพื่อให้ดื้อยาได้ (Lin and et al., 2010; Sulakvelidze and et al., 2001)

แบคทีริโอเฟจที่พบทั่วไปมี 2 ประเภท คือ lytic bacteriophage และ lysogenic bacteriophage แบคทีริโอเฟจทั้งสองประเภทนี้มีรูปแบบการดำรงชีวิต และผลต่อแบคทีเรียเป้าหมายที่แตกต่างกัน (Sabouri and Mohammad. 2012) lytic bacteriophage เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีการดำรงชีวิตโดยการบุกรุกเข้าไปเพื่อเพิ่มจำนวนตัวเองภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย จากนั้นจะทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายให้แตกเพื่อให้แบคทีริโอเฟจจำนวนมากหลุดออกมา ซึ่งแบคทีริโอเฟจเหล่านั้นจะสามารถไปทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายอื่นต่อไปได้ ดังนั้น lytic bacteriophage จึงเป็นแบคทีริโอเฟจที่เมื่อบุกรุกเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายแล้ว จะทำให้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายแตกสลายไป ในขณะที่ lysogenic bacteriophage เป็นแบคทีริโอเฟจ

ที่มีการดำรงชีวิตโดยการปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปเพื่อให้แทรกเข้าไปอยู่ภายในสารพันธุกรรมของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ดังนั้นการบุกรุกเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของ lysogenic bacteria จึงไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายแตก แต่เพียงแค่ทำให้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงจากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่า เนื่องจาก lytic bacteriophage สามารถทำให้แบคทีเรียเป้าหมายแตกสลายได้ ดังนั้นแบคทีเรียโอเฟจชนิดนี้จึงนิยมนำมาใช้ในการรักษาโรค หรือที่เรียกว่า bacteriophage therapy ในงานวิจัยนี้ต้องการหาแบคทีเรียโอเฟจเพื่อนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae* ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ lytic bacteriophage ซึ่งจากการทดลอง พบว่าแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้ (bacteriophage SD1) เป็น lytic bacteriophage โดยสังเกตจากการที่แบคทีเรียโอเฟจดังกล่าวทำให้เกิด plaque ที่ใส ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจาก *S. dysenteriae* บริเวณนั้นถูก bacteriophage SD1 ทำให้แตกสลายไป ตรงบริเวณนั้นจึงไม่มี *S. dysenteriae* เหลืออยู่ จึงปรากฏเป็นบริเวณที่ใส

ถึงแม้ว่าแบคทีเรียโอเฟจเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นในอากาศ ในน้ำ ในดิน และในอาหาร แต่มีรายงานพบว่าแบคทีเรียโอเฟจมักจะมียากในบริเวณที่มีแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโอเฟจนั้นอยู่ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งจะมีมากในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เคยมีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มาก่อน (Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon 2010) ดังนั้นในการศึกษานี้ซึ่งต้องการหาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน จึงใช้ตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากโรงพยาบาล เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบแบคทีเรียโอเฟจที่ต้องการ ซึ่งจากการทดลองก็พบว่าตรงกับสิ่งที่คาดหวังไว้ คือ สามารถพบแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากการใช้น้ำตัวอย่างเพียงแค่ตัวอย่างเดียว คือ น้ำตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลประชารักษ์เวชการจังหวัดศรีสะเกษ

ข้อมูลที่ต้องทราบก่อนที่จะนำแบคทีเรียโอเฟจไปใช้ประโยชน์คือ แบคทีเรียโอเฟจที่สนใจจะนำไปใช้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียที่ใช้แยกแบคทีเรียโอเฟจหรือไม่ เพราะหากแบคทีเรียโอเฟจที่ต้องการนำไปใช้ประโยชน์สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้หลากหลายสายพันธุ์ (broad host range bacteriophage) การนำไปใช้ประโยชน์ก็อาจต้องมีความระมัดระวังมากขึ้นเพื่อไม่ให้แบคทีเรียโอเฟจไปยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อาจมีประโยชน์ เช่น แบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อยู่ในทางเดินอาหารของคน และสัตว์ แต่หากแบคทีเรียโอเฟจที่ต้องการนำไปใช้ประโยชน์มีความจำเพาะที่สูงมากต่อแบคทีเรีย กล่าวคือยับยั้งแบคทีเรียได้เพียงสายพันธุ์เดียว (narrow host range bacteriophage) การนำไปใช้ประโยชน์ก็อาจมีข้อจำกัดมากขึ้น เนื่องจากอาจไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันได้ ด้วยเหตุนี้ข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อให้สามารถ

ออกแบบการนำแบคทีริโอเฟจไปใช้ได้อย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ ในการทดลองนี้ แบคทีริโอเฟจที่แยกได้ (bacteriophage SD1) จัดเป็น *Shigella* specific bacteriophage คือเป็น แบคทีริโอเฟจที่ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ใน genus *Shigella* จากรายงานการวิจัยต่าง ๆ พบว่ามีแบคทีริโอเฟจหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น genus specific bacteriophage เช่น bacteriophage SAL-PG ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียใน genus *Salmonella* (Rahaman and et al., 2014) bacteriophage S25-3 ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียใน genus *Staphylococcus* และ bacteriophage WR3 ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียใน genus *Shigella* (Rattanabornvorn et al., 2017)

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจตามเกณฑ์ของ International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV จำเป็นต้องใช้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของสารพันธุกรรม และรูปร่างของแบคทีริโอเฟจ จากการศึกษาพบว่าสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 สามารถถูกตัดได้ด้วย *Pst*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ที่ตัดได้เฉพาะสารพันธุกรรมประเภท double stranded DNA ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 เป็น double stranded DNA นอกจากนี้จากการศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วย transmission electron microscope พบว่า bacteriophage SD1 เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหาง (tailed bacteriophage) โดยหางมีลักษณะยาว ยึดหดได้ แบคทีริโอเฟจที่มีหาง (tailed bacteriophage) และมีสารพันธุกรรมเป็น double stranded DNA จะจัดอยู่ใน order Caudovirales (Ackermann, 2009) ซึ่งใน order นี้ ประกอบด้วย 3 family โดยแบ่งแยกตามรูปร่างของแบคทีริโอเฟจ เป็น family Siphoviridae (แบคทีริโอเฟจมีหางยาว และหางยึดหดไม่ได้) family Myoviridae (แบคทีริโอเฟจมีหางยาว และหางยึดหดได้) และ family Podoviridae (แบคทีริโอเฟจมีหางสั้น) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage SD1 ไว้ใน family Myoviridae นอกเหนือจากแบคทีริโอเฟจที่แยกได้จากการศึกษานี้แล้ว ยังพบว่ามีแบคทีริโอเฟจที่อยู่ใน family อื่นที่จำเพาะต่อ *Shigella* ตัวอย่างเช่น bacteriophage pSF-1 (Jun and et al., 2013) และ pSF-2 (Jun and et al., 2014) ซึ่งอยู่ใน family Siphoviridae และ bacteriophage SF-9 (Faruque et al., 2003) และ Psb-1 (Jun and et al., 2014) ซึ่งอยู่ใน family Podoviridae

ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หรือ minimal inhibitory concentration: MIC เป็นค่าที่จำเพาะต่อทั้งตัวยับยั้ง และแบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง ตัวอย่างเช่น การใช้ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียนั้นได้จะแตกต่างจากค่า MIC ของยาปฏิชีวนะอีกชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้ หรือการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งในการยับยั้งแบคทีเรีย 2 ชนิดที่ต่างกัน ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะนั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดหนึ่งได้จะแตกต่างจากค่า MIC ของยาปฏิชีวนะชนิดเดียวกันที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งได้ ด้วยเหตุนี้การนำแบคทีริโอเฟจ และยาปฏิชีวนะ

มาใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งจำเป็นต้องมีการหาค่า MIC เสมอ ใน การศึกษานี้พบว่าค่า MIC ของ bacteriophage SD1 สำหรับการยับยั้ง *S. dysenteriae* มีค่าเท่ากับ 10^4 PFU/ml ส่วนค่า MIC ของ ampicillin สำหรับการยับยั้ง *S. dysenteriae* มีค่าเท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อนำ bacteriophage SD1 และ ampicillin มาใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S. dysenteriae* สามารถลดความเข้มข้นของทั้ง bacteriophage SD1 และ ampicillin ที่จะต้องใช้ ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น การใช้ bacteriophage SA11 ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefoxitin ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* (Jo and et al., 2016) และ การใช้ bacteriophage T4 ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefotaxime ในการ ยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Ryan E.M., Alkawareek M.Y. and Donnelly R.F, 2012) โดย งานวิจัยดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้แบคทีเรียโอเฟจและยาปฏิชีวนะร่วมกันในการยับยั้ง แบคทีเรียทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียจะดีขึ้น โดยสังเกตได้จากการลดลงของความ เข้มข้นของทั้งแบคทีเรียโอเฟจ และยาปฏิชีวนะที่ต้องใช้ในการยับยั้งแบคทีเรีย

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- นิตยา คำคุ้ม และคณะ. “แบคทีเรียโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์”, **ศรีนครินทร์ เวชสาร**. 25(1): 47-53; มีนาคม, 2553.
- ปาริชาติ พุ่มขจร. “การรักษาโรคติดเชื้อด้วยแบคทีเรียโอเฟจ”, **วารสารเทคนิคการแพทย์และการบำบัด**. 21(1): 94-101; กรกฎาคม, 2552.
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2551). “Kiyoshi Shiga”, **Wikipedia The Free Encyclopodia**. ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์. https://en.wikipedia.org/wiki/Kiyoshi_Shiga. 18 เมษายน, 2561.
- สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค. (ม.ป.ป.). “ความรู้เรื่องโรค Shigellosis”. **สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค Shigellosis**. <http://www.boe.moph.go.th/fact/Shigellosis.htm>. 18 เมษายน, 2561.
- โสภา คำมี. (2544). “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพืชสมุนไพรบางชนิดต่อ *Shigella* spp.”, **คลังปัญญามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ PSU Knowledge Bank**. http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/3077/8/217060_ch1.pdf. 18 เมษายน, 2561.
- อรุณ บำรุงตระกูลนนท์. (2540). “บิดชิเกลล่า (Shigellosis, Bacillary dysentery)”, **ศูนย์ข้อมูลโรคและพาหะนำโรค**. http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=31. 18 เมษายน, 2561.
- อภิญา นามสาย. “Bacteriophage: Phage application”, **วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม**. 24(2): 105-109; พฤษภาคม, 2560.
- Abedon S.T. and et al. “Phage Treatment of human infections”, **Journal Bacteriophage Landes Bioscience**. 1(2): 66-85; March-April, 2011.
- Ackermann H.W. “Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000”, **Journal Arch Virol**. 146(5): 843-857; May, 2001.
- _____. “Bacteriophage observations and evolution”, **Res Microbiol**. 154(4): 254-251; May, 2003.
- _____. “Phage classification and characterization”, **Methods in Molecular Biology**. 501: 127-140; May, 2009.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Aryal S. (2018). “*Salmonella Shigella* (SS) Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Result Interpretation”, **Microbiology Info. com**.
<https://microbiologyinfo.com/salmonella-shigella-ss-agar-composition-principle-uses-preparation-and-result-interpretation/>. July 2, 2018.
- Antibiotics LVSM. “Drugs That Block Protein Synthesis”, **Antibioticslvsm. Weebly**.
<https://antibioticslvsm.weebly.com/mechanism-of-action.html>.
 8 February, 2019.
- Asbury K. and et al. “*Shigella*” Reference Module in Biomedical Sciences Refers to Jérôme Viala, Dana J. Philpott “*Shigella*”, **Encyclopedia of Gastroenterology**. 2004: 357-359; May, 2018.
- Babalova E.G. and et al. “preventive value of dried dysentery bacteriophage”, **Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**. 5(2): 143-145; February, 1968.
- Bao H. and et al. “Bio-control of *Salmonella enteritidis* in Food Using Bacteriophages”, **Viruses**. 7(8): 4836-4853; August, 2015.
- Bao H., Zhang H. and Wang R. “Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum”, **Poultry Science Association Inc**. 90(10): 2370; October, 2011.
- Bassole IHN and Juliani HR. “Essential oils in combination and their antimicrobial properties”, **Molecules**. 17: 3989-4006; June, 2012.
- Bedi M.S., Verma V. and Chhibber S. “Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055”. **World Journal Microbiol Biotechnol**. 25: 1145-1151; August, 2009.
- Bergan J. “Shiga toxins”, **Toxicon**. 60(6): 1085-1107; November 2012.
- Bogovazova G.G., Voroshilova N. N. and Bordarenko V.M. “The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection”, **Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol**. 6(4): 5-8 April, 1991.
- Bhunja A.K. **Foodborne Microbial Pathogens**. New York: McGraw Hill, 2008.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Campos J. and et al. "VEJ ϕ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholera* able to transduce the cholera toxin genes", **Appl Environ Microbio.** 156(1): 108-115; January, 2010
- Capparelli R. and et al. "Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in mice", **American Society for Microbiology.** 51(8): 2765-2773; August, 2007.
- Carlton R.M. and et al. "Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application", **Regul Toxicol Pharmacol.** 43(3): 301-312; December, 2005.
- Carrillo C.L. and et al. "Bacteriophage Therapy to Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of broiler Chickens", **American Society for Microbiology.** 71(11): 6554-6563; November, 2005.
- Coetzee J.N. "Proteus phage 34", **Journal Gen Microbiology.** 74(33): 1-7; February, 1963.
- Coetzee J.N., Smit J.A. and Prozesky O.W. "Providence and *Proteus Morganii* transducing phage", **Journal Gen Microbiol.** 139(44): 167-176; February, 1966.
- Deben Diagnostics Ltd. (n.d.). "*Shigella Antisera*", **Deben Diagnostics Ltd.**
<http://www.debendiagnosics.co.uk/BacterialtypingantiseraShigella.html>.
 July 2, 2018.
- Faruque S.M, and et al. "Shigelladysenteriae type 1- specific bacteriophage from environmental waters in Bangladesh", **Applied and Environmental Microbiology.** 69(12): 7028-7031; July, 2003.
- Frazier M.L. and Zimmermann L.N. "Plasmid born resistance to ultraviolet light and Phage *Streptococcus faecalis* spp. Zymogens", **Journal Microbiol.** 65(26): 1253-1255; July, 1980.
- Garbe C. and et al. **Transfer across the air-sea interface, in: Ocean-Atmosphere Interactions of Gases and Particles**, edited by: Liss, P. and Johnson, M. Norwich UK: Springer-Verlag, 2014.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Garbe J. and et al. “Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Phage JG004”, **BMC Microbiol.** 54(11): 102; May, 2011.
- Gallagher H. (2016). “Case 2-A. 2 year old child 3 days diarrhea Stool – blood-streaked, 3-4x per day Moderate grade fever, tenesmus, abdominal pain PE–Conscious, slightly”, **Slide Player.** <http://slideplayer.com/slide/9915395/>. July 2, 2018.
- Hagens S. and Loesser M.J. “Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens”, **Appl Microbiol Biotechnol.** 76(3): 513-519; September, 2007.
- Hagens S., Habel A. and Blasi U. “Augmentation of the antimicrobial efficacy of antibiotics by filamentous phage”, **Microbial Drug Resistance.** 12(3): 164-68; July, 2006.
- Heintschel von H.E., Nalik H.P. and Schmid E.N. “Characterization of a *Helicobacter pylori* phage (HP1)”, **Journal Med Microbial.** 38(4): 245-294; May, 1993.
- Higgins J.P. and et al. “User of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products”, **Poult Science.** 84(7): 1141-1145; July, 2005.
- Hung C.H. and et al. “Experimental phage therapy in treating *Klebsiella Pneumonia*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice”, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 55(4): 1358-1365; April, 2011.
- Inal J.M. **Phage Therapy a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics.** Basel, Switzerland: University Hospital Basel, 2003.
- Ioseliani G.D. and et al. “Use of bacteriophage and antibiotics for prevention of acute postoperative empyema in chronic suppurative lung diseases”, **Grudn. Khir.** 34(6): 63-67; November-December, 1980.
- Jensen A.M. and et al. “Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks”, **Proceedings the National Academy of science of the United state of America.** 103(12): 4652-4657; Mar, 2006.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Jensen E.C. and et al. “Prevalence of Broad-Host-Rang Lytic Bacteriophage of *Sphaerotilus natans* *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*”, **American Sciency for Microbiology**. 64(2): 575-580; February, 1998.
- Jo A., Ding T., Ahn J. “Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against *Staphylococcus aureus*”, **Food Science Biotechnol**. 25(3): 935-940, May, 2016.
- Jun J.W. and et al. “Characterization and complete genome sequence of the *Shigella* bacteriophage pSf-1”, **Research in Microbiology**. 164(10): 979-986; February, 2013.
- Jun J.W and et al. “Characterization and complete genome sequence of a novel N4-like bacteriophage, pSb-1 infecting *Shigellaboydii*”, **Research in Microbiology**. 165(8): 671-678; February, 2014.
- Kaiser G. (2017). “The Ability to Invade Host Cells”, **Biology LibreTexts**.
[https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Kaiser\)/Unit_3%3A_Bacterial_Pathogenesis/5%3A_Virulence_Factors_that_Promote_Colonization/5.3%3A_The_Ability_to_Invade_Host_Cells](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_3%3A_Bacterial_Pathogenesis/5%3A_Virulence_Factors_that_Promote_Colonization/5.3%3A_The_Ability_to_Invade_Host_Cells). July 2, 2018.
- Kilbane J.J. and Miller R.V. “Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages: identification and characterization of the nivel virus B86”, **Journal Virology**. 164(1): 193-200; May, 1988.
- Kim K.P., Klumpp J. and Loessner M.J. “Enterobacterio phage can prevent Bacterial growth in reconstituted infant formula”, **Science Direct International Journal Food Microbiology**. 115(2): 195-203; April, 2007.
- Kim M. and Ryu S. “Characterization of a T5-Like Coliphage, SPC35, and Differential Development of Resistance to SPC35 in *salmonella enteriaca* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*”, **Applied and Environmental Microbiology**. 77(6): 2042-2-5; April, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kim S. and et al. “*Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage PA1 Requires Type IV Pili for Infection and Show Broad Bactericidal and Biofilm Removal”, **Applied and Environmental Microbiology**. 78(17): 6380-6385; September, 2012.
- Klündt C. (n.d.). “*Shigella*”, **StudyBlue**. <https://www.studyblue.com/#flashcard/view/16225398>. July 2, 2018.
- Kochetkova V.A. and et al. “Phagotherapy of postoperative suppurative – Inflammatory complication in patients with neoplasms”, **Sov. Med.** 23(6): 23-26; July, 1989.
- Kudva T.I. and et al. “Biocontrol of *Escherichia coli* O157-specific bacteriophages”, **Applied and Environmental Microbiology**. 65(9): 3767-3773; September, 1999.
- Kwarcinski W. and et al. “Bacteriophage therapy in the treatment of recurrent Subphrenic and subhepatic abscess with jejunal fistula after stomach Resection”, **Polsk Tygodnik Lekarski**. 49(24): 535; June, 1994.
- Lin T.N. and et al. “Isolation and characterization of AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*”, **Research in Microbiology**. 16(4): 308-314; May, 2010.
- Lin D. (2016). “What’s a Superbug anyways?”, **A Daily Deed**. <https://adailydeed.wordpress.com/>. July 2, 2018.
- Lin D.M., Koskella B. and Lin H.C. “Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance”, **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**. 8(3): 162–173; July, 2017.
- Litvinova A.M., Chitesova V.M. and Kavtrev I.G. “Evaluation of efficacy of the use Of *E. coli*-Proteus bacteriophage in intestinal dysbacteriosis in premature Infants”, **Vopr. Okhr. Materin**. 23(9): 42-44; September, 1978.
- Mann N.H. “The potential of phage to prevent ARSA infections”, **Res. Microbiol.** 159(5): 400-405; June, 2008.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Martin A.C., Lopez R and Garcia P. “Pneumococcal bacteriophage Cp-1 encodes its Own protease essential for phage maturation”, **Journal Virol.** 72(4): 3491-3494; April, 1998.
- Marza J.A.S. and et al. “TA. Multiplication of therapeutically administered Bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients”, **Burns.** 32(5): 644-646; August, 2006.
- Mcnerney R. and et al. “Development of a Bacteriophage Phage Replication Assay for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis”, **Journal Clinical. Microbiol.** 42(5): 2115-2120; May, 2004.
- Merabishvili M. and et al. “Quality-controlled small-scale production of a well-Defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials”, **Plos one.** 4(3): e4944; March, 2009.
- Miliutina L.N. and Vorotyntseva N.V. “Current strategy and tactics of etiotropic Therapy of acute intestinal infection children”, **Antibiot. Khimioter.** 38(1): 46-53; January, 1993.
- Miller E.S. and et al. “Complete Genome Sequence of the Broad-Host-Range Vibriophage KVP40: Comparative Genomics of a T4-Related Bacteriophage” **American Sciency for Microbiolpgy.** 85(17): 5220-5233; September, 2003.
- Nouraldin A.A.M. and et al. “Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*”, **Alexandria Journal of Medicine.** 52(2): 99-105; July, 2016.
- O’Falherty S. and et al. “Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus Bacteriophage K for control of antibiotic-resistant Staphylococci from Hospitals”, **Applied and Environmental Microbiology.** 71(4): 1836-1842; April, 2005.
- O’Flynn G. and et al. “Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol Of *Escherichia coli* O157:H7”, **Applied and Environmental Microbiology.** 70(6): 3417-3424; June, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Orquera S. and et al. “Control of *Campylobacter* spp. And *Yersinia enterocolitica* by virulent bacteriophage”, **Journal Molecular and Genetic Medicine**. 95(6): 274-278; April, 2012.
- Perarson Benjamin Commings. (n.d.). “Bacteriophage”, **lytic cycle Lysogenic cycle**. <https://biotechkhan.wordpress.com/category/virology/> Bacteriophages. 2 June, 2018.
- Perepanova T.S. and et al. **The efficacy of bacteriophage preparations in treating Inflammatory urologic diseases**. Moskva, Russia: Urol. Nefrol, 1995.
- Pretorius G.H.J. and Coetzee W.F. “*Proteus mirabilis* phage 5006M: a physical Characterization”, **Journal Gen.Virol**. 45(2): 389-396; November, 1979
- Pinaud L. and et al. “Host Cell Targeting by Enteropathogenic Bacteria T3SS Effectors”, **Trends in Microbiology**. 26(4): 266-283; April, 2018.
- Rahaman M. and et al. “Poultry *Salmonella* specific bacteriophage isolation and characterization”, **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**. 12(2): 107-114; May, 2014.
- Rattanabornvorn W., Phumkhachorn P. and Rattanachaikunsopon P. “Potential of bacteriophages in controlling drug resistant *Shigella sonnei*”, **Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Science**. 19(3): 526-530; July, 2017.
- Raya R.R. and et al. “Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157: H7 Levels in sheep”, **Applied and Environmental Microbiology**. 72(9): 6405-6410; September, 2006.
- Regnum Prokaryotae. (n.d.). “ABIS ENCYCLOPEDIA: Genus *Shigella*”, **Regnum Prokaryotae**. <http://www.tgw1916.net/Enterobacteria/Shigella.html>. July 2, 2018.
- Ryan E.M., Alkawareek M.Y. and Donnelly R.F. “Gilmore BF.Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro”, **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. 65(2): 395-398; September, 2012.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Sabouri Ghannad M. and Mohammadi A. “Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria”, **Iran Journal Basic Med Sci.** 15(2): 693-701; June, 2012.
- Sandvig K. and Torgersen M.L. and et al. “Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine”, **Elsevier.** 584(12): 2626-2634; June, 2010.
- Schaffer J.J. and et al. “Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage UNL1 a bacterial virus with a novel UVA inducible DNA damage reactivation Phenotype”, **Applied and Environmental Microbiology.** 65(6): 2606-2613; June, 1999.
- Sheng H. and et al. “Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia Coli* O154:H7 levels in ruminants”, **Applied and Environmental Microbiology.** 72(8): 5359-5366; August, 2006.
- Siciliani E. (2017). “*Shigella dysenteriae*”, **Mechanisms of Pathogenicity.** <https://mechpath.com/2017/11/20/shigella-dysenteriae/>. April 18, 2018.
- Sillankorva S. and et al. “Efficacy of a Broad Host Range Lytic Bacteriophage Against *E. coli* Adhered to Urothelium”, **Curr Microbiol.** 62(4) 1128-1132; April, 2011.
- Slopek S. and et al. “Results of bacteriophages treatment of suppurative bacterial Infections. I. General evaluation of the results”, **Arch Immunol Ther Exp.** 3(31): 267-291; June, 1983.
- Soffer N. and et al. “Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods”, **Public Library of Science One.** 12(3): 175-256; April, 2017.
- Spanier J.G. and Cleary P.P. “A DNA substitution in the group A Streptococcal Bacteriophage SP24”, **Journal Virology.** 130(2): 514-522; October, 1983.
- Sridhar Rao P.N. “polymerase Chain Reaction (PCR)”, **Dept of Microbiology JJMMC. Davangere.** 43(3): 253-257; June, 2006.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Study Blue (2017). “The ways that antimicrobials inhibit growth of an organism”
Chegg. <https://www.studyblue.com/notes/note/n/lecture-final-exam/deck/6565795>. 8 February, 2019.
- Stroj L. and et al. “Successful treatment with bacteriophage in purulent Cerebrospinal meningitis in a newborn”, **Neurol. Neurochir. Pol.** 33(3): 693-698; May-June, 1999.
- Sulakvelidze A. and Morris J.G. “Bacteriophages as therapeutic agents”, **Annals Medicine**. 33(8): 507-509; November, 2001
- Sulakvelidze A., Alavidze Z. and Morris J.G. “Bacteriophage therapy”, **Antimicrob Agents Chemother**. 45(3): 649-59; November, 2001.
- Talbot H.W. and Parisi J.T. “Phage Typing of *Staphylococcus epidermidis*”, **American Society for Microbiology**. 51(1): 519-523; March, 1976.
- Tankeshwar. (2013). “MacConkey Agar (MAC): Composition, preparation, uses and colony characteristics”, **Microbe Online**. <https://microbeonline.com/macconkey-agar-mac-composition-preparation-uses-and-colony-characteristics/>. July 2, 2018.
- The Study Hub. “Micro-organisms”, **Chegg**. http://www.vali-tech.net/home/article-read.php?ArticleId=15&fbclid=IwAR0n5a7dLA4hBO7ljWljAyWfPvmVf1_0YRqZaK4EX7HMNuSqW6yHM3IUro. 8 February, 2019.
- _____. “sulfanilamide and para-aminobenzoic acid (PABA)”,
<https://www.chegg.com/homework-help/sulfonamides-sulfa-drugs-sulfanilamide-antibacterial-drugs-i-chapter-5-problem-7p-solution-9780321830562>. 8 February, 2019.
- The University of British Columbia. (2016). “Course: PATH417:2015W1/Case 2/Student 8”, **UBCWiki**. http://wiki.ubc.ca/Course:PATH417:2015W1/Case_2/Student_8. April 18, 2018.
- The Journal of Undergraduate Biological Studies. (2010) “Pathogen Profile Dictionary”,
The Journal of Undergraduate Biological Studies.
<http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/shigella.htm>. April 18, 2018.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Todar K. (2008-2012). “*Shigella* and Shigellosis (page 3)”, **Todar’s online textbook of bacteriology**. http://textbookofbacteriology.net/Shigella_3.html. July 2, 2018.
- Todar K. (2008-2012). “*Shigella* and Shigellosis (page 4)”, **Todar’s online textbook of bacteriology**. http://textbookofbacteriology.net/Shigella_4.html. July 2, 2018.
- _____. (2008-2012). “*Shigella* and Shigellosis (page 1)”, **Todar’s online textbook of bacteriology**. http://textbookofbacteriology.net/Shigella_1.html. July 2, 2018.
- University of Leicester. (n.d.). “Bacteriophage”, University of Leicester. <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/microbial-genetics-1/bacteriophage>. April 18, 2018.
- Wall S.K. and et al.” Phage Therapy to Reduce Preprocessing *Salmonella* Infections In Maeket-Weight Swins”, **American Sciency for Microbiolpgy**. 76(1): 48-53; January, 2010.
- Weber-Dabrowska B., Dabrowski M. and Slopek S. “Studies on bacteriophage Penetration in patients subjected to phage therapy”, **Arch. Lmmunol. Ther. Exp**. 35(5): 563-568; February, 1987.
- Weber-Dabrowska B., Mulczyk M. and Gorski A. “Bacteriophage therapy for infections In cancer patients”, **Clinical and Applied Immunology Reviews**. 3(1): 131-134; January-March, 2001
- Wikipedia. (2017). “Kiyoshi Shiga”, **Wikipedia The Free Encyclopodia**. https://en.wikipedia.org/wiki/Kiyoshi_Shiga. April 18, 2018.
- Winston V. and Thompson T.L. “Isolation and characterization of a bacteriophage Specific for *Sphaerotilus natans* which contains as unusual base in its Deoxyribonucleic acid”, **Appl. Environ. Microbiol**. 37(5): 1025-1030; May, 1979.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wright A. and et al. "A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage Preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas Aeruginosa*; a preliminary report of efficacy", **Clinical Otolarygol.** 34(4): 349-357; August, 2009.
- Yang S.C. and et al. "The roles of the virulence factor IpaB in *Shigella* spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells", **Microbiological Research.** 181: 43-51; December, 2015.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Brain Heart Infusion Agar (BHI agar)

Calf brains, infusion from	200 g/l
Beef heart infusion from	250 g/l
Proteose peptone	10 g/l
Dextrose	2 g/l
Sodium chloride	5 g/l
Disodium phosphate	2.5 g/l
Agar	15 g/l
Water	1 l

Brain Heart Infusion Broth (BHI broth)

Calf brains, infusion from	200 g/l
Beef heart infusion from	250 g/l
Proteose peptone	10 g/l
Dextrose	2 g/l
Sodium chloride	5 g/l
Disodium phosphate	2.5 g/l
Water	1 l

Brain Heart Infusion soft agar

Brain heart infusion broth	10.4 g/l
Agar	0.8 g/l
Water	200 ml

Double strength BHI broth

Brain heart infusion broth	2.6 g/l
Water	50 ml

ภาคผนวก ข
ผลงานทางวิชาการ



Synergistic Effect of Bacteriophage and Ampicillin against *Shigella dysenteriae*

Praphatchara Pornnikom, Parichat Phumkhachorn and Pongsak Rattanachaikunsopon

Department of Biological Science,

Faculty of Science, UbonRatchathani University, Thailand

(Corresponding author: Pongsak Rattanachaikunsopon)

(Published by Research Trend, Website: www.biobulletin.com)

(Received 15 September 2018; Accepted 25 November 2018)

ABSTRACT: Bacteriophage therapy has been considered as a potential approach to control drug resistant bacteria that cannot be killed by conventionally used antibiotics. Currently, synergism between bacteriophages and antibiotics has been reported to be a more effective therapeutic approach than that using each of these agents alone. In this study, a lytic bacteriophage against *S. dysenteriae* DMST 15111, SD01, was isolated from a hospital wastewater sample. Host range study revealed that the bacteriophage was specific to genus *Shigella*. By using the spot test, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of bacteriophage SD01 and ampicillin against *S. dysenteriae* DMST 15111 were 10^4 PFU/ml and 31.25 µg/ml, respectively. When they were used together the MICs of both agent were substantially reduced. The results suggested that the bacteriophage and ampicillin had a synergistic inhibitory effect against *S. dysenteriae* DMST 15111. Therefore, this approach has a potential as a therapeutic approach against *Shigella* spp.

Keywords: Bacteriophage, ampicillin, *Shigella dysenteriae*

How to cite this article: Praphatchara Pornnikom, Parichat Phumkhachorn and Pongsak Rattanachaikunsopon (2019). Synergistic Effect of Bacteriophage and Ampicillin against *Shigella dysenteriae*. *Bio Bulletin*, 5(1): 05-09.

INTRODUCTION

Shigella dysenteriae is a rod-shaped, gram negative bacterial species and classified as a member of facultative anaerobes. It is considered as an important food borne pathogen especially in developing countries. Since it produces deadly Shiga toxin, its infection can be severe and life threatening (Niyogi, 2005). Infections with *S. dysenteriae* are normally treated by antibiotics especially ciprofloxacin, ampicillin, cotrimoxazole, erythromycin, tetracycline, streptomycin and chloramphenicol (Lolekha *et al.*, 1991). However, many drug resistant strains of *S. dysenteriae* have recently emerged which lessen the effectiveness of the traditional treatment of bacterial infections by antibiotics (Khan *et al.*, 2009; Rezaii *et al.*, 2015).

Currently, many research works have been conducted to use bacteriophages as alternatives to antibiotics to control bacterial infections. The approach is called bacteriophage therapy (Pelfrene *et al.*, 2016; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2017).

Several bacteriophages have been reported to be able to kill *S. dysenteriae* including bacteriophage SF-9 that was isolated from a river in Dhaka, Bangladesh (Faruque *et al.*, 2003). ShigaShield is a *Shigella* specific bacteriophages cocktails available as a commercial product. It consists of 5 different bacteriophages specific to *Shigella* spp. commonly contaminated in foods including 4 strains of *S. dysenteriae*, 2013AM-2809, AM11413, AM17886 and AM25896 (Soffer *et al.*, 2017). Bacteriophages have many advantages over antibiotics when they are used to treat bacterial infections. Because of their high specificity to host cells, bacteriophages generally kill only target bacterial pathogens and leave normal flora untouched; thus, causing no side effect. Low treatment doses are required because bacteriophages can replicate when they infect their hosts (Pelfrene *et al.*, 2016).

The therapeutic approach using bacteriophages together with antibiotics have been proposed (Wolska *et al.*, 2012). With this approach, less amounts of both agents are

required. It also improves the effectiveness of bacterial infection treatment because escaping (unkilled) bacteria have to be resistant to both bacteriophages and antibiotics. Synergism between bacteriophages and antibiotics has been reported to successfully inhibit pathogenic bacteria. For examples, bacteriophages have been used together with amikacina and gentamycin to control *Pseudomonas aeruginosa* (Nouraldin *et al.*, 2016; Hagens *et al.*, 2006) and together with amoxicillin and ciprofloxacin to control *Klebsiella pneumoniae* (Bedi *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2010). Therefore, it is of interest to study bacteriophage-antibiotic synergism to control *S. dysenteriae*. In this study, a bacteriophage specific to *S. dysenteriae* was isolated from a hospital wastewater sample. Its host range against a variety of bacteria was examined. The inhibitory ability against *S. dysenteriae* was also determined when it was used individually and in combination with an antibiotic.

MATERIALS AND METHODS

A. Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *S. dysenteriae* DMST 15111 was used as a host for bacteriophage isolation and purification. All of them were grown in Brain heart infusion (BHI) medium at 37°C. Stock cultures of all bacteria containing 20% glycerol (v/v) were maintained at -20°C.

B. Bacteriophage isolation and purification

A wastewater sample was collected from Pracharak Vejchakam Hospital, Srisaket Province, Thailand. The sample (10 ml) was centrifuged at 3,500 rpm for 5 min and the supernatant was collected and filtered through a membrane filter with a 0.45 µm pore size. The filtrate was added to an equal volume of double strength LB broth. To the mixture, 100 µl of a log phase *S. dysenteriae* DMST 15111 culture was added. After incubation at 37°C for 24 h, the culture was centrifuged at 3,500 rpm for 5 min and the supernatant was filtered through a membrane filter with a 0.45 µm pore size. The resulting filtrate was examined for the presence of a bacteriophage by the spot test that was performed as follows. A log phase culture of each bacterial strain uniformly swabbed over the surface of a BHI agar. Ten µl of the bacteriophage suspension was spotted onto the bacterial lawn. 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, indicated the lytic activity of the bacteriophage.

The presence of a bacteriophage in the filtrate was confirmed by plaque assay using *S. dysenteriae* DMST 15111 as a host (Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon, 2018).

After plaque assay, a single clear plaque was randomly selected and subjected to 2 more rounds of plaque assay and single plaque selection. The single plaque selected from the final round of plaque assay was transferred into a tube containing 10 ml of a log phase *S. dysenteriae* DMST 15111 culture. The tube was then incubated at 37°C overnight to allow bacterial cell lysis to occur. The bacteriophage lysate was centrifuged at 3,500 rpm for 5 min. The supernatant was filtrated through a membrane filter with a 0.45 µm pore size. The resulting filtrate or bacteriophage suspension was kept as a bacteriophage stock at 4°C.

Plaque assay was also used to determine the concentration of the bacteriophage in plaque forming unit (PFU)/ml (Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon, 2018).

C. Bacteriophage host range determination

The inhibitory ability of the isolated bacteriophage against a variety of bacteria (listed in Table 1) was determined by using the spot test as mentioned above.

D. Determination of the minimal inhibitory concentration of bacteriophage

To determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of bacteriophage against *S. dysenteriae* DMST 15111, ten-fold dilution of the bacteriophage suspension was performed to obtain the bacteriophage concentrations ranging from 10^9 to 10 PFU/ml. Each bacteriophage concentration was examined for its ability to inhibit *S. dysenteriae* DMST 15111 by the spot test as mentioned above.

E. Determination of the minimal inhibitory concentration of ampicillin

To determine the MIC of ampicillin against *S. dysenteriae* DMST 15111, two-fold dilution of the antibiotic was performed to obtain the concentrations ranging from 1,000 – 31.25 µg/ml. Each ampicillin concentration was examined for its ability to inhibit *S. dysenteriae* DMST 15111 by the spot test as mentioned above.

F. Study of bacteriophage-ampicillin synergism

To study bacteriophage-ampicillin synergism to control *S. dysenteriae* DMST 15111, 5 µl of bacteriophage and 5 µl of ampicillin were combined to obtain a sub MIC range of both agents as shown in Table 2. Sterile distilled water was used as a negative control for both bacteriophage and ampicillin. Bacteriophage and ampicillin with the concentration of MICs were used as positive controls. Each bacteriophage-ampicillin combination was examined for its ability to inhibit *S. dysenteriae* DMST 15111 by the spot test as mentioned above.

RESULTS AND DISCUSSION

A. Bacteriophage isolation and purification

A filtrate prepared from a hospital wastewater was shown by the spot test to have a bacteriophage specific to *S. dysenteriae* DMST 15111 because it produced an inhibition zone on the lawn of the bacterial host (Fig. 1a). The result was also confirmed by plaque assay. The filtrate produced uniform plaques with a diameter of about 0.1 mm (Fig. 1b). The bacteriophage was designated bacteriophage SD01. Since the inhibition zone and plaques produced by the bacteriophage were clear, it was likely to be a lytic bacteriophage. This type of bacteriophage is favorable for using as a therapeutic agent because it can kill the target bacteria.

The practical way to isolate a bacteriophage specific to a particular bacterial strain is to use the sample collected from where the bacterial host exists. Since the bacterial strain used as the host for bacteriophage isolation, *S. dysenteriae* DMST 15111, is a clinical strain isolate from a hospital, the ideal sample for bacteriophage isolation is a wastewater sample collected from a hospital. Previously, several bacteriophages specific to hospital derived pathogens were isolated from hospital derived samples such as those specific to multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (Pallavali *et al.*, 2017), multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* (Ghajavand *et al.*, 2017) and extended spectrum β -lactamases (ESBL) producing *E. coli* (Phumkhachorn and Rattanachaiunsopon, 2015).

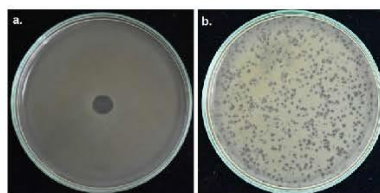


Fig. 1. Inhibition zone (a) and plaques (b) on lawn of *S. dysenteriae* DMST 15111 produced by the bacteriophage SD01.

B. Bacteriophage host range

One parameter needed to be considered before using a bacteriophage as a therapeutic agent is its host range (Ross *et al.*, 2016). Bacteriophages with a broad host range may not be suitable for therapeutic use because they tend to inhibit beneficial normal flora residing in recipients. However, bacteriophages with a narrow inhibitory spectrum may cause limitation in their therapeutic use. This problem can be overcome by using

cocktails of several bacteriophages (Chan *et al.*, 2013) or combinations of bacteriophages and antibiotics (Volska *et al.*, 2012). The bacteriophage SD01 isolated in this study was found to be genus specific because it inhibited all species of the genus *Shigella*, but not the rest of the bacteria used in this study (Table 1). Since it did not inhibit other genera of bacteria besides *Shigella*, it might be a safe therapeutic agent with no harm to normal flora.

Table 1: Inhibitory ability of bacteriophage against a variety of bacteria.

Bacteria ^a	Inhibitory ability ^b
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC27736	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	-
<i>Shigella boydii</i> DMST 28180	+
<i>Shigella dysenteriae</i> DMST 15111	+
<i>Shigella flexneri</i> DMST 4423	+
<i>Shigella sonnei</i> DMST 561	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-

^aATCC, American Type Culture Collection; DMST, Department of Medical Sciences Thailand

^b- = no inhibitory ability; + = having inhibitory ability

C. MIC of bacteriophage SD01 against *S. dysenteriae* DMST 15111

The different concentrations of bacteriophage SD01 ranging from 10^3 to 10^5 PFU/ml were subjected to the spot test to examine their inhibitory ability against *S. dysenteriae* DMST 15111. The bacteriophage concentrations capable of inhibiting the bacterial host were 10^4 PFU/ml and above while those produced inhibition zone against the bacterial host were 10^3 PFU/ml and below. The results indicated that the MIC of bacteriophage SD01 against *S. dysenteriae* DMST 15111 was 10^4 PFU/ml. Each MIC value is specific to each bacteriophage-host pair. When one party of the pair (bacteriophage or host) is changed, the MIC will alter. For example, the MIC values of bacteriophage SD01 against *S. sonnei* DMST 561 was 10^5 PFU/ml (data not shown). Similar finding was also reported in the case of bacteriophage lambda. The bacteriophages T4 and T7 had different MIC values against the same *E. coli* host (Vipra *et al.*, 2013)

D. MIC of ampicillin against *S. dysenteriae* DMST 15111

The different concentrations of ampicillin ranging from 1,000–1.95 µg/ml were subjected to the spot test to examine their inhibitory ability against *S. dysenteriae* DMST 15111. The ampicillin concentrations capable of inhibiting the bacterial host were 31.25 µg/ml and above while those produced inhibition zone against the bacterial host were 62.5 µg/ml and below. The results indicated that the MIC of ampicillin against *S. dysenteriae* DMST 15111 was 31.25 µg/ml. Similar to the bacteriophage-host relationship, each MIC value is specific to each antibiotic-host pair. When one party of the pair (antibiotic or host) is changed, the MIC will alter. For example, the MIC values of ampicillin against *S. sonnei* DMST 561 was 62.5 µg/ml (data not shown). Two different antibiotics, cefquinome and cephalixin, were found to have different MIC values against the same *E. coli* host (Sheldon *et al.*, 2004).

E. Bacteriophage SD01-ampicillin synergism against *S. dysenteriae* DMST 15111

When bacteriophage SD01 and ampicillin with concentration less than MIC values (sub MIC values) were used together to inhibit *S. dysenteriae* DMST 15111. At those concentrations, both bacteriophages SD01 and ampicillin alone could not inhibit the bacterial host. However, when they used together, they were able to inhibit *S. dysenteriae* DMST 15111 and the lowest concentrations of bacteriophages SD01 and ampicillin that could inhibit the host were 10³ PFU/ml (MIC₀/10) and 7.81 µg/ml (MIC₀/4), respectively, which were in the sub MIC levels (Table 2). The results suggested that bacteriophage SD01 and ampicillin had a synergistic effect against *S. dysenteriae* DMST 15111. Similar findings were reported by Nouraldin *et al.* (2016) who used bacteriophages in combination with amikacin to control *P. aeruginosa* and Bedi *et al.* (2006) who used bacteriophages in combination with amoxicillin to control *K. pneumoniae*.

Table 2: Inhibitory ability of bacteriophage and ampicillin against *S. dysenteriae* DMST 15111.

Ampicillin concentration	Bacteriophage concentration			
	No bacteriophage	MIC ₀ /100	MIC ₀ /10	MIC ₀
No ampicillin	-	-	-	+
MIC ₀ /4	-	-	+	+
MIC ₀ /2	-	-	+	+
MIC ₀	+	+	+	+

MIC₀ = MIC of bacteriophage SD01; MIC₀ = MIC of ampicillin

- = no inhibitory ability; + = having inhibitory ability

The use of bacteriophages and antibiotics combination have several advantages over using each one of these agents alone. Antibiotics can broaden the host ranges of bacteriophages; thus, improving inhibitory ability of bacteriophages. In addition, bacteriophages can reduce therapeutic doses of antibiotics; hence, reducing side effects causing by nonspecific inhibitory effect of antibiotics and lowering drug resistance emerge risks resulting from excessive use of antibiotics (Chaudhry *et al.*, 2017).

CONCLUSIONS

Bacteriophage SD01 was a *Shigella* specific bacteriophage isolated from a hospital wastewater sample. It had inhibitory ability against *S. dysenteriae* DMST 15111 when used alone and used in combination with ampicillin. The synergism between these two agents substantially reduced their minimal inhibitory concentrations against *S. dysenteriae* DMST 15111. With further investigation, the bacteriophage, by itself or in combination with antibiotics, may be useful as a therapeutic agents in controlling *Shigella* spp.

REFERENCES

- Bedi, M. S., Verma, V. and Chhibber, S. (2009). Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**: 1145-1151.
- Chan, B. K., Abedon, S.T. and Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, **8**(6): 769-783.
- Chaudhry, W. N., Concepcion-Acevedo, J., Park, T., Andleeb, S., Bull, J. J. and Levin, B.R. (2017). Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS ONE*, **12**(1): e0168615.
- Faruque, S. M., Chowdhury, N., Khan, R., Hasan, M. R., Nahar, J., Islam, M. J., Yamasaki, S., Ghosh, A. N., Nair, G. B. and Sack, D. A. (2003). *Shigella dysenteriae* Type 1-Specific Bacteriophage from Environmental Waters in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(12): 7028-7031.
- Ghajavand, H., Esfahani, B. N., Havaei, A., Fazeli, H., Jafari, R. and Moghim, S. (2017). Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, **12**(5): 373-380.
- Hagens, S., Habel, A. and Blasi, U. (2006). Augmentation of the antimicrobial efficacy of antibiotics by filamentous phage. *Microbial Drug Resistance*, **12**(3): 164-68.
- Khan, E., Jabeen, K., Ejaz, M., Siddiqui, J., Shezad, M. F. and Zafar, A. (2009). Trends in antimicrobial resistance in *Shigella* species in Karachi, Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **3**(10): 798-802.
- Lolekha, S., Vibulbandhitkit, S. and Poonyarit, P. (1991). Response to antimicrobial therapy for shigellosis in Thailand. *Reviews of Infectious Diseases*, **13**(Suppl 4): S324-S326.

- Niyogy, S.K. (2005). Shigellosis. *Journal of Microbiology*, **43**(2): 133-143.
- Nouraldin, A. A. M., Baddour, M. M., Harfoush, R. A. H. H. and Essa, S. A. M. (2016). Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alexandria Journal of Medicine*, **52**(2): 99-105.
- Pallavali, R. R., Degati, V. L., Lomada, D., Reddy, M. C. and Durbaka, V.R.P. (2017). Isolation and *in vitro* evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. *PLoS ONE*, **12**(7): e0179245.
- Pelfrene, E., Willebrand, E., Cavaleiro Sanches, A., Sebris, Z. and Cavaleri, M. (2016). Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**(8): 2071-2074.
- Phumkhachorn, P. and Rattanachaiakunsoop, P. (2015). A *Siphoviridae* bacteriophage specific to Extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **70**(11): 604-608.
- Phumkhachorn, P. and Rattanachaiakunsoop, P. (2018). A lytic podophage specific to fish pathogenic *Edwardsiella tarda*. *Pakistan Journal of Biotechnology*, **15**(1): 117-121.
- Rattanachaiakunsoop, P. and Phumkhachorn, P. (2017). Bacteriophages as Future Prophylactic and Therapeutic Agents against Food borne Bacterial Pathogens. *International Journal of Nutrition and Health Sciences*, **2**(1): 19-20.
- Rezaili, N., Eghdami, A. and Mojtahedi, M. M. (2015). Investigation of the synergistic antimicrobial activity of PLGA-methicillin on methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Biological Forum – An International Journal*, **7**(1): 1240-1247.
- Ross, A., Ward, S. and Hyman, P. (2016). More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 1352.
- Sheldon, I. M., Bushnell, M., Montgomery, J. and Rycroft, A. N. (2004). Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Veterinary Record*, **155**: 383-387.
- Soffer, N., Woolston, J., Li, M., Das, C. and Sulakvelidze, A. (2017). Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods. *PLoS ONE*, **12**(3): e0175256.
- Verma, V., Harjai, K. and Chhibber, S. (2010). Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*, **26**(6): 729-737.
- Vipra, A., Desai, S., Junjappa, R., Roy, P., Poonacha, N., Ravinder, P., Sriram, B. and Padmanabhan, S. (2013). Determining the Minimum Inhibitory Concentration of Bacteriophages: Potential Advantages. *Advances in Microbiology*, **3**(2): 181-190.
- Wolska, K. I., Grzes, K. and Kurek, A. (2012). Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. *Polish Journal of Microbiology*, **61**(2): 95-104.

O-6-1

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae*
จากน้ำเสียที่เก็บจากโรงพยาบาล
Isolation and characterization of bacteriophage specific to *Shigella dysenteriae*
from hospital wastewater

ประพัชรา พรนิคม* พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

E-mail: ampiwsoda789@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae* DMST15111 จากน้ำตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาล ซึ่งจากการทดลองสามารถแยกแบคทีริโอเฟจได้ 1 ชนิด คือ bacteriophage SD1 เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าแบคทีริโอเฟจสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียใน genus *Shigella* เท่านั้น จากการตรวจสอบชนิดของสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I พบว่าแบคทีริโอเฟจมีสารพันธุกรรมเป็น double stranded DNA และจากการศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วย transmission electron microscope พบว่า bacteriophage SD1 เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหางยาว ยึดติดได้ จากข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของสารพันธุกรรม และรูปร่างของแบคทีริโอเฟจทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage SD1 ไว้ใน family *Myoviridae* แบคทีริโอเฟจที่ได้จากการศึกษามีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ควบคุม *Shigella* spp. แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

คำสำคัญ: แบคทีริโอเฟจ ไมโอไวรัส ชิเจลล่า ชิเจลโลซิส

Abstract

This study aimed to isolate a bacteriophage specific to *Shigella dysenteriae* DMST15111 from a water sample collected from hospital. In this study, a bacteriophage was isolated and named as bacteriophage SD1. When the bacteriophage was tested for the inhibitory ability against various strains of bacteria, it was found to be able to inhibit only bacteria in the genus *Shigella*. From the examination of bacteriophage SD1's genetic material by digestion with *Pst*I, it was found that the genetic material was double stranded DNA. From the study of bacteriophage morphology by transmission electron microscope, it was found that bacteriophage SD1 was a bacteriophage with a contractile tail. Based on its genetic material and morphology, bacteriophage SD1 was classified in the family *Myoviridae*. The bacteriophage obtained from this study might be useful as an alternative to antibiotics for controlling *Shigella* spp.

Keywords: Bacteriophage, *Myoviridae*, *Shigella*, Shigellosis

บทนำ

Shigella dysenteriae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ในกลุ่ม facultative anaerobe มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore-forming) ไม่สร้างแคปซูล (non-capsulate) และไม่หมักน้ำตาลแลคโตส (non-lactose ferment) *S. dysenteriae* สามารถสร้างสารพิษ shiga toxin ซึ่งสารพิษดังกล่าวทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบ ท้องร่วง ปวดเกร็งในช่องท้อง อาเจียน และมีไข้ ซึ่งเป็นอาการสำคัญของโรค shigellosis (Kottloff et al., 2018: 801) การติดต่อของโรคนี้เกิดจากการได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารและ น้ำดื่มที่ผ่านการปรุงหรือเตรียมที่ไม่ถูกสุขลักษณะ การรักษาโรค shigellosis จะใช้ยาปฏิชีวนะจำพวก ampicillin, ciprofloxacin, cotrimoxazole, erythromycin และ tetracycline อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่าเชื้อ *S. dysenteriae* หลายสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะดังกล่าว ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อ *S. dysenteriae* มีความยากลำบากมากขึ้น (Niyogi, 2007: 1141; Puzari et al., 2018: 451)

ในปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจในการนำแบคทีเรียโอเฟจ (bacteriophage) มาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเรียกวิธีการรักษาดังกล่าวว่า bacteriophage therapy หรือ phage therapy ที่ผ่านมามีแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลายเชื้อ *S. dysenteriae* ได้ เช่น แบคทีเรียโอเฟจ SF-9 ซึ่งแยกได้จากน้ำที่เก็บจากแม่น้ำในเมือง Dhaka ประเทศ บังกลาเทศ (Faruque et al., 2003: 7028) และ ShigaShield ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียโอเฟจ 5 ชนิดที่สามารถทำลาย *Shigella* spp. ที่มีพบในอาหาร รวมทั้ง *S. dysenteriae* 4 สายพันธุ์ คือ 2013AM-2809, AM11413, AM17886 และ AM25896 (Soffer et al., 2017: e0175256) การนำแบคทีเรียโอเฟจมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียมีข้อดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหลายประการ เช่นแบคทีเรียโอเฟจ ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง หรือก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เนื่องจากการทำลายแบคทีเรียโดยแบคทีเรียโอเฟจเป็นแบบจำเพาะ กล่าวคือ แบคทีเรียโอเฟจจะทำลายเฉพาะแบคทีเรียก่อโรค (ซึ่งมี receptor ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโอเฟจ) เท่านั้น โดยไม่ไปมีผลกระทบต่อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) (Lin et al., 2017: 162) ในขณะที่การทำลายแบคทีเรียโดยยาปฏิชีวนะเป็นแบบไม่จำเพาะ กล่าวคือ ยาปฏิชีวนะจะทำลายทั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียประจำถิ่น ดังนั้นผู้ที่ใช้ยาปฏิชีวนะจึงมักมีอาการข้างเคียงอันเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียประจำถิ่นถูกทำลาย เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถดื้อต่อแบคทีเรียโอเฟจได้ ซึ่งเป็นข้อท้าทายในการใช้แบคทีเรียโอเฟจในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากน้ำตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาล และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอเฟจ ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ชนิดสารพันธุกรรม และรูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจ แบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาให้สามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง *Shigella* spp. ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากน้ำตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาล
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษา เรื่อง การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *Shigella dysenteriae* จากน้ำเสียที่เก็บจากโรงพยาบาล มีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. การแยกแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* จากตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างที่ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียโอฟาจเป็นน้ำที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลพระราชวังเวการจังหวัดศรีสะเกษ นำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรอง (filter membrane) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน double strength BHI ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร พร้อมกับเติม *S. dysenteriae* DMST15111 (host cell) อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเก็บของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) ไปใช้ในการตรวจหา แบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* DMST15111 โดยวิธี spot test ต่อไป

2. การตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* โดยวิธี spot test

นำ *S. dysenteriae* DMST15111 อายุ 24 ชั่วโมง ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar โดยใช้ไม้พันสำลี (swab) จากนั้นนำของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มีการป้ายเชื้อ *S. dysenteriae* DMST15111 อายุ 24 ชั่วโมงไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* DMST15111 จะปรากฏโซนใส (clear zone) ตรงบริเวณที่หยดของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2)

3. การแยกแบคทีเรียโอฟาจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี plaque assay

นำของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) มาทำ plaque assay โดยเจือจางของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) ที่ละ 10 เท่า (ten fold dilution) แล้วนำแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI soft agar (0.4% agar) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (ที่ผ่านการหลอม แล้วทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) พร้อมกับเติมแบคทีเรีย *S. dysenteriae* DMST15111 อายุ 24 ชั่วโมง ลงไป 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเททับบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่แข็งแล้ว แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะปรากฏ plaque ให้เห็นบนจานเพาะเลี้ยง เลือก plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ (single plaque) มา 1 plaque โดยใช้ปลาย pipette tip เขี่ย plaque ดังกล่าวมาจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปทำ plaque assay อีก 1 รอบ แล้วเลือก plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ มา 1 plaque ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี *S. dysenteriae* DMST15111 เจริญอยู่และมีความขุ่น (OD ที่ 600 นาโนเมตร) เท่ากับ 0.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่า bacteriophage suspension การเก็บรักษา bacteriophage suspension ทำโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (ดังแสดงใน Table 1) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำมาทำการทดสอบความจำเพาะระหว่างแบคทีเรียกับแบคทีเรียโอฟาจโดยวิธี spot test โดยการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ อายุ 24 ชั่วโมง มาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar จากนั้นหยด bacteriophage suspension ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากแบคทีเรียโอเฟจสามารถยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นได้ จะเกิดโซนใส (clear zone) ตรงบริเวณที่หยด bacteriophage suspension

5. การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจ

นำ bacteriophage suspension มาสกัดเอาสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด GF-1 viral nucleic acid extraction kit (E.Z.N.A. M13 Miniprep kit, Omega Bio-tek, GA, USA) ตามวิธีการที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วย *Pst*I แล้วนำไปตรวจสอบผลการตัดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel และใช้ 1 kb DNA ladder (New England Biolabs, MA, USA) เป็น DNA marker

6. การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจด้วย transmission electron microscope

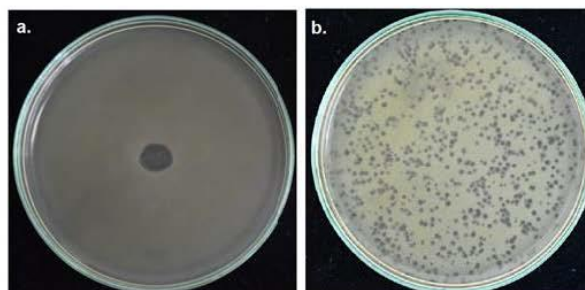
การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจทำโดยนำ bacteriophage suspension 1 หยด (ประมาณ 10 ไมโครลิตร) หยดลงบน grid ที่ฉาบด้วยคาร์บอน (carbon-coated grid) ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมด้วย 1% (w/v) uranyl acetate (pH 4.0) ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วย transmission electron microscope ขนาดของแบคทีเรียโอเฟจแสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดขนาดของแบคทีเรียโอเฟจ 5 ตัว

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองนี้ใช้น้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลพระนครศรีเวชการ จ. ศรีสะเกษเป็นน้ำตัวอย่างสำหรับการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* DMST15111 เมื่อนำของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) ที่เตรียมได้จากน้ำตัวอย่างดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae* DMST15111 โดยวิธี spot test พบว่าของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate 2) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยสังเกตได้จากมี inhibition zone เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด filtrate 2 ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการป้ายเชื้อ *S. dysenteriae* DMST15111 ไว้ทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1a)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าใน filtrate 2 ที่เตรียมได้จากน้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลพระนครศรีเวชการมีแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* DMST15111 และเมื่อนำ filtrate 2 มาทำ plaque assay ก็พบว่าสามารถทำให้เกิด plaque ขึ้นบนอาหารที่มี *S. dysenteriae* DMST15111 เจริญอยู่ (ภาพที่ 1b) ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่าใน filtrate 2 มีแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* DMST15111 และได้ให้ชื่อแบคทีเรียโอเฟจนี้ว่า bacteriophage SD1

การศึกษานี้ต้องการตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. dysenteriae* DMST15111 ซึ่งพบได้บ่อยในโรงพยาบาล ดังนั้นหากต้องการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบแบคทีเรียโอเฟจที่ต้องการ จึงได้นำน้ำที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาลเป็นน้ำตัวอย่างในการแยกแบคทีเรียโอเฟจ เพราะมีงานวิจัยกล่าวไว้ว่าแบคทีเรียโอเฟจ และแบคทีเรียที่จำเพาะต่อกันมักพบได้ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน เช่น ต้องการแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้ง น้ำตัวอย่างที่นำมาใช้แยกแบคทีเรียดังกล่าวก็ควรเป็นน้ำที่เก็บมาจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่เคยมีการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาก่อน (Phumkhachom and Rattanachaiakunsoopon, 2010: 1794)



ภาพที่ 1 inhibition zone (a) และ plaque (b) ที่เกิดขึ้นจากยับยั้งการเจริญของ *S. dysenteriae* DMST15111 โดย filtrate 2 ที่เตรียมได้จากน้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลประจำจังหวัด

การทดสอบความสามารถของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ โดยวิธี spot test พบว่า bacteriophage SD1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shigella* ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งได้แก่ *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* และ *S. sonnei* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ (ตารางที่ 1)

ในการทดลองนี้ แบคทีเรียโอเฟจที่แยกได้ (bacteriophage SD1) จัดเป็น *Shigella* specific bacteriophage คือเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ใน genus *Shigella* จากรายงานการวิจัย พบว่ามีแบคทีเรียโอเฟจหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น genus specific bacteriophage เช่น bacteriophage SAL-PG ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียใน genus *Salmonella* (Rahaman et al, 2014: 107) และ bacteriophage S25-3 ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียใน genus *Staphylococcus* (Takemura-Uchiyama et al., 2014: 1453)

ตารางที่ 1 ความสามารถของ bacteriophage SD1 ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น

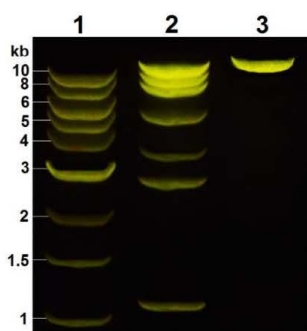
Bacteria	Inhibitory ability ^a
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC27736	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC19430	-
<i>Shigella boydii</i> DMST28180	+
<i>Shigella dysenteriae</i> DMST15111	+
<i>Shigella flexneri</i> DMST4423	+
<i>Shigella sonnei</i> DMST561	+

^a - = ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง; + = มีความสามารถในการยับยั้ง

การศึกษาสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ทำโดยใช้ชุดทดสอบ EZ.NA. M13 Miniprep kit สกัดเอาสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ออกมา แล้วนำไปตัดด้วย *Pst*I ซึ่งเป็น restriction enzyme ชนิดหนึ่ง เมื่อนำสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ที่ตัด และไม่ได้ตัดด้วย *Pst*I ไปวิเคราะห์โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ดังกล่าว (ภาพที่ 2)

การศึกษารูปร่างของ bacteriophage SD1 ด้วย transmission electron microscope (TEM) พบว่า bacteriophage SD1 เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหาง หรือ tailed bacteriophage โดยส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม (polyhedral) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 81.23 ± 6.41 และส่วนหางมีลักษณะเป็นยาว ยึดติดได้ มีขนาดความกว้างประมาณ 26.01 ± 2.73 และความยาวประมาณ 157.18 ± 14.24 (ภาพที่ 3)

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจตามเกณฑ์ของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) จำเป็นต้องใช้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของสารพันธุกรรม และรูปร่างของแบคทีริโอเฟจ จากการศึกษาพบว่าสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 สามารถถูกตัดได้ด้วย *Pst*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ที่ตัดได้เฉพาะสารพันธุกรรมประเภท double stranded DNA ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 เป็น double stranded DNA นอกจากนี้จากการศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วย transmission electron microscope พบว่า bacteriophage SD1 เป็นแบคทีริโอเฟจที่มีหาง (tailed bacteriophage) โดยหางมีลักษณะยาว ยึดติดได้ แบคทีริโอเฟจที่มีหาง (tailed bacteriophage) และมีสารพันธุกรรมเป็น double stranded DNA จะจัดอยู่ใน order *Caudovirales* (Ackermann, 2009: 127) ซึ่งใน order นี้ประกอบด้วย 3 family โดยแบ่งแยกตามรูปร่างของแบคทีริโอเฟจ เป็น family *Siphoviridae* (แบคทีริโอเฟจมีหางยาว และหางยึดติดไม่ได้) family *Myoviridae* (แบคทีริโอเฟจมีหางยาว และหางยึดติดได้) และ family *Podoviridae* (แบคทีริโอเฟจมีหางสั้น) จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage SD1 ไว้ใน family *Myoviridae* นอกเหนือจากแบคทีริโอเฟจที่แยกได้จากการศึกษาแล้ว ยังพบว่ามีแบคทีริโอเฟจที่อยู่ใน family อื่นที่จำเพาะต่อ *Shigella* ตัวอย่างเช่น bacteriophage pSF-1 (Jun et al, 2013: 979) ซึ่งอยู่ใน family *Siphoviridae* และ Pst-1 (Jun et al, 2014: 671) ซึ่งอยู่ใน family *Podoviridae*



ภาพที่ 2 agarose gel แสดงผลของการตัด phage DNA ด้วย restriction enzyme

- 1 = 1 kb DNA ladder (New England Biolabs)
- 2 = สารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ที่ตัดด้วย *Pst*I
- 3 = สารพันธุกรรมของ bacteriophage SD1 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ



ภาพที่ 3 รูปร่างของ bacteriophage SD1 จากการศึกษาด้วย TEM (Bar = 50 nm)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แยกแบคทีเรียฟาจที่จำเพาะต่อ *S. dysenteriae* ได้ 1 ชนิดจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากโรงพยาบาล โดยให้ชื่อว่า bacteriophage SD1 แบคทีเรียฟาจดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดในสกุล *Shigella* จากการศึกษารูปร่างและรูปร่างของแบคทีเรียฟาจ ทำให้สามารถจัดจำแนก bacteriophage SD1 ไว้ใน family *Myoviridae*

ข้อเสนอแนะ

แบคทีเรียฟาจที่ได้จากการศึกษานี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียใน genus *Shigella* ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ในการนำแบคทีเรียฟาจไปใช้เพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้แบคทีเรียฟาจเพียงชนิดเดียว ใช้แบคทีเรียฟาจหลายชนิดร่วมกัน (bacteriophage cocktail) หรือใช้แบคทีเรียฟาจร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี และข้อด้อยที่ต่างกัน ดังนั้นก่อนที่จะนำแบคทีเรียฟาจไปใช้จริงจึงอาจต้องทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายของแต่ละวิธี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้สนับสนุนสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และทุนอุดหนุนการวิจัยในการทำการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Ackermann, H.W. Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology*. 501(2009): 127-140.
 Characterization and complete genome sequence of a novel N4-like bacteriophage, pSb-1 infecting *Shigella boydii*.
Research in Microbiology. 165, 8(2014): 671-678.

- Faruque, S.M., et al. *Shigella dysenteriae* Type 1-Specific Bacteriophage from Environmental Waters in Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 12 (2003): 7028-7031.
- Jun, J. W, Characterization and complete genome sequence of the *Shigella* bacteriophage pSF-1. **Research in Microbiology**. 164, 10 (2013): 979-986.
- Lin, D.M., Koskella, B. and Lin, H.C. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**. 8, 3(2017): 162-173.
- Niyogi, S.K. Increasing antimicrobial resistance-an emerging problem in the treatment of shigellosis. **Clinical Microbiology and Infection**. 13, 12 (2007): 1141-1143.
- Phumkhachorn, P. and Rattanachaiksunopon, P. Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. **African Journal of Microbiology Research**. 4, 16(2010): 1794-1800.
- Puzari, M., Sharma, M. and Chetia, P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: a matter of concern. **Journal of Infection and Public Health**. 11, 4(2018): 451-454.
- Rahaman, M.T., Poultry *Salmonella* specific bacteriophage isolation and characterization. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**. 12, 2 (2014): 107-114.
- Soffer, N., Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods. **PLoS ONE**. 12, 3 (2017): e975256.
- Takemura-Uchiyama, I., Genomic and phylogenetic traits of *Staphylococcus* phages S25-3 and S25-4. **Annals of Microbiology**. 64, 3 (2014): 1453-1456.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวประพัชรา พรนิคม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555-2559 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ประวัติงานวิจัย	ประพัชรา พรนิคม, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร* การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>Shigella dysenteriae</i> จากน้ำเสียที่เก็บจากโรงพยาบาล (บรรยาย) ประพัชรา พรนิคม* พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร การแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>Shigella dysenteriae</i> จากน้ำเสียที่เก็บจากโรงพยาบาล (บรรยาย)
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2558 – ปัจจุบัน บริษัท ขอนแก่นบริวเวอรี่ จำกัด
ตำแหน่ง	เจ้าหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยา
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท ขอนแก่นบริวเวอรี่ จำกัด เลขที่ 333 ตำบลท่าพระ อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น โทรศัพท์ 043 346 567
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	เลขที่ 62 หมู่ที่ 5 บ้านอีเซ ตำบลอีเซ อำเภอโพธิ์ศรีสุวรรณ จังหวัดศรีสะเกษ 33120 Ampiw soda789@gmail.com, 0881151165