

ความแตกต่างในการสร้างเอนไซม์ β -Lactamase

ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

พรรณราย ปิบาลภักดี^{a,*}, พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์^a และ สุรัสกดิ์ วงศ์รัตนชีวิน^{b,c}

Differences in β -Lactamase Induction among *Burkholderia pseudomallei*

Phannarai Pibalpakdee^{a,*}, Pannika Ritvirool^a and Surasakdi Wongratanacheewin^{b,c}

^aภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

^bภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

^cศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

^bDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

^cMelioidosis Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

*Corresponding author. E-mail address: pibalpakdee_ph@hotmail.com (P. Pibalpakdee)

Received 30 April 2007; accepted 19 November 2007

The results of this paper were presented in part at The Third Naresuan University Research Conference, Phitsanulok, Thailand during 28-29 September 2007

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิสที่พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 16 ไอโซเลต แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 8 รายในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่นด้วยเทคนิค pulsed field gel electrophoresis (PFGE) พบว่ามีความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย และมีการติดเชื้อแบบ multiple infection ในผู้ป่วยจำนวน 2 ราย เมื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อด้วยวิธี disk diffusion test และ MIC พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อยา cefepime แต่ยังคงไวต่อยา ceftazidime และ imipenem ซึ่งเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเมลิออยโดสิส จากการศึกษา β -lactamase expression โดยมีการเหนี่ยวนำเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการรักษา 2 ชนิด คือ ceftazidime และ imipenem ที่ระดับความเข้มข้น sub-MIC level คือ 1 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่ามีเชื้อร้อยละ 37 (6 จาก 16 ไอโซเลต) ที่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -lactamase เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย imipenem แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย ceftazidime ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *Burkholderia thailandensis* ที่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -lactamase เพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด สิ่งที่น่าสนใจ คือ พบเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนเดียวกันมีการแสดงออกของเอนไซม์ β -lactamase ทั้งแบบ inducible และ non-inducible ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* รวมทั้งความแตกต่างระหว่างแต่ละไอโซเลตของเชื้อ *B. pseudomallei* เอง ซึ่งมีความสำคัญต่อการศึกษากลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อ *Burkholderia pseudomallei*; พัลส์ฟิลด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส; เอนไซม์เบต้าแลคแทมเมส; การติดเชื้อร่วมกันจากหลายสายพันธุ์

Abstract

Melioidosis is a severe infection caused by the Gram-negative bacillus, *Burkholderia pseudomallei*, an environmental saprophyte commonly found in Southeast Asia and Northern Australia. Here, we study the diversity of 16 clinical isolates from 8 melioidosis patients who were treated at Srinagarind Hospital in Konkaen, Northeast Thailand. Pulsed-field gel electrophoresis was performed on all isolates followed by antimicrobial susceptibility testings (disk susceptibility test and MIC) and β -lactamase expression. Multiple infections were detected in 2 patients. Most of the isolates are resistant to cefepime. However, all isolates remained susceptible to ceftazidime and imipenem, which are the antibiotics of choice for the treatment of severe melioidosis. Induction study was performed with ceftazidime and imipenem as inducers at sub-MIC level (1 $\mu\text{g/ml}$ ceftazidime and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ imipenem). Overall, specific activity of β -lactamase in 6 of 16 isolates (37%) was increased by 2-3 folds by imipenem induction but remained unchanged after ceftazidime induction. In contrast, β -lactamase activity of *Burkholderia thailandensis* was increased by 3 folds following induction with

either ceftazidime or imipenem. Interestingly, the isolates from the same patient showed either β -lactamase inducible or non-inducible phenotypes. These results suggested that β -lactamase expression in *B. pseudomallei* is different from that in *B. thailandensis* and varies from isolate to isolate. This finding has important implications for the regulation mechanism of β -lactamase expression in *B. pseudomallei*.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; Pulsed field gel electrophoresis; β -Lactamase; Multiple infection

บทนำ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่พบได้ทั่วไปในบริเวณดินและน้ำของประเทศในแถบร้อนชื้น โดยเฉพาะประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อได้ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะพื้นที่ทำการเกษตร (Dharakul & Songsivilai, 1998) เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคmelioidosis ในประเทศไทยพบผู้ป่วยมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือโดยเฉพาะในฤดูฝน โดยอาการของโรคmelioidosisพบได้ทุกระบบของร่างกาย และมีอาการแสดงของโรคได้หลายรูปแบบตั้งแต่แบบเรื้อรังและเฉียบพลัน มีการศึกษาโดยวิธีทางลักษณะทางพันธุกรรม (molecular genotyping) จากการทำ genomic macrorestriction fingerprinting ด้วยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *B. pseudomallei* (Koonpaew et al., 2000) หรือใช้ในการติดตามประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค เชื้อ *B. pseudomallei* จัดเป็นเชื้อที่มีความดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ (intrinsically resistance) จำพวก ampicillin และ cefuroxime โดยการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายยาปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins เช่น cephalothin และ cefuroxime ได้ (Livermore et al., 1987) มีรายงานพบว่า การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ β -lactamase ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการดื้อยาในระหว่างการรักษาโรคmelioidosis ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว (Godfrey et al., 1991; Tribuddharat et al., 2003) นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้จะทำให้เชื้อมีคุณสมบัติที่ดื้อยาสูงขึ้น โดยเฉพาะ ceftazidime ซึ่งเป็นยามาตรฐานในการรักษาผู้ป่วยโรคmelioidosis (Niumsups & Wutheikanun, 2002) ซึ่งถ้าหากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น หรือ มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อาจส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยเป็นไปได้ยาก และอัตราการเสียชีวิตจากโรคดังกล่าวจะยิ่งสูงขึ้น

เชื้อ *Burkholderia thailandensis* เป็นเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *B. pseudomallei* มาก แตกต่างกันเพียงคุณสมบัติการใช้น้ำตาล โดยเชื้อ *B. thailandensis* สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ แต่เชื้อ *B. pseudomallei* ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose ได้ และยังมีความแตกต่างในการก่อให้เกิดโรค คือ *B. thailandensis* พบมากในดิน และมีความสามารถในการก่อโรคต่ำ แต่ *B. pseudomallei* พบได้ทั้งที่อยู่ในดินและแยกได้จากผู้ป่วย และมีความสามารถในการก่อโรคสูง (Cheng & Currie, 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี PFGE รวมทั้งศึกษาความแตกต่างกันของเอนไซม์ β -lactamase ที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น เพื่อมุ่งเน้นสู่การศึกษากลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป โดยเฉพาะในประเทศไทยยังคงมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์และเชื้อน้อยมาก ทั้งที่ไทยเป็นประเทศหนึ่งที่พบการติดเชื้อจาก *B. pseudomallei* มากที่สุดในโลก (เพลินจันทร์, 2547) ดังนั้น การศึกษาถึงคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะช่วยให้สามารถอธิบายถึงการดื้อยาของตัวเชื้อ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันการเกิดการดื้อยาได้ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *B. pseudomallei* 16 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 8 รายในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

จังหวัดขอนแก่น ในระหว่างเดือนตุลาคม ค.ศ. 2005 – เดือนเมษายน ค.ศ. 2006 โดยแยกเชื้อได้จากตัวอย่างเลือด เสมหะ หนอง หรือสิ่งส่งตรวจอื่นๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยต่อยาปฏิชีวนะ

Patient no.	Isolate	Specimen	Date ^a	Disk susceptibility test ^b	MIC ^c (μg/ml)
				CAZ, CRO, IPM, FEP, CTX	CAZ, CRO, IPM, FEP, Cf
1	CKKU 1	blood	25-10-2005	S, S, S, I, S	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 2	blood	25-10-2005	S, S, S, R, S	2, 8, 1, 32, >256
2	CKKU 3	blood	21-11-2005	S, S, S, I, S	2, 8, 2, 32, >256
3	CKKU 4	blood	21-11-2005	S, S, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 5	blood	30-10-2005	S, S, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 6	sputum	01-11-2005	S, I, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 7	sputum	01-11-2005	S, I, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
4	CKKU 8	blood	05-11-2005	S, S, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
5	CKKU 9	pus	01-11-2005	S, S, S, R, I	2, 8, 2, 32, >256
6	CKKU 12	pus	29-03-2006	S, S, S, R, I	2, 8, 2, 16, >256
7	CKKU 13	sputum	21-03-2006	S, S, S, R, I	2, 8, 2, 32, >256
8	CKKU 14	others	29-03-2006	S, I, S, R, I	2, 16, 1, 32, >256
	CKKU 15	others	30-03-2006	S, I, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 16	others	01-04-2006	S, I, S, R, I	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 17	pus	04-04-2006	S, I, S, R, S	2, 8, 2, 32, >256
	CKKU 18	others	-	S, I, S, R, S	2, 16, 2, 32, >256
<i>B. thailandensis</i>		-	-	S, I, S, R, I	2, 8, 1, 16, >256

^a เวลาที่ทำการเก็บสิ่งส่งตรวจ

- : ไม่มีข้อมูล

^b ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disk susceptibility test: S = susceptible; I = intermediate; R = resistant.

^c ผลการทดสอบ minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี standard agar dilution method

Antibiotic abbreviations: CAZ, cetazidime; Cf, cephalothin; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; IPM, imipenem

การศึกษาความหลากหลายของเชื้อโดยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

เป็นเทคนิคสำหรับการแยกดีเอ็นเอโมเลกุลขนาดใหญ่โดยไม่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Maharjan et al. (2005) เตรียม plug ซึ่งผสมระหว่าง suspension ของเชื้อ (ใน 1M NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) และ 2% low melting point agarose (BioRad Laboratories, CA, USA) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นตัดย่อย chromosomal DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI (Fermentas Inc., MD, USA) (37 °C, 16 ชั่วโมง) เตรียม plug ลงใน 1% pulsed field certified agarose gel (Ultrapure; BioRad Laboratories, CA, USA) แยกแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง CHEF MAPPER™ (BioRad Laboratories, CA, USA) ที่อุณหภูมิ 14 °C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลมาข้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที แล้วตรวจผลด้วยเครื่องถ่ายภาพ Gel Documentation (BioRad 2000, CA, USA) จากนั้นจึงพิจารณาารูปแบบของแถบดีเอ็นเอตามหลักการ Tenover et al. (1995)

การศึกษาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disk diffusion test และ minimum inhibitory concentration (MIC)

ทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยวิธี disk diffusion test ซึ่งเป็นวิธีสำหรับทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ การรายงานผลสามารถบอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อยาในระดับใด

และศึกษาค่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ด้วยเทคนิค standard agar dilution method จากนั้นจึงแปลผลเปรียบเทียบกับมาตรฐานที่กำหนดไว้ตามหลักการของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2005)

การศึกษาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase (β -lactamase expression)

ศึกษาการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อตามวิธีการของ Godfrey et al. (1991) โดยทำการเลี้ยงเชื้อให้อยู่ใน mid-log phase และ เหนี่ยวนำด้วย 1 $\mu\text{g/ml}$ ceftazidime หรือ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ imipenem ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ระดับ sub-MIC level เป็นเวลา 40-60 นาที ก่อนทำการสกัดเอนไซม์ด้วย B-PER[®] bacterial protein extraction reagent (Pierce, ID, U.S.A.) ก่อนทำการเก็บสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วน supernatant ออกจากตะกอนเซลล์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C หรือทดสอบขึ้นตอนต่อไป

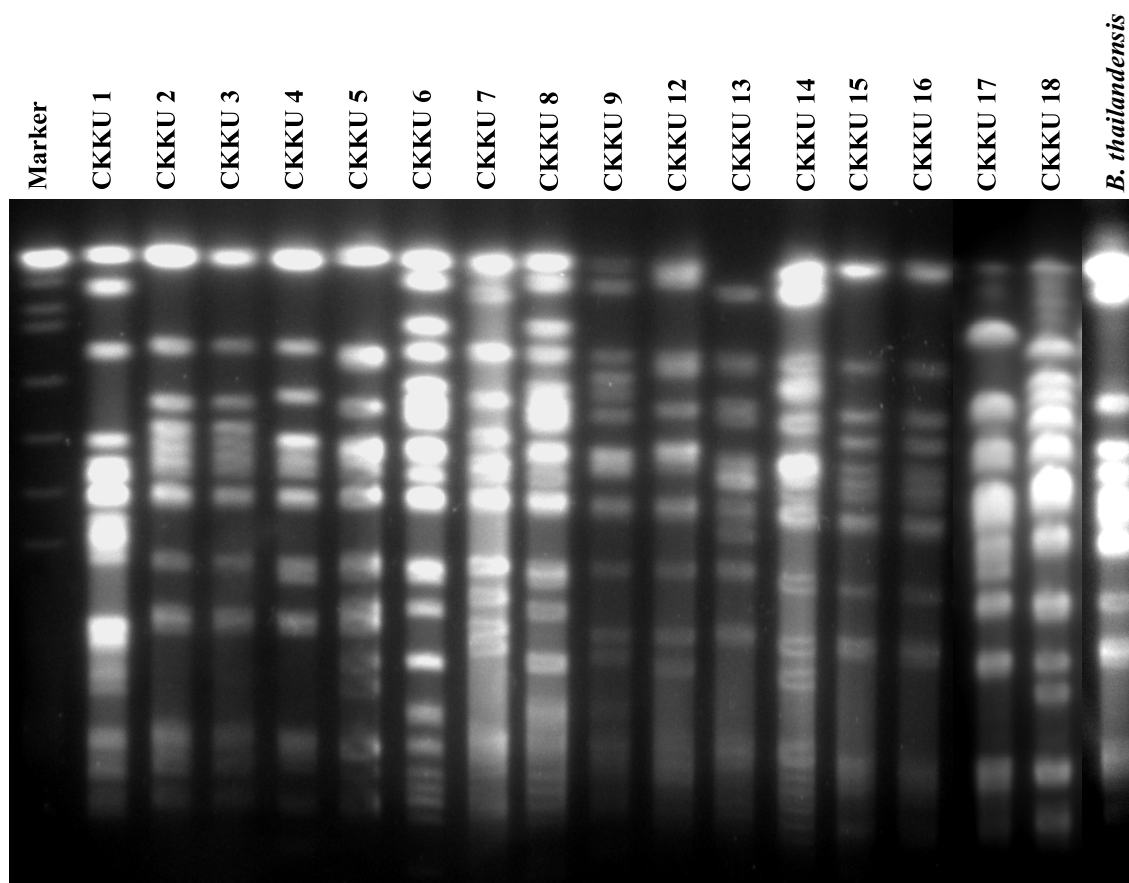
การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ β -lactamase (β -lactamase activity assay)

การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ทำได้โดยการตรวจวัดการสลายตัวของ nitrocefin โดยวิธีการของ Juan et al. (2005) โดยเตรียม nitrocefin ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ทำการตรวจวัดการสลายตัวของ nitrocefin ภายใน 2 นาที โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Spectronic GENESYS 5, Milton Roy) ความยาวคลื่นที่เหมาะสมคือ 482 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ จากนั้นหาความเข้มข้นโปรตีนภายในสารสกัดหยาบโดยใช้ Bio-Rad protein assay ซึ่งอาศัยหลักการของ Lowry et al. (1951) ซึ่งมี bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน แล้วจึงคำนวณหาค่า specific activity ของเอนไซม์ β -lactamase จากสูตร ค่า specific activity ของเอนไซม์ β -lactamase = ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์/ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบ

ผลการศึกษา

การศึกษาความหลากหลายของเชื้อโดยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 16 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคmelioidosis จำนวน 8 ราย ในวันและเวลาแตกต่างกันด้วยวิธี PFGE เปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI ผลการศึกษาพบว่า เชื้อมีความหลากหลาย เกิดรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ ดังภาพที่ 1 เมื่อใช้หลักเกณฑ์การวิเคราะห์ตามหลักการของ Tenover et al. (1995) สามารถบอกความแตกต่างของเชื้อและความใกล้เคียงแต่ละไอโซเลตได้ว่า มีรูปแบบลักษณะทางพันธุกรรมหรือแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างน้อยเพียงใด ตัวอย่างเช่น เชื้อ CKKU2 กับ CKKU3 หรือ CKKU9 กับ CKKU12 หรือ CKKU15 กับ CKKU16 มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน แต่ในทางตรงกันข้าม บางกรณีพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยรายเดียวกันในวันเดียวกันนั้น มีความแตกต่างกันของรูปแบบแถบดีเอ็นเอ ดังเช่น ในผู้ป่วยรายที่ 1 และรายที่ 3 ไอโซเลต CKKU1/CKKU2 และ CKKU6/CKKU7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ รวมทั้งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยไม่ได้รับการติดเชื้อจากเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียว และเมื่อพิจารณาทำการติดตามเก็บสิ่งส่งตรวจและแยกเชื้อเป็นระยะ พบการติดเชื้อจากเชื้อต่างสายพันธุ์ร่วมกันในผู้ป่วยรายเดียวกัน ตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยรายที่ 3 (CKKU4-7) และรายที่ 8 พบเชื้อ 5 ไอโซเลต (CKKU 14-18) ที่แยกได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบกรณีที่เชื้อบางไอโซเลตจากผู้ป่วยคนละคนมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน เช่น CKKU2/CKKU3 และ CKKU6/CKKU8 อีกด้วย



ภาพที่ 1 PFGE profile ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*; marker: *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA

การศึกษาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disk diffusion test และ MIC

จากการทดสอบความไวของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด เมื่อทำการวัดขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้นแล้วนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ CLSI (2005) ผลปรากฏว่าเชื้อส่วนใหญ่มีความไวต่อยาแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน พบว่า เชื้อดื้อต่อยา ampicillin และ cefoxitin แต่มีเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ meropenem และ ivermectin+tazobactam (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ส่วนยาในกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 ได้แก่ cefotaxime, ceftazidime และ ceftriaxone พบว่า เชื้อบางสายพันธุ์ไวต่อยา (susceptible) หรือไวในระดับกลาง (intermediate) นอกจากนี้ เชื้อบางสายพันธุ์ดื้อต่อยา cefepime แต่ยังคงมีความไวต่อยา ceftazidime และ imipenem (ตารางที่ 1) และผลการศึกษาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะพบว่า เชื้อที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในระดับมีความไวต่อยา (susceptible) หรือไวต่อยาระดับกลาง (intermediate) เช่น cefotaxime, aztreonam, meropenem และ ciprofloxacin เป็นต้น (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เชื้อทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา cephalothin (MIC = >256 µg/ml), ampicillin (MIC = 64, 128 µg/ml) และ oxacillin (MIC = 64, 128 µg/ml) นอกจากนี้เชื้อยังดื้อต่อยา cefepime (MIC = 16, 32 µg/ml) ซึ่งเป็น cephalosporin รุ่นที่ 4 อีกด้วย แสดงรายละเอียดด้วยที่สำคัญดังตารางที่ 1

การศึกษา β -lactamase expression

จากการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อทั้ง 16 ไอโซเลต จากการติดตามด้วยการย่อยสลายของ nitrocefin ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ใช้ทั่วไป และรู้จักกันดีว่าเป็นสับสเตรตของเอนไซม์ β -lactamase ในการศึกษาครั้งนี้เลือกยาปฏิชีวนะสองชนิดในการเหนี่ยวนำ (induce) การสร้างเอนไซม์ β -lactamase คือ imipenem ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่เป็นที่ทราบดีว่าเป็นสารเหนี่ยวนำ (inducer) ที่ดีต่อการสร้างเอนไซม์ β -lactamase และ ceftazidime

ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับรักษาโรคจากการติดเชื้อดังกล่าว พบว่า เชื้อทั้งหมดที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการย่อย nitrocefin โดยพบว่า มีเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลตที่เมื่อถูกเหนี่ยวนำ ด้วย imipenem แล้วมีค่า specific activity สูงขึ้น 2-3 เท่า คือ CKKU3, CKKU4, CKKU8, CKKU13, CKKU17 และ CKKU18 (ตารางที่ 2) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า specific activity เมื่อเชื้อถูกเหนี่ยวนำด้วย ceftazidime ตรงกันข้ามกับเชื้อ *B. thailandensis* ที่มีค่า specific activity สูงขึ้นเกือบ 3 เท่าเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยยาทั้งสองชนิด

ตารางที่ 2 ค่า specific activity ของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ต่อ nitrocefin

Bacterial Strains	Specific activity ^a		
	(μmole substrate hydrolysed/min/mg protein)		
	No inducer	CAZ (1 μg/ml)	IPM (0.25 μg/ml)
<i>B. thailandensis</i>	237.74	672.70*	644.10*
<i>B. pseudomallei</i>			
CKKU 1	316.10	366.12	444.51
CKKU 2	342.90	229.84	442.86
CKKU 3	157.54	184.66	356.42*
CKKU 4	216.36	198.35	390.27*
CKKU 5	332.94	276.72	348.32
CKKU 6	212.63	185.11	157.62
CKKU 7	169.29	168.88	152.16
CKKU 8	91.52	142.18	280.31*
CKKU 9	148.12	106.65	105.78
CKKU 12	93.24	132.67	117.41
CKKU 13	80.90	76.01	175.62*
CKKU 14	96.12	155.74	102.47
CKKU 15	157.54	77.38	122.56
CKKU 16	193.10	144.93	276.70
CKKU 17	134.83	170.15	566.67*
CKKU 18	154.56	157.72	520.17*

^a การหาค่า specific activity n = 3

* ไอโซเลตที่มีค่า specific activity ของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ต่อ nitrocefin เพิ่มขึ้นเป็น 2 หรือ 3 เท่า

Antibiotic abbreviations: CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem

อภิปรายผลการศึกษา

เทคนิค pulsed field gel electrophoresis (PFGE) เป็นวิธีที่ถูกใช้อย่างกว้างขวาง และเป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่พบในผู้ป่วยโรคmelioidosis ถึง 8 รายนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และพบว่าในบางกรณีผู้ป่วยหนึ่งคนมีการติดเชื้อร่วมกันจากเชื้อหลายสายพันธุ์ (multiple infection) ในบางไอโซเลตมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกันแต่มาจากคนไข้คนละคน ลักษณะต่างๆ ดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่พบในแถบจังหวัดขอนแก่นหรือบริเวณใกล้เคียง เมื่อศึกษาถึงความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion test และหาค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) พบว่า เชื้อที่นำมาทดสอบยังคงอยู่ในระดับไวต่อยา และ/หรือ ไวต่อยาระดับปานกลาง เชื้อส่วนใหญ่ติดต่อยา cefepime ซึ่งจัดเป็น cephalosporin รุ่นที่ 4 อย่างไรก็ดีปัจจุบันพบว่า มีอุบัติการณ์การติดต่อยากลุ่ม β-lactam ของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น กลไกหนึ่ง

ที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ คือ การสร้างเอนไซม์ β -lactamase ออกมาทำลายโครงสร้างของยาปฏิชีวนะ ดังนั้น จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ควรจะต้องเข้าใจถึงกลไกหรือการควบคุมการสร้างเอนไซม์ของเชื้อให้มากที่สุด จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคmelioidosis 2 ชนิด เป็น inducer ในการสร้างเอนไซม์ β -lactamase เพื่อดูแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ จากการศึกษาพบว่า เชื้อทุกไอโซเลตที่นำมาทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ β -lactamase ได้ มีเชื้อร้อยละ 37 (6 จาก 16 ไอโซเลต) ที่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -lactamase เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า (inducible) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย imipenem ซึ่งเป็น inducer สำหรับการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่ดีและรู้จักอย่างกว้างขวาง แต่ไม่พบไอโซเลตใดที่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -lactamase เพิ่มขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย ceftazidime (non-inducible) ซึ่งถือว่าเป็นผลดี เนื่องจาก ceftazidime เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกใช้เป็นมาตรฐานสำหรับรักษาโรคmelioidosis (White et al., 1989) หากยาที่ใช้ในการรักษามีผลทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ออกมาได้มากขึ้นก็อาจก่อให้เกิดปัญหาตามมาในอนาคต สิ่งที่น่าสนใจ คือ ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบบ multiple infection นั้น พบว่า การสร้างเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อมีทั้งแบบ inducible และ non-inducible และจากผลของ β -lactamase expression ซึ่งต่างออกไปของเชื้อ *B. thailandensis* ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำได้จากยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด จึงเป็นการแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการสร้างหรือตอบสนองต่อการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ที่นอกจากจะมีความต่างกันของเชื้อแต่ละไอโซเลตภายในสายพันธุ์เองแล้ว ยังพบความแตกต่างของระหว่างสายพันธุ์กับเชื้อ *B. thailandensis* ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อ *B. pseudomallei* มากที่สุดอีกด้วย ผลจากการศึกษาครั้งนี้ จึงนำไปสู่การศึกษาในด้านการควบคุมการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษา แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่พบในผู้ป่วยโรคmelioidosis และพบว่าการติดเชื้อร่วมแบบ multiple infection อีกด้วย เชื้อทุกไอโซเลตดื้อยา ampicillin แต่ยังคงมีความไวต่อยา ceftazidime และ imipenem ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคmelioidosis การแสดงออกของเอนไซม์ β -lactamase ใน *B. pseudomallei* มีความแตกต่างกัน มีทั้งแบบ inducible และ non-inducible โดยถ้าเป็นแบบ inducible นั้น จะเกิดขึ้นเมื่อใช้ imipenem เป็น inducer เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจาก *B. thailandensis* ซึ่งมีการแสดงออกของเอนไซม์ β -lactamase แบบ inducible เมื่อใช้ cetazidime หรือ imipenem เป็น inducer

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์วิจัยโรคmelioidosis คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์โรคmelioidosis ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และหน่วยวิจัยใช้หวัดนก สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้อนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- เพลินจันท์ เซษฐโชติศักดิ์. (2547). โรคmelioidosis. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง.
- Cheng, A. C., & Currie, B. J. (2005). Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 383-416.

- Clinical and Laboratory Standards Institute*. (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. M100-S15.
- Dharakul, T., & Songsivilai, S. (1999). The many facets of melioidosis. *Trends in Microbiology*, 7, 138-140.
- Godfrey, A. J., Wong, S., Dance, D. A., Chaowagul, W., & Bryan, L. E. (1991). *Pseudomonas pseudomallei* resistance to β -lactam antibiotics due to alterations in the chromosomally encoded β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 1635-1640.
- Juan, C., Maciá, M. D., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4733-4738.
- Koonpaew, S., Ubol, M. N., Sirisinha, S., White, N. J., & Chaiyaroj, S. C. (2000). Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with melioidosis in Thailand. *Acta Tropica*, 74, 187-191.
- Livermore, D. M., Chau, P. Y., Wong, A. I., & Leung, Y. K. (1987). β -Lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20, 313-321.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maharjan, B., Chantratita, N., Vesaratchave, M., Cheng, A., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., et al. (2005). Recurrent melioidosis in patients in Northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 6032-6034.
- Niumsup, P., & Wuthiekanun, V. (2002). Cloning of the class D β -Lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 445-455.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2233-2239.
- Tribuddharat, C., Moore, R. A., Baker, P., & Woods, D. E. (2003). *Burkholderia pseudomallei* class A β -lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2082-2087.
- White, N. J., Dance, D. A., Chaowagul, W., Wattanagoon, Y., Wuthiekanun, V., & Pitakwatchara, N. (1989). Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet*, 2, 697-701.