อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยา ของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ

โดย ผศ. ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์

5 สิงหาคม พ.ศ. 2556

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 12 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1679419
เลขเรียกหนังสือ QR
201
.A16
ส๗๖ร
๒๕๖

สัญญาเลขที่ R2555C085

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นายธวัชชัย กิตติ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Executive Summary	3
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ (Introduction)	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and Method)	30
ผลการวิจัย (Result)	35
ข้อวิจารณ์ (Discussion)	49
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	53
เอกสารอ้างอิง (References)	55
กิตติกรรมประกาศ	64
Output ที่ได้จากโครงการ	65
ภาคผนวก	66

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 การศึกษาแบคทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ในปัจจุบัน	28
ตารางที่ 2 Phages isolated against *Acinetobacter baumannii* and theirs properties	45
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ phage genomic DNA บางส่วน	46

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

รูปที่ 1 แสดงรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ 16

รูปที่ 2 แสดงรูปร่างลักษณะ order และ families ของการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ 17

รูปที่ 3 แสดงวงจรชีวิตแบบไลติคเฟจ 20

รูปที่ 4 แสดงวงจรชีวิตแบบไลโสจีนิคเฟจ 22

รูปที่ 5 The appearance of plaques on a bacterial lawn formed by three *A. baumannii* bacteriophages. 39

รูปที่ 6 Electron micrograph of *A. baumannii* bacteriophages 39

รูปที่ 7 Lytic activity of *A. baumannii* phages 40

รูปที่ 8 One step growth of ØABP-01 , ØABP-02 and ØABP-04 bacteriophages 41

รูปที่ 9 SDS-PAGE analysis of A. baumannii bacteriophages and Amplification of endolysin gene from *A. baumannii* bacteriophages 42

รูปที่ 10 Restriction pattern of A. baumannii bacteriophages 43

รูปที่ 11 Plasmid pBluscript containg phage genomic DNA clone cut with HindIII . 44

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาล ปัจจุบันมีรายงานทั่วโลกพบว่า *A. baumannii* มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด แบคเทอริโอเฟจจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการติดเชื้อและรักษาเชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ที่ดื้อยา แบคเทอริโอฟาจเป็นไวรัสของแบคทีเรียซึ่งมีความสัมพันธ์กับวิวัฒนาการของแบคทีเรีย โดยเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของยีนในแบคทีเรีย งานวิจัยนี้ได้คัดเลือก ØABP-01 ØABP-02 และ ØABP-04 มาใช้ในการศึกษาทางอณูชีววิทยา จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน ØABP-01จัดอยู่ในแฟมิลี่ *Podoviridae* ส่วน ØABP-02 และ ØABP-04 จัดอยู่ในแฟมิลี่ Myoviridae การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจทั้งสามพบอยู่ในช่วง 50 - 70 °C ØABP-02 และ ØABP-04 ทนต่อกรดด่างที่ pH 4.0 - 9.0 ส่วน ØABP-01ทนต่อกรดด่างที่ pH 5.0 - 9.0 แบคเทอริโอเฟจทั้งสามสามารถเกาะติดโฮลท์เซล 95 % ภายในเวลา 8 นาที One-step growth ของ ØABP-01, ØABP-02 และ ØABP-04 เท่ากับ15, 20 และ 20 นาทีตามลำดับ ส่วน burst sizes เท่ากับ 110, 120 and 150 PFU/cell ตามลำดับ การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้งสามมีความแตกต่างกันของรูปแบบโปรตีนทั้งส่วนแบนหลักและแบนรอง ส่วนการศึกษารูปแบบการถูกตัดด้วย restriction enzyme ของแบคเทอริโอเฟจ DNA โดยใช้ เอ็นไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sph*I, *Bam*HI และ *Sma*I ก็พบรูปแบบที่แตกต่างกัน การตรวจหา endolysin ขนาด 558 bp พบใน ØABP-01 และ ØABP-04 โดย endolysin gene ของ ØABP-01 ได้ถูกนำมาโคลนใน pBluescript และวิเคราะห์ผลพบว่ายีนมีขนาด 558 ย ทำนาย molecular weight ได้ 21.14 kDa (185 amino acid) และมีค่า pI เท่ากับ 9.42 โดยแบคเทอริโอฟาจ ØABP-01 จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นตัวเลือกในการศึกษาเพื่อควบคุม การติดเชื้อ *A. baumannii* ที่มีการดื้อต่อยาต่อไป

Abstract

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen that exists widely in hospital environments. The emergence of multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) has been reported worldwide. Therefore, it is necessary to find a novel and effective treatment for MDRAB infection. In this study bacteriophages, designed as ØABP-01, ØABP-02, and ØABP-04 were selected for molecular characterization. Transmission electron microscopy revealed that bacteriophage ØABP-01 belonged to the Podoviridae family and bacteriophage ØABP-02 and ØABP-04 were classified into the family Myoviridae. Thermal stability test showed that all bacteriophages survived at 50 - 70 oC. ØABP-02 and ØABP-04, were stable to the wide range of pH4.0 - 9.0. and ØABP-01remained stable at pH5.0 - 9.0. All bacteriophage showed 95% adsorbed to the host cells within 8 minutes. One-step growth of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 exhibited that the latent period were 15, 20 and 20 minutes and the burst sizes were 110, 120 and 150 PFU/cell respectively. Protein analysis using SDS-PAGE revealed variation in major and minor bands of bacteriophage proteins. DNA restriction analysis of three bacteriophages cutting with *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Sph*I, *Bam*HI and *Sma*I showed different DNA patterns. PCR product with 558 bp of endolysin gene (*lys*) was presented in ØABP-01 and ØABP-04 . The endolysin gene of ØABP-01 was subsequently cloned in pBluescript vector and sequenced. Sequence analysis revealed an open reading frame of 558 bp with a predicted molecular weight of 21.14 kDa(185 amino acid) and a deduced pI of 9.42. Bacteriophage ØABP-01from this study could be used as a candidate for studying to control MDRAB infections

ข้อมูลสรุปสำหรับผู้บริหาร(Executive Summary)

แบคเทอริโอฟาจ เป็นไวรัสของแบคทีเรียที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม ในปัจจุปันปัญหาสำคัญในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือการเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด(multi drug resistance bacteria (MDR-bacteria) **การระบาดของ** MDR-bacteria **พบได้ทั่วโลก ซึ่งเป็นปัญหา**ทางสุขภาพที่สำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเกิดสายพันธ์ที่ดื้อยาได้ ทำให้มีการหาทางเลือกใหม่และวิธีที่ช่วยในการรักษาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาโดยใช้แบคเทอริโอฟาจ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรีย Gram negative พบเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่พบได้บ่อย ปัจจุปันอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาล เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และยังพบว่า เชื้อ *A. baumannii* มักดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug-resistant A. baumannii; MDR-AB) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems ซึ่งส่งผลให้การเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีความซับซ้อนมากขึ้น โครงงานวิจัยนี้กลุ่มผู้วิจัยเป้าหมายในการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อจาก *A. baumannii* เนื่องจากในการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อจาก *A. baumannii* จำเป็นต้องมีข้อมูลทางชีววิทยาและอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจโดยเฉพาะข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของแบคเทอริโอฟาจ เนื่องจาก *A. baumannii* เป็นเชื้อดื้อยาชนิดใหม่ที่เพิ่งเริ่มมีการระบาดปัจจุปันข้อมูลเกี่ยวกับแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อเชื้อ A. baumannii ยังมีน้อยแม้จะมีรายงานการแยกแบคเทอริโอฟาจ จากเชื้อ A. baumannii ได้ครั้งแรกในประเทศไต้หวันในต้นปี 2553 (Lin et al., 2010) แต่คุณสมบัติของ แบคเทอริโอฟาจที่แยกได้ยังไม่มีความหลากหลายในการทำลายเชื้อ *A. baumannii* (narrow host range) **และเนื่องจากมีความแตกต่างของสายพันธ์** *A. baumannii* **ในแต่ละพื้นที่ ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นโครงงานวิจัยต่อเนื่องที่ต้องการศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ**

(bacteriophage) ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยและแยกได้จากน้ำเสียในบ่อบำบัดของโรงพยาบาลในจังหวัดพิษณุโลก โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายระยะยาวในการคัดเลือก phage เพื่อนำมาใช้ เป็น phage suspension หรือคัดหาโปรตีนที่สร้างโดยแบคเทอริโอฟาจที่สามารถย่อยเซลแบคทีเรียเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อที่แผลต่อไป โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ 3 สายพันธ์เพื่อคัดเลือกหาแบคเทอริโอฟาจที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจวินิจฉัยและรักษาเชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ที่ดื้อยาต่อไปโดยการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย

1.ศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจได้แก่ lytic activity แบคเทอริโอฟาจ 3 สายพันธ์

2. ศึกษารูปร่างของ อซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 3 สายพันธ์

3. ศึกษาลักษณะโปรตีนของแบคเทอริโอแบคเทอริโอฟาจ 3 สายพันธ์ (Analysis of phage protein) โดยวิธี SDS-PAGE

4. ศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอของ อซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจโดยการตัดด้วย restriction enzyme ของ อซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจก 1 สายพันธ์และการโคลนชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดใน vector pBluescriptและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมบางส่วนของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ

<u>5. ผลการวิจัย</u>

- จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ ØABP-01 ØABP-02 และ ØABP-04 พบว่า ØABP-01จัดอยู่ในแฟมิลี่ Podoviridae ส่วน ØABP-02 และ ØABP-04 จัดอยู่ในแฟมิลี่ Myoviridae
- การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจทั้งสามพบอยู่ในช่วง 50 - 70 $^{\circ}$C ØABP-02 และ ØABP-04 ทนต่อกรดด่างที่ pH 4.0 - 9.0 ส่วน ØABP-01ทนต่อกรดด่างที่ pH 5.0 - 9.0 แบคเทอริโอเฟจทั้งสามสามารถเกาะติดโฮลท์เซล 95 % ภายในเวลา 8 นาที One-step growth ของ ØABP-

01, ØABP-02 และ ØABP-04 เท่ากับ15, 20 และ 20 นาทีตามลำดับ ส่วน burst sizes เท่ากับ 110, 120 and 150 PFU/cell ตามลำดับ

- การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ รูปแบบการถูกตัดด้วย restriction enzyme พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้งสามมีความแตกต่างกัน
- การตรวจหา endolysin ขนาด 558 bp พบเฉพาะใน ØABP-01 และ ØABP-04 โดย endolysin gene มีความคล้ายคลึงกับ แบคเทอริโอเฟจ phiAB1 และ phiAB2
- การโคลนจีโนมของ ØABP-01ในเวกเตอร์ pBluescript และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของจีโนมของ ØABP-01 พบมีความคล้ายคลึงกับจีโนมของแบคเทอริโอเฟจ Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 และ Acinetobacter phage AB3

4. Outline of study plan (แผนการดำเนินงานวิจัย)

กิจกรรมวิจัย	เดือนที่ 1-2	เดือนที่ 3-4	เดือนที่ 5-6	เดือนที่ 7-8	เดือนที่ 9-10	เดือนที่ 11-12
1.เตรียมวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย	← →					
2.การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและศึกษาลักษณะโปรตีนของแบคเทอริโอแบคเทอริโอฟาจ	←	→				
3.การศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอของ อซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานีไอ แบคเทอริโอฟาจและการโคลนชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดใน vector pBluescript						
4.การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานีไอ แบคเทอริโอฟาจ						
5. วิเคราะห์ข้อมูล เตรียมเขียนผลงานสำหรับนำเสนอในการประชุมทางวิชาการ						

บทนำ (Introduction)

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

Phage therapy เป็นวิธีการที่นำแบคเทอริโอฟาจ หรือผลิตภัณฑ์ของ แบคเทอริโอฟาจ มาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในคน (review ใน Krylov, 2001, Matsuzaki et al., 2005, Hanlon, 2007) โดยเมื่อแบคเทอริโอฟาจเข้าไปในแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวน ในเซลล์แบคทีเรียและปลดปล่อยไวรัสลูกหลานออกมาโดยทำให้เซลแบคทีเรียแตก พบว่าการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ในการรักษาเป็นวิธีที่ค่อนข้างปลอดภัย เนื่องจากไม่เป็นพิษต่อ eukaryote อย่างไรก็ตามในยุคที่การพัฒนาของยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพ ร่วมกับการขาดข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจทำให้ความสนใจในการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ประโยชน์มีน้อย ยกเว้นในบางประเทศ เช่น รัสเซีย โปแลนด์ และฝรั่งเศส ที่มีการใช้ แบคเทอริโอฟาจในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียมาเป็นระยะเวลานาน ปัจจุบันปัญหาสำคัญในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือการเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด (multi drug resistance bacteria (MDR-bacteria) ได้แก่ Vancomycin resistance Staphylococcus aureus, MDR-Acinetobecter baumannii, Pseudomonas aeruginosa ซึ่งเป็นปัญหาทางสุขภาพที่สำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเกิดสายพันธ์ที่ดื้อยาได้ ทำให้มีการหาทางเลือกใหม่และวิธีที่ช่วยในการรักษาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาโดยในปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อนำแบคเทอริโอฟาจไปใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาและวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์ โดยมีการทดลองใช้ได้ผลกับแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Vancomycin-resistant enterococci (VRE) ทั้งในสัตว์ทดลองและในคลีนิค (Biswas, et al, 2002, Marza et al., 2006, Capparelli et al., 2007, Mcvay et al., 2007, Uchiyama et al.,2008) สำหรับแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* (A. baumannii bacteriophage) คือแบคเทอริโอฟาจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *A. baumannii* ในอดีต *A. baumannii* bacteriophage ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลาย โดย A. baumannii bacteriophage ได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลองโดย Soothill และคณะในปีค.ศ. 1992 พบว่า A. baumannii bacteriophage ปริมาณ 102 อนุภาค สามารถที่ช่วยป้องกันให้หนูทดลองมีชีวิตรอดได้หลังจากที่ได้รับเชื้อ *A. baumannii* ปริมาณ 5LD50 (1.5x 108 cfu) (Soothill, 1992) หลังจากนั้นมีการแยก *A. baumannii* bacteriophage ได้โดย Lin และคณะในปีค.ศ. 2010 โดยแบคเทอริโอฟาจที่แยกได้คือ phi AB2 มีจีโนมเป็น double-stranded DNA และ เมื่อทำการ sequencing จีโนมเป็นบางส่วนขนาด 2.1 กิโล

เบส พบว่าให้ sequence ที่คล้ายคลึงกับ Tubular protein A และ B ของ *P. aeruginosa* phage LKA1 โดย ΦAB2 เป็นสมาชิกของ *Podoviridae* นอกจากนี้ ΦAB2 เป็นแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* มีการเกาะติดเซลล์(Adsorption)อย่างรวดเร็ว (> 99% adsorbed ใน 8 นาที), มีช่วง latent period ที่สั้น (<10 min) และมีขนาด burst ประมาณ. 200 (Lin, et al., 2010) ต่อมาได้มีการสกัดเอนไซม์ endolysin จาก ΦAB2 พบว่าสามารถทำลายผนังเซลล์ของ A. baumannii และ S. aureus ได้ (Lai, et al., 2011)

A. baumannii เป็นแบคทีเรีย Gram negative พบเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล (nosocomial infection) *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด (MDR-bacteria) ซึ่งพบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแผล เช่น แผลเบาหวาน แผลไฟไหม้ โดยเชื้อสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในแผล (wound infection)) เมื่อผู้ป่วยมีการติดเชื้ออาจชักนำไปสู่การติดเชื้อในกระแสโลหิต และเสียชีวิตในที่สุด (Eron, 1999; Bowler et al., 2001; Agnihotri et al., 2003) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 การระบาดของ multidrug-resistant (MDR) Acinetobacter strains ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังมีรายงานการเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อที่ได้รับจากชุมชน ในช่วง 10 ที่ผ่านมา (Dijkshoorn et al., 2007) ระบาดวิทยาในประเทศไทยจากการติดตามเฝ้าระวังสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมานานกว่า 10 ปีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่มีการดื้อยาต้านจุลชีพสูงขึ้นต้องเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด ประกอบกับการรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขพบว่า เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.1 ในปี 2543 เป็นร้อยละ 63 ในปี 2553 และดื้อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งเป็นยาด่านสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาเชื้อนี้จากร้อยละ 3 เพิ่มเป็นร้อยละ 44 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีรายงานว่าผู้ป่วยที่เป็น VAP และมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ A. baumannii พบได้ร้อยละ 13-50 ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราเสียชีวิตในกลุ่มติดเชื้อดื้อยา *A. baumannii* ในปอดสูงถึงร้อยละ 23-73 ผลการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ปี พ.ศ. 2545 พบร้อยละ 57 และโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ในปี พ.ศ.2546 พบร้อยละ 46 ของเชื้อเป็น Pandrug-resistant A. baumannii (PDRAB) (Chaiwarith, et al., 2005; Keerasuntonpong, et al., 2006) จากการรายงานของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา carbapenem มีร้อยละ 3 ในปีค.ศ. 2001เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 60 ในปีค.ศ.2007 (Santimaleeworagun et al., 2011) จากข้อมูลของโรงพยาบาลมหาราชนครราชศรีมาพบว่าเชื้อ A. baumannii เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากการ

ติดเชื้อในโรงพยาบาล และเชื้อดังกล่าวมีแนวโน้มดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (Visalsawadi 2008) สำหรับการรายงานของโรงพยาบาลลพบุรีพบความชุกของ MDRAB จากหอผู้ป่วยอายุรกรรมร้อยละ 59.8 หอผู้ป่วยศัลยกรรมร้อยละ 39.1 และหอผู้ป่วยเด็ก 0.97 (Rodsathien 2008) และจาการศึกษาเชื้อ A. baumannii ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพุทธชินราชพบว่าสามารถดื้อต่อยา carbapenem ร้อยละ 57 และยังพบยีนดื้อยา OXA-23 อีกด้วย (Niumsup et al., 2009) โดยเชื้อที่แยกได้พบมีความสามารถในการดื้อต่อยาหลายๆชนิดเช่น ยาในกลุ่ม Carbapenem, tygecicline, meropenem โดยกลไกการดื้อยาเช่น การสร้าง β-lactamase เกี่ยวข้องกับการสร้างยีนดื้อยาที่ encode อยู่บน plasmid และ chromosome เช่น blaVEB-1 ESBL, TEM 22, OXA-23, ADC 23 (Carbonne et al., 2005, Jin et al., 2009, Niumsup et al., 2009) การสร้างยีนที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น aac(3)-I, aac(6′)-I and 22 และ ant(3″)-I. (Noppe-Leclercq I, et al., 1999; Jin et al., 2009)

โครงงานวิจัยนี้กลุ่มผู้วิจัยเป้าหมายในการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อจาก *A.baumannii* เนื่องจากปัจจุบันข้อมูลทางชีววิทยาของ แบคเทอริโอฟาจต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่เป็นเชื้อดื้อยาชนิดใหม่ที่เพิ่งเริ่มมีการระบาดยังมีน้อยปัจจุบันแม้จะมีรายงานการแยกแบคเทอริโอฟาจ จากเชื้อ *A. baumannii* ได้ครั้งแรกในประเทศไต้หวันในต้นปี 2553 (Lin et al., 2010) แต่คุณสมบัติของ แบคเทอริโอฟาจที่แยกได้ยังไม่มีความหลากหลายในการทำลายเชื้อ*Acinetobacter baumannii* (narrow host range) และมีความแตกต่างของสายพันธ์ *Acinetobacter baumannii* ในแต่ละพื้นที่ ในการศึกษาการวิจัยครั้งนี้เป็นโครงงานวิจัยที่ต้องการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทย คัดเลือกสายพันธ์แบคเทอริโอฟาจที่มีความเป็นไปได้ในการมาทดสอบทางคลีนิค โดยลักษณะของแบคเทอริโอฟาจที่ดีที่ควรจะนำมาใช้ศึกษาทางคลีนิคควรมีคุณสมบัติจำเพาะต่อแบคทีเรียหลายชนิด (broad host range) ไม่ชักนำแบคทีเรียให้เกิดการดื้อต่อ phage ไม่เป็น lysogenic phage (temperate phage) ไม่ถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย และมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในคน เนื่องจากในการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อจาก *A. baumannii* จำเป็นต้องมีข้อมูลทางชีววิทยาและอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ โดยเฉพาะข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของแบคเทอริโอฟาจก่อนหน้านี้กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคัดแยกแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. baumannii* จากน้ำเสียในบ่อบำบัดและน้ำหลังการบำบัดของโรงพยาบาลในจังหวัดพิษณุโลก โดยจำนวนแบคเทอริโอฟาจที่แยกได้ทั้งหมดจากการศึกษาครั้งนี้ ได้ถูกคัดเลือกมาเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาพบว่ามีความสามารถในการทำลายเชื้อ MDR-AB ได้

มากกว่า 10 สายพันธ์ (ธวัชชัย กิตติ; 2554) เนื่องจากการนำแบคเทอริโอฟาจมาใช้ในการรักษาจำเป็นต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาโดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของอชีเนโตแบคเตอร์ และชนิดของโปรตีนที่มีความสำคัญที่แบคเทอริโอฟาจสร้างขึ้นโดยเฉพาะโปรตีนกลุ่ม endolysin ที่เป็นเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยเซลแบคทีเรีย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นโครงงานวิจัยต่อเนื่องที่ต้องการศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย A. baumannii ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยและแยกได้จากน้ำเสียในบ่อบำบัดของโรงพยาบาลในจังหวัดพิษณุโลก โดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายระยะยาวในการคัดเลือก phage เพื่อนำมาใช้ เป็น phage suspension หรือคัดหาโปรตีนที่สร้างโดยแบคเทอริโอฟาจที่สามารถย่อยเซลแบคทีเรียเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อที่แผลต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *Acinetobacter baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมทั้งสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล โดยสามารถพบได้ทั้งในน้ำ ดิน และอุปกรณ์การแพทย์ต่างๆในโรงพยาบาล เช่น เครื่องช่วยหายใจ เป็นต้น (Bergogne-Berezin and Towner, 1996) ซึ่งเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยและทั่วโลก เนื่องจากส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงจากการที่เชื้อมีการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (Souli, Galani, and Giamarellou, 2008) โดยเชื้อมักจะฉวยโอกาสก่อโรคกับผู้ป่วยที่มารักษาในโรงพยาบาลที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลานาน

1.1 จุลชีววิทยาของเชื้อ *A. baumannii*

Acinetobacter spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้น (coccobacilli) มีขนาดประมาณ 0.7 X 1.0 µm ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่พบการสร้างสปอร์ เชื้อกลุ่มนี้จะไม่เกิดกระบวนการหมักน้ำตาล เมื่อนำไปทดสอบ oxidase จะให้ผลลบและมีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ การจำแนกเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมสามารถแบ่งเชื้อออกได้ 25 สปีชีส์ (genomospecies) แต่มีเพียง 10 สปีชีส์ ที่ได้รับการตั้งชื่อก่อนหน้านี้เคยถูกจัดอยู่ใน family *Neisseriaceae* แต่ในปัจจุบันถูกจัดอยู่ใน family *Moraxellaeae* โดยสปีชีส์ที่พบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์มากที่สุดได้แก่ *A. baumannii* (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)

1.2 พยาธิกำเนิด

เชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญสามารถก่อให้เกิดโรคได้หลากหลาย ซึ่งกลไกการก่อให้เกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ประกอบด้วยสมมติฐาน 4 ข้อดังนี้

1.2.1 เชื้อมี fimbriae และ pili มีบทบาทสำคัญในการเข้าจับกับเซลล์เยื่อบุได้ดี (Siroy, et al., 2006)

1.2.2 เชื้อสร้างโพลิแซคคาไรด์ทำให้สามารถสร้าง biofilm ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ quorum sensing (Vidal, et al., 1996) โดย biofilm มีบทบาทที่สำคัญในการก่อโรคในแบคทีเรียหลายๆ ชนิดทำให้สามารถเกาะ (colonization) อยู่กับวัสดุเทียมและยังทำให้สามารถจับเซลล์เยื่อบุได้ดี อีกทั้งยังทำให้เชื้อทนต่อยาต้านจุลชีพ (Gaddy and Actis, 2009)

1.2.3 เชื้อสร้างเอนไซม์ lipase ทำลายไขมันปกคลุมเนื้อเยื่อทำให้เชื้อจับเซลล์ได้ง่ายขึ้น(Bergogne-Berezin and Towner, 1996)

1.2.4 หลังจากเชื้อเข้าเกาะกับเซลล์แล้ว เชื้อจะไปควบคุมกระบวนการทำลายตัวเอง (apoptosis) ของเซลล์ยูคาริโอตโดยอาศัยคุณสมบัติของ Outer membrane protein A (OmpA) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย (Choi, et al., 2008) และทำให้เกิดการอักเสบโดย lipopolysaccharide (LPS) จะไปเหนี่ยวนำให้ pro-inflammatory cytokine ให้มีการแสดงออกมาใน monocytes ของเซลล์ (Erridge, et al., 2007) จากคุณสมบัติของ Outer membrane protein A และ lipopolysaccharide ของเชื้อทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง

1.3 โรคติดเชื้อ *A. baumannii*

การติดเชื้อ *A. baumannii* นั้นมักจะก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection)ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง และเป็นสาเหตุที่สำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) โดยเชื้อ *A. baumannii* ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ มักจะเกิดจากผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ (ventilator-associated pneumonia; VAP) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) การติดเชื้อในเลือด (bacteremia) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) การติดเชื้อบริเวณบาดแผลและเยื่อบุช่องท้องอักเสบจากการติดเชื้อ เป็นต้น (Bergogne-Berezin and Towner, 1996) ซึ่งปัจจัยที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *A. baumannii* ได้แก่ การพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน การใช้ยาต้านจุลชีพเป็นเวลานาน การที่ผู้ป่วยมีบาดแผลรวมถึงแผลผ่าตัด และการใช้สายสวนหรือเครื่องมือทางการแพทย์เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากเชื้อสามารถที่จะทนอยู่ในสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาลได้เป็นเวลานาน

1.4 กลไกการดื้อยาต้านจุลชีพของ *A. baumannii*

สถานการณ์การดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* กำลังเป็นปัญหาที่ทั่วโลกต้องเผชิญรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากเชื้อ *A. baumannii* สามารถดื้อต่อยาต้านจุลชีพได้อย่างรวดเร็วด้วยกลไกหลากหลายทำให้วิธีการรักษามีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ซึ่งกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพอาจเกิดจากเพียงกลไกใดกลไกหนึ่งหรืออาจมีการดื้อการยาต้านจุลชีพเกิดขึ้นได้หลายๆ กลไกพร้อมกัน(Bergogne-Berezin and Towner, 1996) โดยกลไกการดื้อยาที่พบใน *A. baumannii* มีทั้งหมด 4 กลไก ดังนี้

1.4.1 การสร้างเอนไซม์ทำลายยาต้านจุลชีพ

เชื้อ MDRAB มีการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β-lactams โดยการสร้างเอนไซม์มาทำลายยาต้านจุลชีพจัดเป็นกลไกที่มีความสำคัญ และพบได้บ่อย เอนไซม์ β-lactamase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine peptidase ซึ่งมีตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine โดย β-lactamase จะอาศัยหมู่ไฮดรอกซิลของ serine ในตำแหน่งออกฤทธิ์เข้าทำปฏิกิริยากับวงแหวน β-lactam ทำให้เกิดการแตกออกของพันธะ amide เอนไซม์ที่ทำลายยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β-lactams ได้แก่ Amp-C β-lactamase, OXA-type carbapenemase และ metalo-β-lactamase เป็นต้น (Bergogne-Berezin and Towner, 1996; Gordon and Wareham, 2010) เอนไซม์ carbapenemase จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ β-lactamase ที่เชื้อ *A. baumannii* สร้างขึ้นเพื่อทำลายยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenems (imipenem และmeropenem) ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษา *A. baumannii* ได้ดี นอกจากนี้เอนไซม์ carbapenemase ยังสามารถทำลายยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β-lactams อื่นๆอีก โดยเอนไซม์ carbapenemase แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ OXA-type carbapenemase และ metalo-β-lactamase (MBL)โดย OXA-type carbapenemase เป็นเอนไซม์ β-lactamase ในกลุ่ม D ตามโครงสร้างทางโมเลกุล ปัจจุบันพบ OXA-type carbapenemase ในเชื้อ *A. baumannii* ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-49, OXA-51, OXA-58 และยังพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่สร้าง OXA-type carbapenemase ในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันอีกด้วย (Wroblewska, et al., 2007) ส่วน MBL เป็นเอนไซม์ β-lactamase ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม B ตามโครงสร้างทางโมเลกุลซึ่งต้องการธาตุสังกะสี (Zn^{2+}) เป็นปัจจัยร่วมในการออกฤทธิ์ ปัจจุบัน MBL ที่พบใน *Acinetobacter* มีเพียง 3 กลุ่มย่อยคือ IMP-like (imipenemase) VIM-like (Verona-imipenemase) และ SIM-1 (Seoul-imipenemase) (Walsh, et al., 2005) และเชื้อ *A. baumannii* ยังดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม

aminoglycosides โดยสร้างเอนไซม์ aminoglycoside modifying enzymes โดยการเติมหมู่บางชนิดในโครงสร้างยาทำให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้ (Poirel and Nordmann, 2006)

1.4.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายในการจับของยา

การดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม β-lactams เกิดจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin binding protein (PBP) ซึ่งเป็นเป้าหมายของยาต้านจุลชีพดังกล่าว โดยเชื้อมีการสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาต้านจุลชีพจับไม่ได้ให้มากขึ้นหรือไปลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาต้านจุลชีพจับได้ (Gehrlein, et al., 1991)

1.4.3 การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin

การควบคุมปริมาณการเข้าสู่เซลล์ของยาต้านจุลชีพเป็นวิธีการหนึ่งที่เชื้อ *A. baumannii* ได้เพิ่มความสามารถในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งการนำเข้าของยาต้านจุลชีพในกลุ่มของ β-lactams ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงต้องใช้ช่องทางในการนำยาต้านจุลชีพเข้า ประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า porin รวมตัวกันเกิดเป็นช่องทางผ่านเข้าออกของสารที่ละลายน้ำได้ดีเข้าสู่เซลล์รวมถึงยาต้านจุลชีพ เมื่อเชื้อลดการสร้าง porin ส่งผลทำให้การนำยาเข้าเซลล์จึงลดลงเชื้อจึงเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ (Bonomo and Szabo, 2006)

1.4.4 การขับยาออกจากเซลล์

ระบบ efflux pumps เป็นกลไกที่สำคัญอีกกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาจุลชีพ ซึ่งเกิดโดยกระบวนการอาศัยพลังงาน เนื่องจากการดื้อยาต้านจุลชีพโดยการสร้าง efflux pump ของ *A. baumannii* สามารถขับยาต้านจุลชีพได้หลายกลุ่มทำให้เชื้อ *A. baumannii* เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพแบบไม่จำเพาะหรือดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่มพร้อมกันได้ (Bonomo and Szabo, 2006)

1.5 ระบาดวิทยา

ระบาดวิทยาในต่างประเทศ จากการรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกาโดย Center for Disease Control and Prevention (CDC) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นลำดับที่สองรองจาก *Psedomonas auroginosa* โดยพบร้อยละ 43.4 ในผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในหอผู้ป่วยวิกฤติ (Wisplinghoff, et al., 2004) ในประเทศกรีซรายงานโดย Greek System for Surveillance of Antimicrobial Resistance (GSSAR) พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ในหอผู้ป่วยภาวะวิกฤติ (Intensive care unit :ICU) มีการดื้อต่อยา imipenem เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 0 ในปีค.ศ.1996 ถึงประมาณร้อยละ 85.1ในปีค.ศ.2007 และในหอผู้ป่วยศัลยกรรม (surgical wards) มีการดื้อต่อยา imipenem เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 0 ในปีค.ศ.1996 ถึงประมาณร้อยละ 59 ในปี ค.ศ.2007 (Souli, et al., 2008) รายงานของโรงพยาบาลใน

ประเทศตุรกีในปีค.ศ.2006 พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ (VAP) ในหอผู้ป่วยภาวะวิกฤติมีอัตราการดื้อยา imipenem ร้อยละ 80.3 และ meropenem ร้อยละ 70.2 (Dizbay, et al., 2008) ขณะที่สหราชอาณาจักรมีรายงานว่า เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem ร้อยละ 0 ในปี ค.ศ.1998 เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 55 ในปี ค.ศ.2006 และจากการรายงานในประเทศสาธารณรัฐเชคพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem ร้อยละ 15 ใน ปี ค.ศ.2005-2006 (Nemec, et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากประเทศไต้หวันโดย Center for Disease Control พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้ออันดับ 1 ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่นอนรักษาตัวในหอผู้ป่วยวิกฤติ (Lin, et al,.2010)

ระบาดวิทยาในประเทศไทยจากการติดตามเฝ้าระวังสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมานานกว่า 10 ปีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อที่มีการดื้อยาต้านจุลชีพสูงขึ้น ต้องเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด ประกอบกับการรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขพบว่า เชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.1 ในปี พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 63 ในปี พ.ศ. 2553 และดื้อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งเป็นยาด่านสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาเชื้อนี้จากร้อยละ 3 เพิ่มเป็นร้อยละ 44 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีรายงานว่าผู้ป่วยที่เป็น VAP และมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *A. baumannii* พบได้ร้อยละ 13-50 ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราเสียชีวิตในกลุ่มติดเชื้อดื้อยา *A. baumannii* ในปอดสูงถึงร้อยละ 23-73 ผลการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ปี พ.ศ. 2545 พบเชื้อ *A. baumannii* ร้อยละ 57 และโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ในปี พ.ศ.2546 พบว่าร้อยละ 46 ของเชื้อเป็น Pandrug-resistant *A. baumannii* (PDRAB) (Chaiwarith, et al., 2005 ; Keerasuntonpong, et al., 2006) จากการรายงานของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์พบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยา carbapenem มีร้อยละ 3 ในปี ค.ศ. 2001เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 60 ในปี ค.ศ.2007 (Santimaleeworagun, et al., 2011) จากข้อมูลของโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล และเชื้อดังกล่าวมีแนวโน้มดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (Visalsawadi, 2008) สำหรับการรายงานของโรงพยาบาลลพบุรีพบความชุกของ MDRAB จากหอผู้ป่วยอายุรกรรมร้อยละ 59.8 หอผู้ป่วยศัลยกรรมร้อยละ 39.1 และหอผู้ป่วยเด็ก 0.97 (Rodsathien, 2008) และจากการศึกษาเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลพุทธชินราชพบว่าสามารถดื้อต่อยา carbapenem ร้อยละ 57 และยังพบยีนดื้อยา OXA-23 อีกด้วย (Niumsup, et al., 2009)

1.6 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

เชื้อ *Acinetobacter* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Trypticase soy agar, Nutrient agar และ Brain heart infusion agar อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจจะอาศัย selective media เพื่อที่จะใช้ควบคุมเชื้อชนิดอื่นด้วย โดย Herellea agar เป็น selective media ประกอบด้วย น้ำดี น้ำตาล และ bromocresol purple ส่วน selective media อีกชนิดหนึ่งคือ Leed *Acinetobacter baumannii* media (LAM) เป็นอาหารที่สามารถแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีการเติมยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นต่างๆ อีกด้วย (Bergogne-Berezin and Towner, 1996) การทดสอบทางชีวเคมีสามารถแยกเชื้อ *A. baumannii* ได้ โดยเชื้อดังกล่าวจัดเป็น saccharolytic ซึ่งสามารถสลายน้ำตาลได้ เมื่อนำไปทดสอบ oxidase จะให้ผลลบ นอกจากนี้เป็นสปีชีส์เดียวที่เจริญได้ที่ 44 องศาเซลเซียส อีกด้วย (Peleg, Seifert, and Paterson, 2008)

1.7 การรักษา

ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีความซับซ้อนมากขึ้น เนื่องจากพบอุบัติการณ์ MDRAB ที่ค่อนข้างสูงซึ่งแนวทางการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* ในปัจจุบัน ได้แก่ การเลือกใช้ยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ หรือ ยาต้านจุลชีพเดิมที่มีข้อบ่งใช้ใหม่ซึ่งมีกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพต่างกับยาต้านจุลชีพที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ยาต้านจุลชีพที่อาจใช้ในการรักษาได้ เช่น ยาต้านจุลชีพในกลุ่ม Carbapenem (เช่น imipenemและ meropenem), fluroquinolones, ampicillin/sulbactam, aminoglycoside และ colistin เนื่องจากว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพสูงและดื้อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่ม ดังนั้นจึงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการรักษาจึงควรทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกยาต้านจุลชีพสำหรับการรักษา และการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียวมักทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดนั้นในระหว่างการรักษา จึงควรใช้ยาต้านจุลชีพอย่างน้อย 2 ชนิดร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ในการรักษา และการนำความรู้ทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ของยาต้านจุลชีพมาปรับเปลี่ยนวิธีการให้ยา(ภัทรชัย กีรติสิน, 2549)๓

2. แบคเทอริโอเฟจ

2.1 สมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจมีกรดนิวคลีอิกทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม (Carter, 2007) โดยขนาดของกรดนิวคลีอิกแตกต่างกันตามชนิดของแบคเทอริโอเฟจ และส่วนของแคปซิด (capsid) ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) เพื่อป้องกันกรดนิวคลีอิกที่อยู่ภายใน สามารถดำรงชีวิตได้อย่างอิสระแต่เพิ่มจำนวนของ

อนุภาคเฉพาะภายในเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์เท่านั้น (obligate parasite) ไม่จัดเป็นเซลล์เนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโครงสร้างอื่นของเซลล์ (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

2.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจ

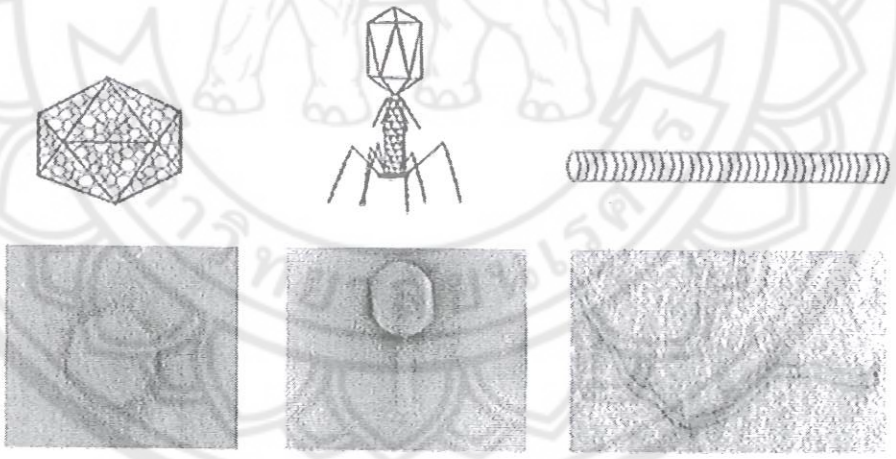
แบคเทอริโอเฟจที่มีส่วนประกอบครบสมบูรณ์เรียกว่า"วิริออน (virion)" ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ กรดนิวคลิอิก และมีโปรตีนหุ้มล้อมรอบเพื่อป้องกันกรดนิวคลิอิก เรียกว่า"แคปซิด (capsid)"

2.2.1 กรดนิวคลิอิก

จีโนมที่พบในอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจเป็นกรดนิวคลีอิก อาจเป็น double-stranded DNA, single-stranded DNA, double-stranded RNA หรือ single-stranded RNA แบบใดแบบหนึ่ง ซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และเป็นวงกลม (circular) (Kutter and Sulakvelidze, 2005; พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

2.2.2 แคปซิด

แคปซิดเป็นโปรตีนที่ล้อมรอบกรดนิวคลีอิกไว้ข้างใน แคปซิดประกอบขึ้นด้วยแคปโซเมอร์ซึ่งเป็นโมเลกุลของโปรตีนจำนวนหลายหน่วย มีหน้าที่ช่วยป้องกันการถูกทำลายด้วยรังสี อุณหภูมิ สารเคมี เป็นต้น นอกจากนี้การจัดเรียงตัวของแคปซิดยังทำให้เกิดรูปร่างต่างๆของอนุภาค แบคเทอริโอเฟจดังแสดงในรูปที่ 1 (Kutter and Sulakvelidze, 2005; พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)



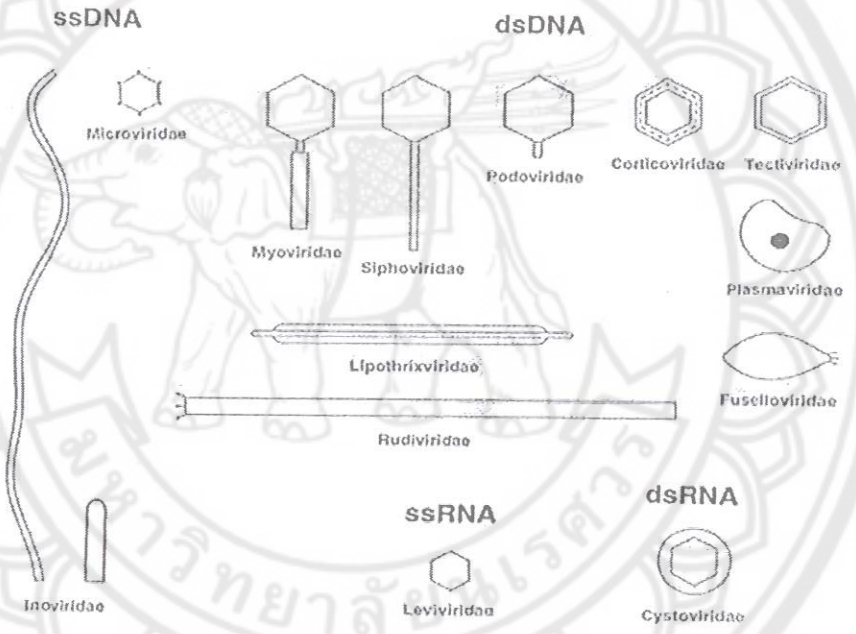
(A) (B) (C)

รูปที่ 1 แสดงรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ: (A) มีส่วนหัวเป็น icosahedral capsid และไม่มีหาง (B) มีส่วนหัวเป็น icosahedral capsid และมีหางสั้น หรือยาว ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ (C) รูปร่างเป็นสายยาว (filamentoue phage)

ที่มา: ดัดแปลงจาก: พรรณทิพา จันทร์ทัง, 2553

2.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

ปัจจุบันนี้การค้นพบแบคเทอริโอเฟจชนิดใหม่ประมาณไม่ต่ำกว่า 100 สายพันธุ์ในแต่ละปี โดยอาศัยการจำแนกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการส่องดูรูปร่างของอนุภาค ซึ่งพบว่าปัจจุบันน่าจะมีแบคเทอริโอเฟจทั้งหมดประมาณมากกว่า 6,000 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย tailed phage มีจำนวนมากกว่าร้อยละ 96 ของแบคเทอริโอเฟจที่ถูกค้นพบ แบคเทอริโอเฟจที่พบส่วนใหญ่จะมี dsDNA เป็นสารพันธุกรรมเป็น tailless phage และ filamentous phage ตามลำดับ (Ackermann, 2001: 2009) ปัจจุบัน International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจออกเป็น 1 order 13 families และ 30 genera ตามชนิดของกรดนิวคลีอิก (nature of nucleic acid) และรูปร่างลักษณะ (particle morphology) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงรูปร่างลักษณะ order และ families ของการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ

ที่มา: Ackermann, 2009

2.4 นิเวศวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจสามารถจะเพิ่มจำนวนอนุภาคได้เฉพาะภายในเซลล์เท่านั้น (Obligate parasite) ดังนั้นการค้นพบแบคเทอริโอเฟจในสิ่งแวดล้อมต่างๆจึงขึ้นอยู่กับแบคทีเรียโฮสท์ แบคเทอริโอเฟจสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติตามที่มีแบคทีเรียโฮสท์ซึ่งมีประมาณเกินกว่าแบคทีเรียในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 (Weinbauer and Hijfle, 1998) โดยประมาณกันว่ามีจำนวนและความหลากหลายสูงที่สุดในโลกของสิ่งมีชีวิต และพบได้ทั่วไปในน้ำอุจจาระ ดิน และแม้แต่น้ำทะเล โดยพบว่าจำนวนของแบคเทอริโอเฟจและโฮสท์จะมีความไม่แน่นอนสามารถเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล (Kutter and Sulakvelidze, 2005) จากการตรวจสอบแบคเทอริโอเฟจทั้งหมดในช่วงสองปีหลังด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามีจำนวนทั้งหมด 5,568 สายพันธุ์ โดยพบว่าร้อยละ 96 เป็นแบคเทอริโอเฟจที่จัดอยู่ในกลุ่ม Caudovirales (Ackermann, 2009) วิธีการศึกษานิเวศวิทยาของแบคเทอริโอเฟจจะเป็นการศึกษาเกี่ยวข้องกับ single-step growth หรือ one-step growth เพื่อตรวจสอบช่วงเวลานับแต่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียจนถึงเวลาที่อนุภาคที่สมบูรณ์ของแบคเทอริโอเฟจถูกประกอบขึ้นภายในเซลล์เป็นครั้งแรกเรียกว่า “Eclipse period” ตามด้วยช่วงเวลานับแต่แบคเทอริโอเฟจเริ่มติดเชื้อแบคทีเรียจนกระทั่งเซลล์แบคทีเรียแตกปล่อยจำนวนลูกหลานที่สมบูรณ์ (phage progeny) ออกมาภายนอกเซลล์เรียกว่า”Latent period” การตรวจจำนวนลูกหลานของแบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ซึ่งประชากรลูกหลานจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจเรียกว่า “Burst size” (You, Suthers, and Yin, 2002) และการศึกษา Phage adsorption curve เพื่อศึกษาความสามารถในการเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย (Abedon, Hyman, and Thomas, 2003)

2.5 วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ

วงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 แบบ ตามลักษณะการติดเชื้อของแบคทีเรีย

2.5.1 วงจรชีวิตแบบไลติค (Lytic cycle)

แบคเทอริโอเฟจในวงจรชีวิตนี้เรียกว่า ไวรูเรนท์เฟจ (Virulent phage) หรือ ไลติคเฟจ (Lytic phage) โดยแบคทีเรียมีการติดเชื้อจากแบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติคนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนลูกหลานเกิดขึ้นภายในเซลล์ของโฮสท์และทำให้แบคทีเรียแตกสลาย ซึ่งจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังนี้ ดังแสดงในภาพ 3

2.5.1.1 การเกาะติด (adsorption)

แบคเทอริโอเฟจจะใช้ส่วนเกาะติด (attachment site) เกาะกับตัวรับ (receptor site) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์ แบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดจะใช้ส่วนเกาะติดที่แตกต่างกันเช่น tail phage จะใช้

ปลายของหางเป็นส่วนเกาะติด tailless phage จะมีส่วนเกาะติดหลายตำแหน่งที่อยู่ที่แคปซิด และ filamentous phage จะมีส่วนเกาะติดอยู่ที่ปลายทั้งสองข้าง (Bertin, de Frutos, and Letellier, 2011) แบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดในธรรมชาติจะมี receptor บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์ที่แตกต่างกันเช่น โปรตีน, กรดไทโคอิก (teichoic acid), ลิโพโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide), แฟลกเจลลา (flagella), แคปซูล (capsule), พิไล (pili) และ พอริน (porin) เป็นต้น (Rakhuba, et al., 2010)

2.5.1.2 การส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโฮสท์ (penetration)

หลังจากการเกาะติดแล้ว tail phage ชนิดที่ส่วนของชีทจะหดตัวส่งผลทำให้ส่วนของปลายหางแทงผ่านผนังเซลล์ แล้วส่งผ่านกรดนิวคลีอิกจากส่วนหัวลงสู่ส่วนหางเข้าสู่ไซโตพลาสซึม โดยที่แคปซิดของแบคเทอริโอเฟจยังอยู่ที่ภายนอกของแบคทีเรียเซลล์โฮสท์ ส่วนแบคเทอริโอเฟจที่มีหางสั้นจะส่งกรดนิวคลีอิกผ่านถึงเพอริพลาสซึมได้ ส่วน tailless phage จะต้องทำให้แคปซิดแตกออกก่อน แล้วส่งกรดนิวคลีอิกไปที่ผนังเซลล์ก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์โฮสท์ และพวก filamentous phage พบว่าการส่งผ่านกรดนิวคลีอิกจะมีแคปซิดเข้าไปในเซลล์ด้วย แต่จะทิ้งโปรตีนส่วนใหญ่ไว้ที่เซลล์เมมเบรนแล้วส่งกรดนิวคลีอิกเข้าสู่ไซโตพลาสซึม (Rakhuba, et al., 2010; พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

2.6.1.3 การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ (biosynthesis)

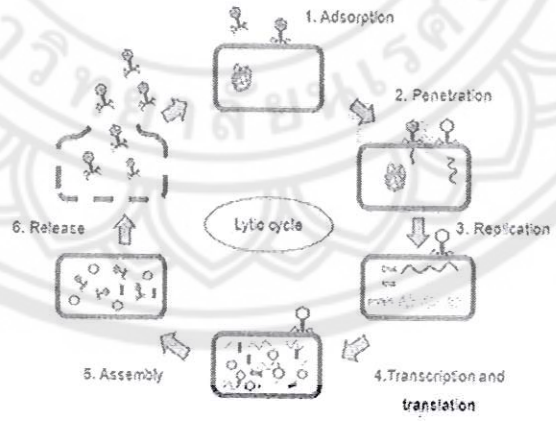
ในกระบวนการนี้จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของกรดนิวคลีอิกของแบคเทอริโอเฟจว่าเป็น อาร์เอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอ และเป็นสายคู่หรือสายเดี่ยว (Weigel and Seitz, 2006) เฟจบางชนิดจะมีการสลายกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียโฮสท์เพื่อใช้เป็นสารต้นตอ (precursor) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ โดยแบคเทอริโอเฟจจะเริ่มต้นการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) จากดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ โดยอาศัยอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) ของแบคทีเรีย ซึ่งเรียกว่า เอ็มอาร์เอ็นเอช่วงต้น (early mRNA) แล้วจะเกิดการแปลรหัส (translation) ไปเป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญ หลังจากนั้นจะมีการถอดรหัสช่วงหลังจากการเพิ่มจำนวนของชุดดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจ โดยใช้อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของแบคเทอริโอเฟจเอง จะได้เป็นเอ็มอาร์เอ็นเอช่วงหลัง (late mRNA) ซึ่งเมื่อแปลรหัสออกมาจะเป็นโปรตีนโครงสร้างของ แบคเทอริโอเฟจเช่น แคปซิด ส่วนหาง รวมทั้งเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการประกอบอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ (Kutter and Sulakvelidze, 2005; พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

2.5.1.4 การประกอบเป็นอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ (assembly หรือ morphogenesis)

ในกระบวนการนี้กรดนิวคลีอิก และโปรตีนโครงสร้างต่างๆของแบคเทอริโอเฟจจะรวมกันเกิดเป็นอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่สมบูรณ์ โดยการประกอบกันเป็นอนุภาคแบคเทอริโอเฟจนี้จะอาศัยโปรตีน 2 กลุ่ม คือโปรตีนโครงสร้างที่จะกลายเป็นส่วนประกอบของอนุภาค แบคเทอริโอเฟจ และโปรตีนที่ใช้ในกระบวนการประกอบเป็นอนุภาค แต่จะไม่เป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งส่วนใดของอนุภาค โดยการประกอบอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจจะเริ่มจากกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุในแคปซิดที่สร้างขึ้นจากนั้นแคปซิดที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกจะมีการเชื่อมต่อเข้ากับส่วนหาง และชีทห่อหุ้ม ส่วนแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างเป็นสายยาว (filamentous phage) กรดนิวคลีอิกและโปรตีนจะรวมเข้ากันเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ภายในขั้นตอนเดียว ทั้งนี้จำนวนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจขึ้นอยู่กับความจำเพาะของแบคทีเรียโฮสท์กับแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิด (Aksyuk and Rossmann, 2011; พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

2.5.1.5 การปลดปล่อยแบคเทอริโอเฟจลูกหลานออกจากเซลล์ (release)

ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อทำให้เซลล์แตก โดยแบคเทอริโอเฟจจะมีการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำงานร่วมกัน 2 ชนิดคือ เอนไซม์โฮลิน (holin) เพื่อย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์เอ็นโดไลซิน (endolysin) เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ โดย holin เป็น hydrophobic proteins ขนาดเล็ก ซึ่งจะสอดแทรก holin monomer เข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากทางด้านในของเซลล์แล้วประกอบเป็น holin oligomers ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์หลังจากนั้น endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์สามารถผ่านเข้าไปย่อยทำลายชั้น peptidoglycan ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและปลดปล่อยแบคเทอริโอเฟจออกมา (Kutter and Sulakvelidze, 2005; พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)



รูปที่ 3 แสดงวงจรชีวิตแบบไลติคเฟจ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Labrie, Samson, and Moineau, 2010

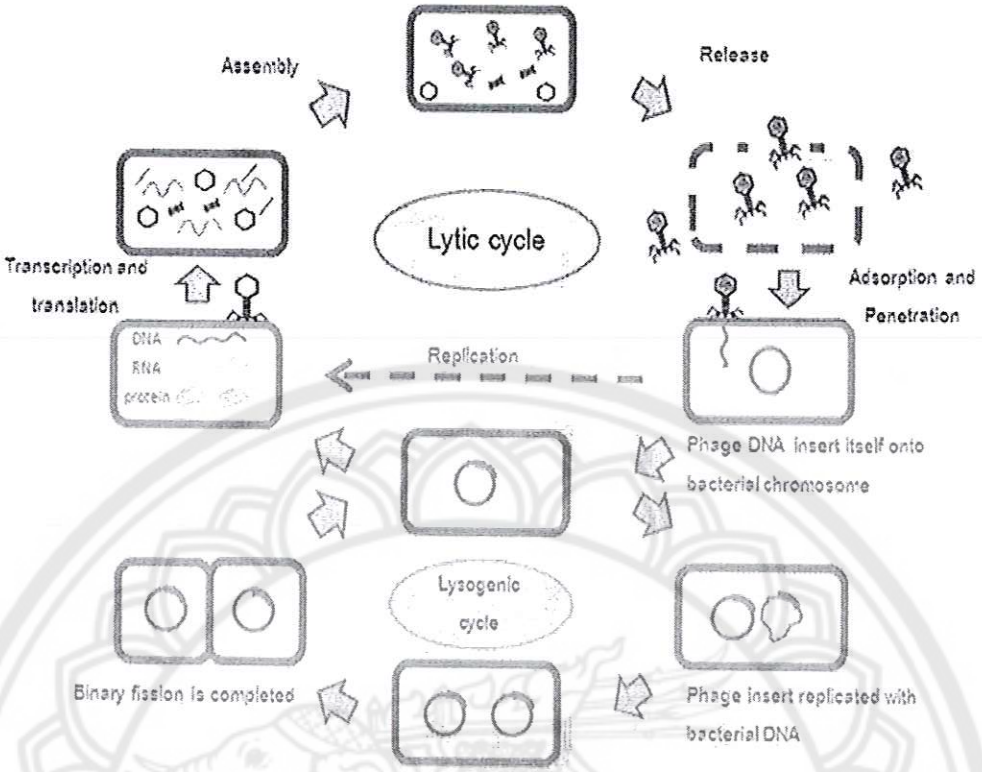
2.5.2 วงจรชีวิตแบบไลโสจีนิค (Lysogenic cycle)

แบคเทอริโอเฟจในวงจรชีวิตนี้จะเป็นแบบไลโสจีนิค และไลติค เรียกว่า Temperate phage หรือ ไลโสจีนิคเฟจ (lysogenic phage) หมายถึง แบคเทอริโอเฟจที่เข้าสู่แบคทีเรียแล้วไม่มีการสร้างแบคเทอริโอเฟจลูกหลานได้ แต่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจจะสอดแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรีย โดยกระบวนการ genetic recombination เรียกจีโนมของแบคเทอริโอเฟจ ระยะนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) แบคเทอริโอเฟจบางชนิด เช่น Mu phage ก็สามารถกลับเข้าวงจรชีวิตแบบ ไลติคเฟจได้ เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดยแสงอัลตาไวโอเลต หรือ ความร้อน เป็นต้น (Hanlon, 2007) เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัวโปรเฟจ (prophage) ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมีโปรเฟจ (prophage) แฝงอยู่ด้วย ซึ่งจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆดังนี้ ดังภาพประกอบที่ 4 (Kutter and Sulakvelidze, 2005)

2.5.2.1. แบคเทอริโอเฟจจะเข้าเกาะกับตัวรับ (receptor site) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์ในตำแหน่งที่จำเพาะและส่งผ่านดีเอ็นเอที่เป็นสายตรงเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโฮสท์ (Carter, 2007)

2.5.2.2 ในช่วงแรกดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและถอดรหัสโดยอาศัยเอ็นไซม์จากแบคทีเรีย เมื่อได้ mRNA ของแบคเทอริโอเฟจแล้ว จะเกิดการแปลรหัสและได้โปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่าโปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งจะเข้าขัดขวางการทำงานของ RNA polymerase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างอนุภาคของ แบคเทอริโอเฟจและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปลดปล่อยแบคเทอริโอเฟจ (พรรณทิพา จันทร์ทัง, 2553) เช่น แลมดาเฟจจะมี *CI* gene ที่สร้าง repressor protein เพื่อไปจับกับตำแหน่ง operator เพื่อไปกดการสังเคราะห์โปรตีนของยีนอื่นๆ ดังนั้นจึงไม่เข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค จากนั้น ดีเอ็นเอของแบคเทอริโอเฟจแบบปิดจะเข้าสอดแทรก (integration) กับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ซึ่งเรียกแบคเทอริโอเฟจในช่วงนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียนี้ว่า ไลโสเจน (lysogen) ซึ่ง prophage จะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับแบคทีเรียโฮสท์ (Carter, 2007)

2.5.2.3 การชักนำโปรเฟจเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค (induction) อาจเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous induction) หรือการชักนำอื่นๆที่มีผลรบกวนหรือทำลายดีเอ็นเอทำให้แบคทีเรียไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต สารเคมี และความร้อน เป็นต้น (Hanlon, 2007) สามารถทำให้โปรเฟจหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียและเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค การชักนำโปรเฟจเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดระดับลง หรือการทำลายของโปรตีนควบคุม (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)



รูปที่ 4 แสดงวงจรชีวิตแบบไลโสจีนิคเฟจ

2.6 ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับโฮสท์

ความสัมพันธ์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจและแบคทีเรียโฮสท์จะอาศัยความจำเพาะของโครงสร้างที่อยู่บนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจที่เรียกว่า “Attachment site” ตรงส่วนหัวของ แบคเทอริโอเฟจเช่น แคปซิด หรือ ตรงบริเวณส่วนหางเช่น Tailed fiber เมื่อ Attachment site ของแบคเทอริโอเฟจเข้าจับกับตำแหน่งตัวรับ (receptor site) อย่างจำเพาะของแบคทีเรียโฮสท์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ผิวด้านนอกของแบคทีเรียโฮสท์ จึงทำให้เริ่มเข้าสู่กระบวนการ adsorption ของ แบคเทอริโอเฟจ (Kropinski, 2006) ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจและแบคทีเรียโฮสท์มีความสำคัญมากในการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์โฮสท์ และการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะกับโฮสต์ในระดับหนึ่ง ถ้าหากแบคทีเรียเกิดการกลาย (mutate) ซึ่งทำให้ตำแหน่งตัวรับของแบคเทอริโอเฟจเปลี่ยนไป อาจจะส่งผลทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นทนทานต่อแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์นั้นๆได้ (Labrie, et al., 2010) โดยแบคเทอริโอเฟจจะจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิดได้แก่ โปรตีน, กรดไทโคอิก (teichoic

acid), ลิโพโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide), แฟลกเจลลา (flagella), แคปซูล (capsule), พิไล (pili) และ พอริน (porin) เป็นต้น ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจและแบคทีเรียโฮสท์แต่ละชนิดมีค่อนข้างแคบกล่าวคือแบคเทอริโอเฟจชนิดใดชนิดหนึ่ง จะสามารถจับกับตัวรับบนเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์เพียงสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่ง หรือสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น คุณสมบัติดังกล่าวจึงเป็นผลดีต่อการนำไปพัฒนาใช้ในการรักษาเนื่องจากไม่ส่งผลต่อเชื้อประจำถิ่นในร่างกาย (Normal flora) (Hanlon, 2007)

2.7 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในด้านต่างๆ

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในด้านต่างๆดังต่อไปนี้

2.7.1 ไวรัสบำบัด (Phage therapy)

การศึกษาไวรัสบำบัดเริ่มในปี ค.ศ. 1921มีนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Richard Bruynonge และ Joseph Matsin เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ใช้ไวรัสบำบัดเชื้อ *Staphylococcus* ที่เป็นปัญหาในติดเชื้อหลังการผ่าตัด โดยการฉีดแบคเทอริโอเฟจบนผิวหนังรอบๆบริเวณแผลที่ติดเชื้อหลังจากการผ่าตัด ผลที่เกิดขึ้นพบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถลดการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นจุดเริ่มต้นให้นักวิทยาศาสตร์หลายๆ กลุ่มศึกษาแบคเทอริโอเฟจเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (Phumkhom, 2009) เมื่อมีการค้นพบยาต้านจุลชีพในปี ค.ศ.1941จึงทำให้ความสนใจในการศึกษาแบคเทอริโอเฟจลดลงส่งผลทำให้แบคเทอริโอเฟจถูกนำไปใช้ในวงแคบเฉพาะในรัสเซียและประเทศที่เคยเป็นส่วนหนึ่งของอดีตสหภาพโซเวียตแต่ก็ได้ใช้กันมาเป็นเวลากว่า 90 ปีแล้วและมีเพียงประเทศจอร์เจียที่อนุญาตให้ใช้อย่างเป็นทางการ หลังจากมีค้นพบเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มอย่างต่อเนื่องทำให้แบคเทอริโอเฟจกลับมาได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ที่ผ่านมามีการศึกษาที่สะท้อนให้เห็นว่า phage therapy มีศักยภาพในการกำจัดแบคทีเรียได้หลายชนิด สิ่งที่น่าสนใจคือแบคเทอริโอเฟจสามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่ใช้เป็นอาวุธชีวภาพ (bio-warfare) เช่น lytic enzyme (PlyG) ซึ่งแยกได้จาก gamma phage มีความจำเพาะในการทำลาย *Bacillus anthracis* (Watanabe, Morimoto, and Shiomi, 1975) ในด้านการแพทย์ได้มีการพัฒนานำเอาเอนไซม์ endolysin มาสกัดเป็นเอนไซม์บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น therapeutic agent เช่น การใช้ pneumococcal bacteriophage lytic enzyme (Pal) ที่สกัดจาก pneumococcal phage ฆ่า pneumococci ที่ดื้อต่อ penicillin (Loeffler, Nelson and Fischetti, 2001) โดยอาจใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพ เพื่อทำลายแบคทีเรียดื้อยา (antibiotic-resistant bacteria) หรือใช้แบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียที่สร้าง biofilm ที่ยากในการกำจัด (Phumkhom, 2009) ไวรัสบำบัดเป็นการรักษาที่ตรงจุดมากกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพ เนื่องจากแบคเทอริ

โอเฟจสามารถเจาะทะลุผนังแบคทีเรียเข้าไปได้ในขณะที่ยาเข้าไปไม่ได้จึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วยและแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์อื่นๆ

2.7.2 Phage typing

เป็นการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในจีนัส (genus) และสปีชีส์ (species) เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อ แบคเทอริโอเฟจโดยมักใช้แบคเทอริโอเฟจชนิดต่างๆรวมกัน ในการศึกษา ทั้งนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างการเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจกับที่รับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเกิดการ lysis ของแบคทีเรียจะสังเกตเห็น plaque หรือ clear zone เกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่เป็นวงใสเล็ก ๆบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar surface) เป็นประโยชน์สำหรับงานทางระบาดวิทยาในการสืบหาเชื้อต้นเหตุของการระบาด(Phumkhom, 2009) ตัวอย่างเช่น เมื่อพบการระบาดของ *Vibrio cholera* ที่ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรคในสองพื้นที่ หากต้องการทราบว่ามีแหล่งที่มาเดียวกันหรือไม่ สามารถทำได้โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากสองที่มาทดสอบความไวต่อชุดของแบคเทอริโอเฟจ หากเชื้อจากสองสถานที่มีความไวต่อชุดของแบคเทอริโอเฟจเหมือนกัน แสดงว่าการระบาดน่าจะเกิดจากแหล่งเดียวกัน จากการศึกษาการใช้แบคเทอริโอเฟจในการการจัดจำแนก Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) และ *Campylobacter* ว่าสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการติดตามการระบาดในอาหาร (Hagens and Loessner, 2007) นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ เช่น จำแนกเชื้อ *Salmonella* Typhi ออกเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค และ สายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง โดยอาศัยคุณสมบัติของเฟจที่จะทำลายเฉพาะ *Salmonella* Typhi ที่มี Vi antigen ซึ่งสร้างจากเฟจที่อยู่ในแบคทีเรียและทำให้ *Salmonella Typhi* ก่อโรคที่รุนแรงได้ (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

2.7.3 พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering)

นำแบคเทอริโอเฟจมาใช้เป็นยีนพาหะ (gene vector) เพื่อนำยีนที่ต้องการเข้าสู่โฮสท์เซลล์ที่เป็นแบคทีเรียในการทำโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning) แบคเทอริโอเฟจที่มีบทบาทในการนำมาใช้เกี่ยวกับงานทางพันธุวิศวกรรมคือแบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโสจินิค ซึ่งเช่น λ phage ที่มีขนาดจีโนมประมาณ 49 กิโลเบส เป็น temperate phage ของ *E.coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปในดีเอ็นเอของ λ phage จะได้เป็นดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) จากนั้นนำเข้าสู่โฮสต์เซลล์แบคทีเรีย แบคเทอริโอเฟจจะนำดีเอ็นเอสายผสมแทรกเข้าไปในจีโนมของแบคทีเรียและใช้กลไกของโฮสต์เพื่อสร้างโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจรวมทั้งโปรตีนจากดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, 2540)

1 6794169
12 มิ.ย. 2558
สำนักหอสมุด
Q QR
291
ศ716
ส7765
2561

2.7.4 Bio-control

การศึกษาแบคเทอริโอเฟจที่มีอย่างแพร่หลายในปัจจุบันทำให้สามารถใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ช่วยลดแบคทีเรีย *Campylobacter* ในเนื้อไก่สด (Wagenaar, et al., 2005) ลดเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารสด หรือลดแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Bigot, et al., 2011) โดยปี ค.ศ. 2006 คณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐ (The U.S. Food and Drug Administration: USFDA) เชื่อว่าการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้โดยตรงค่อนข้างปลอดภัยและได้อนุมัติให้ฉีดพ่นแบคเทอริโอเฟจไปบนอาหารเพื่อป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรีย ในด้านการเกษตรแบคเทอริโอเฟจถูกนำไปใช้ช่วยลดแบคทีเรียก่อโรคหลายอย่างเช่น *C. jejuni*, *E. coli* และ *Salmonella* นอกจากนี้ในฟาร์มสัตว์ยังใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอเฟจควบคุมแบคทีเรีย *Lactococcus* และ *Vibrio* ในฟาร์มเลี้ยงปลา และควบคุมแบคทีเรีย *Erwinia amylovara* และ *Xanthomonas campestris* ในต้นพืชต่างๆ (Mahony, et al., 2011)

นอกจากนี้คุณสมบัติที่จำเพาะของ endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์จากแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (food industry) เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการและแบคทีเรียที่ก่อโรค (pathogenic bacteria) ที่อาจปนมาในอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่สุก สำหรับทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการสร้างพืชจำลองพันธุ์ (transgenic plant) ซึ่งมี phage endolysin gene เพื่อต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช เช่น การใช้ T4 lysozyme ในมันฝรั่งเพื่อป้องกันการทำลายจากเชื้อก่อโรคพืช *Erwinia carotovora* (De Vries, et al., 1999)

2.8 แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii*

แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* (*A. baumannii* phage) คือแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *A. baumannii* และใช้แบคทีเรียดังกล่าวในการเพิ่มจำนวน แบคเทอริโอเฟจลูกหลาน ในอดีต *A. baumannii* phage ยังมีการศึกษาอย่างไม่แพร่หลาย โดยในอดีต *A. baumannii* phage ได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลองโดย J.S. Soothill ในปี ค.ศ. 1992 พบว่าเมื่อนำเชื้อ *A. baumannii* ปริมาณ 5เท่าของ LD50 (1.5×10^8 CFU/mL) ใส่ในหนูทดลองเพื่อที่จะให้เกิดโรคติดเชื้อ จากนั้นทำการเติม *A. baumannii* bacteriophage ปริมาณ 10^2 อนุภาค ซึ่งสามารถที่ช่วยป้องกันให้หนูทดลองมีชีวิตรอดได้หลังจากที่ได้รับเชื้อ *A. baumannii* โดยเทียบกับการติดเชื้อที่ไม่มีการใช้แบคเทอริโอเฟจรักษา (Soothill, 1992) หลังจากมีการดื้อยาต้านจุลชีพและการเพิ่มความรุนแรงของการติดเชื้อ *A. baumannii* ส่งผลทำให้ยาต้านจุลชีพที่มีอยู่ใช้รักษาในปัจจุบันไม่ได้ผลเท่าที่ควร จึงมีการศึกษาแบคเทอริ

โอเฟจเพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมและรักษา ซึ่งในปัจจุบันทำให้มีการแยกและศึกษา *A. baumannii* phage เพิ่มขึ้น แสดงตารางที่ 1 จากการศึกษาของ Lin และคณะ (2010) ได้มีการแยก และศึกษาลักษณะของ *A. baumannii* phage เป็นครั้งแรกในประเทศไต้หวัน โดยพบว่าสามารถแยก *A. baumannii* phage ได้ 10 สายพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นแบคเทอริโอเฟจในกลุ่มของ caudovirales order ซึ่งประกอบไปด้วย แฟมิลีของ*Podoviridae* และแฟมิลีของ *Myoviridae* จากนั้นเลือกศึกษา ØAB2 ซึ่งมีจีโนมเป็น dsDNA ขนาด 40 Kb เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนขนาด 2.1 Kb พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับ Tubular protein A และ B ของ *P. aeruginosa* phage LKA1 โดย ØAB2 เป็นสมาชิกอยู่ในแฟมิลีของ *Podoviridae* และ ØAB2 เป็นแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* ATCC17978 มีการเกาะติดเซลล์ (adsorption) อย่างรวดเร็ว (> 99% adsorbed ใน 8 นาที), มีช่วง latent period ที่สั้น (<10 นาที) และมีขนาด burst ประมาณ. 200 PFU/infected cell จากการศึกษาของ Lai และคณะ (2011) โดยนำ ØAB2 endolysin gene (*LysAB2*) ไปผลิตโปรตีน endolysin (LysAB2) เพื่อนำไปทดลองในการทำลายแบคทีเรียพบว่าสามารถทำลายผนังเซลล์ของ *A. baumannii* และ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้ LysAB2 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 20 – 40 องศาเซลเซียส และ มีความเสถียรในช่วง pH 4 - 8 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Yang และคณะ (2011) ที่มีการแยกและศึกษาลักษณะของ AB1 ซึ่งเป็น *A. baumannii* phage ที่จัดอยู่ในแฟมิลีของ *Siphoviridae* มีจีโนมเป็น dsDNA ขนาด 45.2 - 46.9 Kb เมื่อทดสอบความทนทานพบว่าสามารถอยู่รอดในอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ได้นาน 60 นาที และทนต่อ pH ในช่วง pH 5.0 – 9.0 เป็นแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* มีการเกาะติดเซลล์ (adsorption) อย่างรวดเร็ว มีช่วง latent period ที่สั้น (< 8 นาที) และมีขนาด burst ประมาณ 409 PFU/infected cell จากนั้น Lee และคณะ (2011) ได้แยกแบคเทอริโอเฟจ Apb53 ที่จำเพาะต่อ *A. baumannii* Ab53 ซึ่งแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวแยกจากเสมหะผู้ป่วยรายหนึ่ง เมื่อนำไปศึกษาพบว่า Apb53 จัดจำแนกอยู่ในแฟมิลีของ *Myoviridae* มีกรดนิวคลีอิกเป็น dsDNA ขนาด 95 Kb คุณสมบัติทางสรีรวิทยาพบว่าการเกาะติดเซลล์ (adsorption > 99%) อย่างรวดเร็วภายใน 5 นาที รวดเร็ว มีช่วง latent period ที่สั้น (< 10 นาที) และมีขนาด burst ประมาณ 150 PFU/infected cell และมีความสามารถในการติดเชื้อ (host range) ที่ 27% ของการทดสอบเชื้อ MDRAB สายพันธุ์อื่นๆ สำหรับแบคเทอริโอเฟจ AP22 ที่มีการแยกและศึกษาลักษณะโดย Popova และคณะ (2012) พบว่า AP22 ที่แยกจากวัสดุทางการแพทย์ของโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในประเทศรัสเซีย เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติคเฟจ จำแนกอยู่ในแฟมิลีของ *Myoviridae* และ AP22 ยังมีสารพันธุกรรมเป็น dsDNA ขนาด 46 Kb คุณสมบัติทางสรีรวิทยาพบว่าการเกาะติดเซลล์ (adsorption > 99%) อย่าง

รวดเร็วภายใน 5 นาที และมีขนาด burst ประมาณ 240 PFU/infected cell และมีความสามารถในการติดเชื้อ (host range) ที่กว้างถึง 68% (89/130)ของการทดสอบเชื้อ MDRAB สายพันธุ์อื่นๆ สำหรับการศึกษาของ Yele และคณะ (2012) ที่ทำการแยกแบคเทอริโอเฟจ AB7-IBB1 จากน้ำเสีย และนำมาศึกษาลักษณะทางชีววิทยา อณูชีววิทยา และผลต่อการสร้าง biofilm ของ *A. baumannii* พบว่า AB7-IBB1 สามารถจัดจำแนกอยู่ในแฟมิลีของ *Siphoviridae* และมีกรดนิวคลีอิกเป็น dsDNA ขนาด 75 Kb สำหรับคุณสมบัติทางสรีรวิทยาพบว่ามีการเกาะติดเซลล์ (adsorption > 99%) อย่างรวดเร็วภายใน 5 นาที มีช่วง latent period น้อยกว่า 10 นาที และมีขนาด burst ประมาณ. 125 PFU/infected cell ผลการศึกษาแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวต่อการสร้าง biofilm พบว่าสามารถมีผลต่อการควบคุมการสร้าง biofilm ของเชื้อ *A. baumannii* AIIMS 7 ทั้ง biotic surface (human embryonic kidney 293 cell line) และ abiotic surface (polystyrene) ส่วนการศึกษาของ Thawal และคณะ (2012) ที่มีการแยกและศึกษาลักษณะของ AB7-IBB2 ซึ่งจัดอยู่ในแฟมิลีของ *Podoviridae* มีจีโนมเป็น dsDNA ขนาด 170 Kb และมีการเกาะติดเซลล์ (adsorption) อย่างรวดเร็วภายใน 4 นาที มีช่วง latent period ที่ 25 นาที และมีขนาด burst ประมาณ 22 PFU/infected cell เมื่อนำไปศึกษาการควบคุม biofilm พบว่า สามารถยับยั้งไม่ให้มีการสร้าง biofilm ของ *A. baumannii* AIIMS 7 และ ทำลาย biofilm ที่เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสร้างขึ้น (Thawal, et al., 2012) นอกจากนี้การศึกษาของ Jin และคณะ (2012) พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ZZ1ที่แยกได้จากน้ำบ่อเลี้ยงปลา โดยจำแนกอยู่ในแฟมิลีของ *Myoviridae* และ ZZ1 ยังมีสารพันธุกรรมเป็น dsDNA ขนาด 116 Kb คุณสมบัติทางสรีรวิทยาพบว่าการเกาะติดเซลล์ (adsorption > 99%) อย่างรวดเร็วภายใน 9 นาที และมีขนาด burst ประมาณ 200 PFU/infected cell เมื่อทดสอบความทนทานพบว่าสามารถอยู่รอดในอุณหภูมิที่ 50 - 60 องศาเซลเซียส และทนต่อความเป็นกรดด่างในช่วง pH 4.0 – 9.0

ตาราง 1 แสดงการศึกษาแบคทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ในปัจจุบัน

Phage name	*A. baumannii* strains	Source	Family	TEM		DNA size(Kb)	reference
				Head (nm)	Tail (nm)		
ϕAB2	ATCC17978	Wastewater (Taiwan)	*Podoviridae*	60	9	40	Lin และคณะ(2010)
AB1	KD311 (Clinical strain)	Marine sediment (China)	*Siphoviridae*	50	80	45.2 - 46-9	Yang และคณะ(2011)
Apb53	Ab53 (Clinical strain)	Sputum sample (Taiwan)	*Myoviridae*	59	93 - 150	95	Lee และคณะ (2011)
AP22	1053 (Clinical strain)	Clinical materials (Russia)	*Myoviridae*	64	85 - 90	46	Popova และคณะ (2012)
AB7-IBB2	AIIMS7 (Clinical strain)	Sewage (India)	*Podoviridae*	35	7	170	Thawal และคณะ(2012)

ตาราง 1 (ต่อ)

Phage name	*A. baumannii* strains	Source	Family	TEM		DNA size(kb)	reference
				Head (nm)	Tail (nm)		
AB7-IBB1	AIIMS7 (Clinical strain)	Sewage (India)	*Siphoviridae*	50	240	72.5 - 74	Yele และคณะ (2012)
ZZ1	AB09V (Clinical strain)	Fishpond water (China)	*Myoviridae*	100	120	166.682	Jin และคณะ (2012)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1.สายพันธ์แบคทีเรียและสายพันธ์แบคเทอริโอฟาจที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้จะใช้เชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลพุทธชินราช (Niumsup et al., 2009) โดยแบคทีเรีย *A. baumannii* จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth (Criterion,USA) LB agar (Criterion,USA) และใช้แบคเทอริโอฟาจสายพันธุ์ ที่ ØABP-01, ØABP-02 และ ØABP-04 แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคเทอริโอฟาจที่นำมาศึกษาควรเป็นแบคเทอริโอฟาจที่มีความสามารถในการทำลาย host cell เร็วและมีความสามารถในการทำลาย host cell ได้หลายสายพันธ์

1.1 การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอฟาจและการศึกษาหาปริมาณแบคเทอริโอโดยวิธี Plaque assay

การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอฟาจ (Propagation of phage) จะทำโดยใช้วิธีของ Su และคณะ (1998) โดยการนำแบคทีเรีย A. baumannii เพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร LB broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 - 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm เติมแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโฮสท์โดยใช้อนุภาคแบคเทอริโอฟาจมีค่า Multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 0.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง LB broth ใส จากนั้นเติม Chloroform เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกเพื่อปลดปล่อยอนุภาคแบคเทอริโอฟาจออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15 นาที เพื่อทำการแยกเศษเซลล์ที่แตกออกไป ส่วนน้ำใสด้านบนจะถูกกรองโดยใช้ syringe filter ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในหลอดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2 การศึกษาความสามารถการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ (Wang, 2006)

นำแบคทีเรีย *A. baumannii* เพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร LB broth ปริมาณ 50 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 - 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm เติมแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโฮสท์ โดยใช้ปริมาณไวรัสต่อแบคทีเรียมีค่า MOI เท่ากับ 1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

600 nm ทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แสดงถึงการเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ (phage-induced lysis)

2. การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

2.1 การแยกอนุภาคของแบคเทอริโอฟาจให้บริสุทธิ์ (Purification phage particle)

การแยกอนุภาคของแบคเทอริโอฟาจให้บริสุทธิ์ดัดแปลงมาจาก Yamamotoและคณะ (1970) โดยนำแบคเทอริโอฟาจ ตามวิธีการทดลอง 2 มาเติมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกน้ำใสเติม Polyethylene Glycol 8000 (PEG8000) ใช้ความเข้มข้นเท่ากับ ร้อยละ 8 – 10 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสทิ้ง และนำแบคเทอริโอฟาจที่ตกตะกอนมาละลายใน SM buffer เก็บอนุภาคของแบคเทอริโอฟาจที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอฟาจ

การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอฟาจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดัดแปลงมาจาก Seed และคณะ (2005) โดยนำอนุภาคของแบคเทอริโอฟาจที่บริสุทธิ์ ในวิธีการทดลอง 2.5 หยดลงบนกริด (Grid) เป็นเวลา 3-5 นาทีแล้วล้างด้วย 1mM EDTA จากการนั้นย้อมด้วย Uranyl acetate ร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 1 นาที ใช้กระดาษกรองซับหรือแตะบริเวณรอบๆของกริด แล้วผึ่งกริดให้แห้งในอากาศ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

3. การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ อีซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานีไอ แบคเทอริโอฟาจ

3.1 การศึกษาลักษณะโปรตีนของแบคเทอริโอแบคเทอริโอเฟจ (Analysis of phage protein)

นำแบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มจำนวนปริมาณ 50 มิลลิลิตร ตามวิธีการทดลอง 2.4 มาเติมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกน้ำใสใสในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติม PEG8000 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ ร้อยละ 8 – 10 (8 - 10% (w/v)) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาทีเป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสทิ้ง และนำแบคเทอริโอเฟจที่ตกตะกอนมาละลายใน Phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS pH7.2) แล้วนำมาผสมกับ sample buffer (62.5

mMTris-HCL pH 6.8, 5% 2-mercaptoethnol, 2% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol และ 0.01% bromphenol blue) นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแยกขนาดโปรตีนใน 15% SDS-polyacrylamidegel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที และนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย 0.125% Coomassie blue R-250 นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงล้างสีย้อมด้วย Destain solution นาน 1 คืน

3.2 การศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอของ อซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจ

นำแบคทีเรีย *A. baumannii* มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร LB broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 - 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm เติมแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียโฮสท์ โดยใช้ปริมาณไวรัสต่อแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 0.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง LB broth ใส จากนั้นเติม Chloroform นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และปลดปล่อยอนุภาคแบคเทอริโอฟาจออกมาเติม DNase I ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือ(NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบ/นาทีเป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกน้ำใสและเติม PEG8000 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ ร้อยละ 8 – 10 (8 - 10% (w/v)) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสทิ้ง และนำแบคเทอริโอฟาจที่ตกตะกอนมาละลาย SM buffer และ Chloroform ผสมให้เข้ากันเพื่อแยก PEG8000 ออก ดูดน้ำสีขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วแยกน้ำใส ผสมกับ TE buffer (pH8.0) 60 ไมโครลิตรและ 10% sodium dodecyl sulfate (10% SDS) นำไปบ่ม water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม Phenol 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นแยกน้ำใสด้านบนสุดปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 3M Sodium acetate และ isopropanol แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 5 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายใน TE buffer(pH8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม potassium acetate (8 โมลาร์) และ isopropanol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 5 นาทีตะกอนดีเอ็นเอมาล้างด้วย

ethanol ร้อยละ 70 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 5 นาทีทิ้งน้ำใสแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอละลายใน TE buffer นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจด้วยเอนไซม์จำเพาะ

นำดีเอ็นเอแบคเทอริโอฟาจปริมาณ 1 µg ที่สกัดในการทดลอง 3.2.1 มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะชนิดต่างๆได้แก่ *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sph*I, *Bam*HI และ *Sma*I จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (2.5 % gel) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานนำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้น ตรวจดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.3 การตรวจหา endolysin gene ใน bacteriophage

Genomic DNA จากเชื้อแบคเทอริโอฟาจทั้ง 3 สายพันธ์ที่นำมาศึกษาจะถูกสกัดโดยใช้วิธีดังข้อ 3.2 และเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้เป็น template ของ การทำ PCR การตรวจสอบ endolysin gene และ ทำโดยวิธี PCR โดยใช้ primer ซึ่งออกแบบโดยใช้ bacteriophage genome จาก GenBank Database of the National Centre for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรมสังเคราะห์ primer จาก biology workbench (http://workbench.sdsc.edu/) PCR product ที่ได้จะถูกศึกษาโดยใช้ 0.7% agarose gel ที่ย้อมสี DNA ด้วย ethidium bromide 0.5 µg/ml กำหนดความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำ DNA ที่แยกได้ไปตรวจหาโดยดูภายใต้แสง UV

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ

เตรียม insert DNA โดยนำดีเอ็นเอแบคเทอริโอฟาจปริมาณ 1 µg ที่สกัดในการทดลอง 4.1.1 มาตัดโดยใช้ restriction enzyme EcoRI หรือ HindIII และเตรียม Vector โดยใช้ pBluescript® II XR Vector (Stratagene) 0.5 µg มาตัดโดยใช้ restriction enzyme EcoRI หรือ HindIII จากนั้นนำ insert DNA และ Vector มาผ่านชุด PCR Purification Kit เพื่อกำจัด restriction enzyme เตรียม ligation mixture เพื่อเชื่อม insert DNA และ Vector โดยใช้เอ็นไซม์ ligase จากนั้นนำ ligation mixture มา 2 ul เติมลงไปใน 200ul competent cells E. coli DH5 α ทิ้งไว้ในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที และใช้ไปเปทดูด transformation mixtures ใส่บนจานอาหาร LBA ที่มี ampicillin/ IPTG/ X-GAL ต่อเพลท และเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

ใดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม บ่มจานอาหารที่ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน เก็บโคลนที่มีสีฟ้านำไปสกัดแยก plasmid และตัดด้วย restriction enzyme เพื่อคัด plasmid ที่มี insert DNA ขนาดต่างๆและนำ plasmid ที่มี insert DNA และนำ plasmid ที่ สกัดไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ T7 Promoter Sequencing Primer ผลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และแปลผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) และแปลผลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นโปรตีนโดยใช้โปรแกรม BLASTx (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) พร้อมทั้งศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจในงานวิจัยครั้งนี้กับแบคเทอริโอฟาจจากกลุ่มวิจัยอื่น (Lin et al., 2010) ซึ่งมีข้อมูลอยู่ใน gene bank โดยใช้โปรแกรม blast

ผลการวิจัย (Result)

การศึกษาความสามารถการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ (lytic activity)และ รูปร่างลักษณะของแบคเทอริโอฟาจ

ØABP-01, ØABP-02 และ ØABP-04 ที่มีความสามารถการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ (lytic activity) สูงร่วมกับมีความสามารถการทำลาย *A. baumannii* ได้หลายสายพันธ์ ได้ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ØABP-01 สามารถทำลายแบคทีเรีย *A. baumannii* ได้ทุกสายพันธ์ที่นำมาศึกษา (จำนวน 12 สายพันธ์) ส่วน ØABP-02 และ ØABP-04 ทำลายแบคทีเรีย *A. baumannii* ได้ 50 % (จำนวน 6 สายพันธ์) โดยมีเพียง ØABP-01 และ ØABP-02 ที่มีความสามารถการทำลาย *A. baumannii* ATCC 19606 ได้ การศึกษาความสามารถการทำลายแบคทีเรียสปีชีส์อื่น (Host range analysis) โดยใช้แบคทีเรีย 14 สปีชีส์ พบว่าแบคเทอริโอฟาจทั้งสามมาสามารถทำลายแบคทีเรียสปีชีส์อื่นได้ แบคเทอริโอฟาจทั้งสามให้ลักษณะของพลาคที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 5 และตารางที่ 2 พลาคของ ØABP-01 เป็นวงใสมีขนาดใหญ่ (3-8 mm) ส่วนพลาคของ ØABP-02 เป็นวงใสขนาดเล็ก (1-2mm) และมีวงขุ่นล้อมรอบ ส่วนพลาคของ ØABP-04 เป็นวงใส และมีวงขุ่นล้อมรอบ เมื่อนำอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ มาศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า แบคเทอริโอเฟจทั้งหมดสามารถจัดจำแนกได้ 2 แฟมิลิ โดยแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 78 นาโนเมตร และมีส่วนหางขนาด 9 นาโนเมตร ตามลำดับ จากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกอยู่ในแฟมิลิ Podoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV) ส่วนแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 และ ØABP-04 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 – 105 และ 72 nm ตามลำดับ และมีส่วนหางที่สามารถยืดหดได้ขนาด 67-125 และ 110 nm ตามลำดับ สามารถจัดจำแนกอยู่ในแฟมิลิ Myoviridae ดังแสดงในรูปที่ 6

Phage physiology, protein profile and DNA restriction fragment patterns

จากผลการศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจแต่ละสายพันธุ์ที่มีค่า MOI เท่ากับ 1 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง แบคเทอริโอเฟจ ØABP-01ทำลายแบคทีเรียโฮสท์ได้ไวกว่าแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์อื่น ทำให้ค่าความขุ่นที่ OD600 เท่ากับ 0.15 แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง แบคเทอริโอเฟจแต่ละสายพันธุ์สามารถทำลายแบคทีเรียโฮสท์ทำให้ค่าความขุ่นที่ OD600 ของแบคทีเรียโฮสท์มีค่าลดลงต่ำกว่า 0.1 ดังแสดงในภาพที่ 7 จาก

การศึกษาการเข้าเกาะติดแบคทีเรียเซลล์โฮสท์ของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าการเข้าเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 กับแบคทีเรียโฮสท์ในอุณหภูมิห้อง สามารถตรวจหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่ไม่สามารถจับกับผิวเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์ได้ร้อยละ 6 ภายในเวลา 6 นาที ตามลำดับ ส่วนแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 และ ØABP-04 สามารถตรวจหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่ไม่สามารถจับกับผิวเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์ได้ร้อยละ 15 และ 20 ภายในเวลา 6 นาที ตามลำดับ โดยแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเข้าเกาะติดกับผิวเซลล์ของแบคทีเรียโฮสท์ได้มากกว่าร้อยละ 95 ภายในเวลา 8 นาที (ตารางที่ 2) จากการศึกษาการสลายทำให้เกิดการเจริญในขั้นตอนเดียวของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเติมปริมาณไวรัสต่อแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 0.001 พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 มีช่วงเวลาตั้งแต่แบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์จนกระทั่งตรวจพบอนุภาคแบคเทอริโอเฟจลูกหลานที่สมบูรณ์ออกมาจากเซลล์(Latent period) เท่ากับ 15 นาที และมีจำนวนแบคเทอริโอเฟจลูกหลานต่อการติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจหนึ่งอนุภาค (Burst size) ประมาณ 110 PFU/infected cell ดังแสดงในภาพ 8(A) ส่วนแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02และ ØABP-04 มีช่วงเวลาตั้งแต่แบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์จนกระทั่งตรวจพบอนุภาคแบคเทอริโอเฟจที่สมบูรณ์ออกมาจากเซลล์ (Latent period) เท่ากับ 20 นาที และมีจำนวนแบคเทอริโอเฟจลูกหลานต่อการติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจหนึ่งอนุภาค (Burst size) ประมาณ 120 และ 150 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 8(B) และ 8(C) เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจไปทดสอบความทนในการอยู่รอดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยผลการทดลอง พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ØABP-1, ØABP-02และ ØABP-04 สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ได้ร้อยละ 96, 99 และ 96 ตามลำดับ จากการทดสอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความทนต่ออุณหภูมิของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวสามารถทนได้ลดลงเหลือร้อยละ 32, 45, 36, 33 และ 38 ตามลำดับ แบคเทอริโอเฟจทั้งหมดสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส ได้น้อยกว่าร้อยละ 8 นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่า แบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่สามารถทนอยู่รอดได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ ทดสอบความทนของการอยู่รอดในสภาวะ pH ต่างๆ เป็นเวลาข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง จากผลการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02และ ØABP-04 สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่างได้ดีอยู่ในช่วง 5.0 – 9.0 ส่วน ØABP-1สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่างได้ดีอยู่ในช่วง 6.0 – 9.0 นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกทำลายหมดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 (ตารางที่ 2)

เมื่อนำอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจแต่ละสายพันธุ์มาตกตะกอนด้วย PEG8000 แล้วตรวจสอบรูปแบบของโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในภาพ 9A จากผลการทดลอง พบว่า ØABP-01(Lane 1)

มีรูปแบบโปรตีน โดยมีโปรตีนหลักขนาดประมาณ 28 kDa และมีหลายๆโปรตีนย่อย อยู่ในช่วง 20 - 97 kDa ส่วนแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 (Lane 2) มีโปรตีนหลักอยู่ 3 แบน ซึ่งมีขนาดประมาณ 25, 29 และ 45 kDa และมีหลายๆโปรตีนย่อย แบคเทอริโอเฟจ ØABP-04 (Lane3) โปรตีนหลักอยู่ 3 แบน ซึ่งมีขนาดประมาณ 22, 32 และ 50 kDa และมีหลายๆโปรตีนย่อย เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ØABP-01, ØABP-02 และ ØABP-04 มาสกัด genomic DNA จากนั้นนำ DNA ของแบคเทอริโอเฟจทั้งหมดมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส และนำ DNA บริสุทธิ์ของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 สายพันธุ์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Sph*I, *Pst*I และ *Sma*I จากผลการทดลองพบว่า DNA ของ ØABP-01 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Sph*I แต่ไม่ถูกตัดด้วย *Pst*I และ *Sma*I ดังแสดงในภาพที่ 10A DNA ของ ØABP-02 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในภาพ 10B DNA ของ ØABP-04 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Sph*I แต่ไม่ถูกตัดด้วย *Pst*I และ *Sma*I ดังแสดงในภาพ 10C

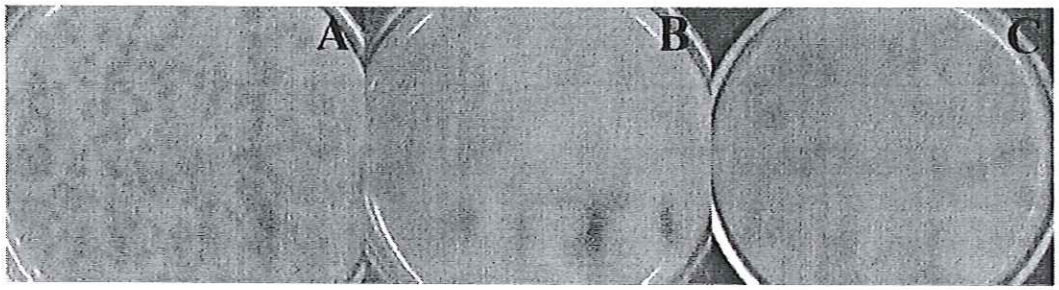
Detection of endolysin gene

การตรวจหา endolysin gene ทำโดยใช้วิธี PCR เพื่อตรวจหา endolysin gene (*lys*) ที่มี PCR product ขนาด 530 bp ซึ่งผลแสดงดังภาพ 9B โดยพบว่าสามารถตรวจหา endolysin gene ใน phage genomic ของ ØABP-01 และ ØABP-04 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ØABP-01พบมีความคล้ายคลึง 95 %กับ endolysin gene (lys) ของ phage phiAB1 (Gene bank accession no.HQ186308.1) และ phiAB2 (Gene bank accession no. HM755898.1) และมีความคล้ายคลึง 94 % กับ endolysin gene (lys) ของ Acinetobacter phage AB3 (Gene bank accession no.KC311669.1) ใน GenBank ขณะที่ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ØABP-04 พบมีความคล้ายคลึง 93% กับ phage phiAB1 (Gene bank accession no.HQ186308.1) และ phiAB2 (Gene bank accession no.HM755898.1) และมีความคล้ายคลึง 92 % กับ Acinetobacter phage AB3 (Gene bank accession no.KC311669.1)

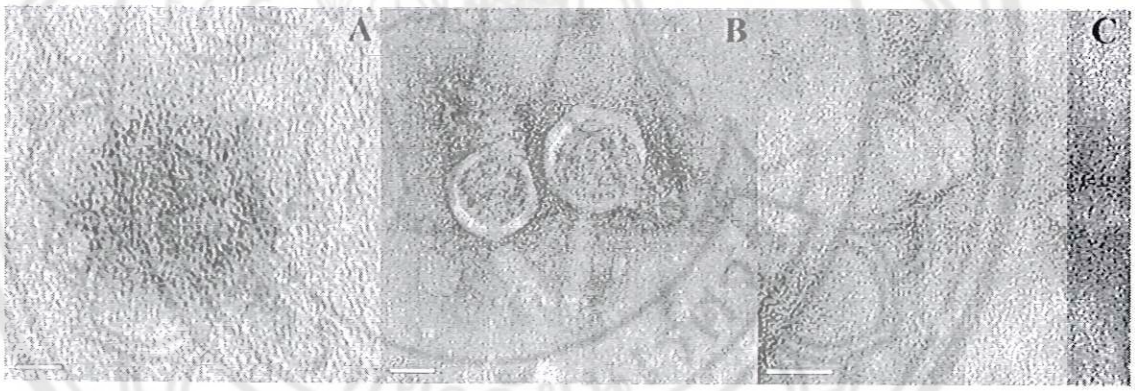
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมบางส่วนของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ

เมื่อทำการโคลน genomic DNA ของ ØABP-01 ใน plasmid และตัดด้วย restriction enzyme *Hin*dIII เพื่อคัด plasmid ที่มี insert DNA ขนาดต่างๆผลแสดงดังภาพที่ 11 จากนั้นคัดเลือก plasmid ที่มี insert DNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ T7 Promoter Sequencing Primer ผลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และแปลผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของอซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอฟาจ โดยใช้

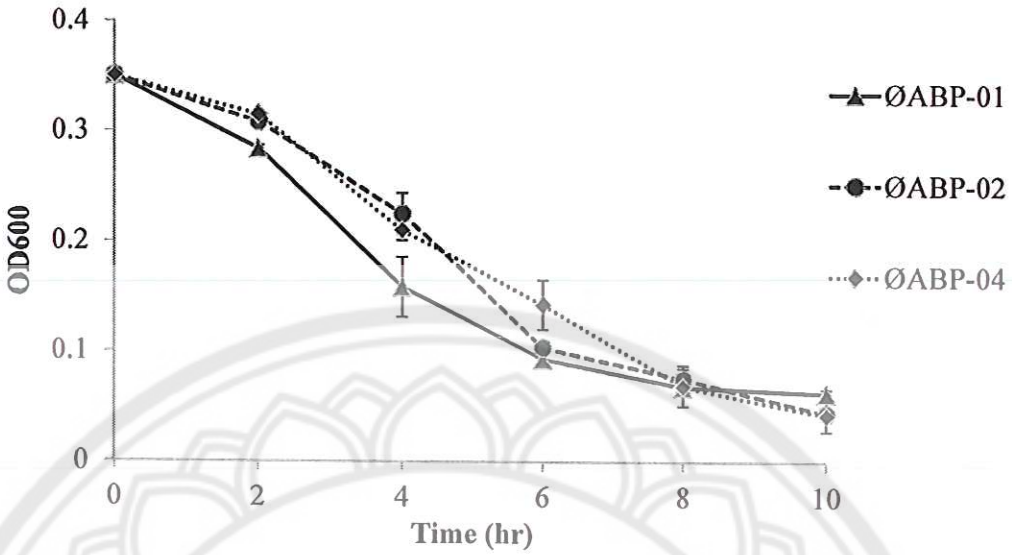
โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) และแปลผลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นโปรตีนโดยใช้โปรแกรม BLASTx (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) ดังแสดงในตารางที่ 3



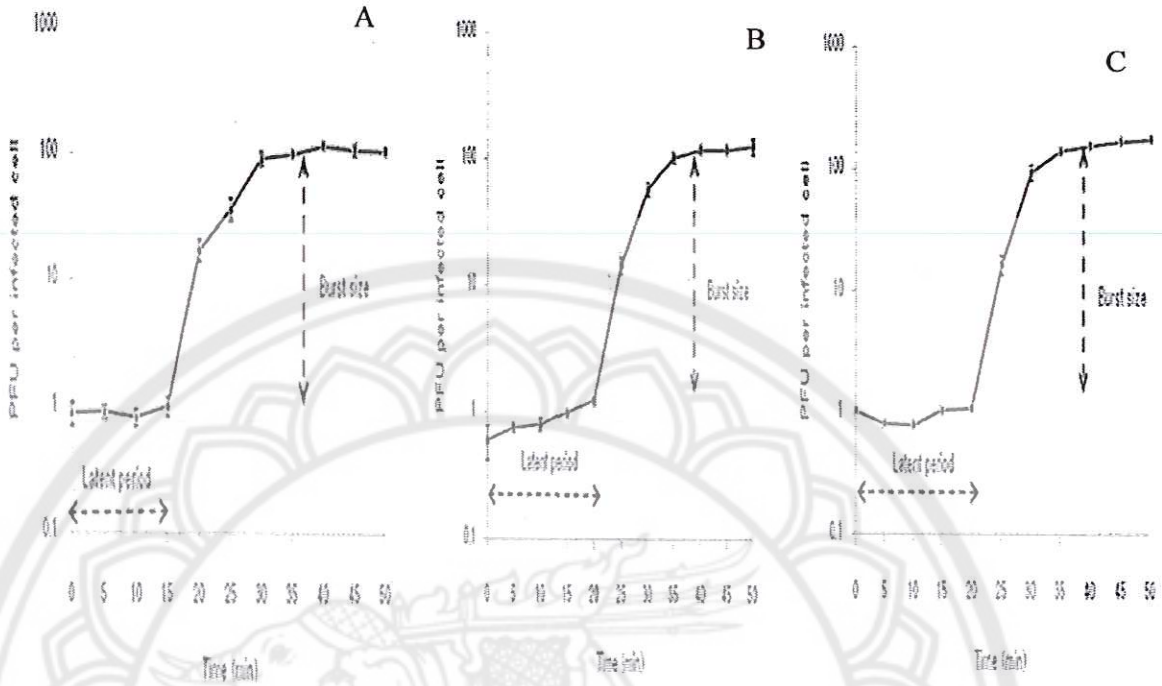
รูปที่ 5 The appearance of plaques on a bacterial lawn formed by three *A. baumannii* bacteriophages. A) ØABP-01 plaque characteristic showed large clear zone. B) ØABP-02 plaque characteristic showed small clear zone inside with large opaque zone around. C) ØABP-04 plaque characteristic showed clear zone inside with an opaque zone around.



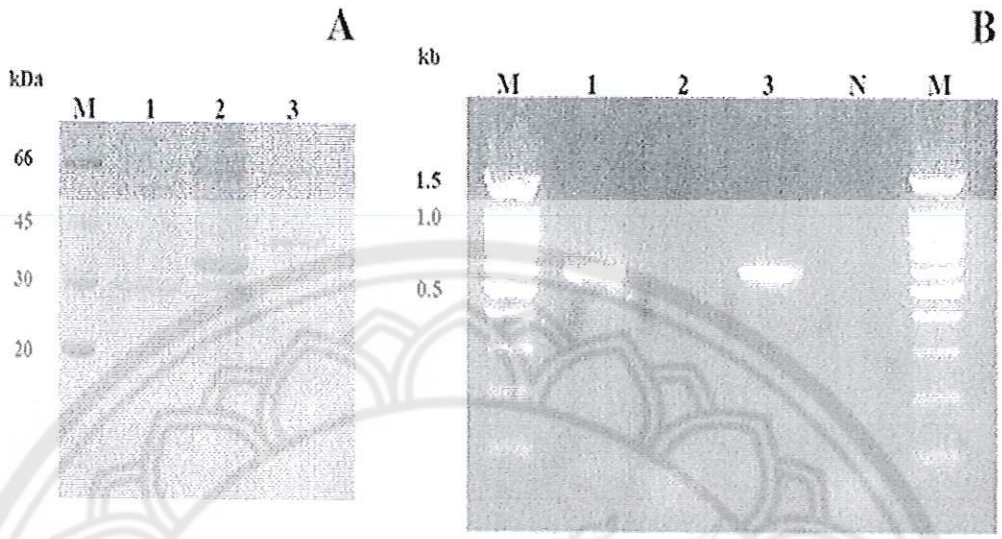
รูปที่ 6 Electron micrograph of *A. baumannii* bacteriophages. A) ØABP-01, B) ØABP-02 and C) ØABP-04



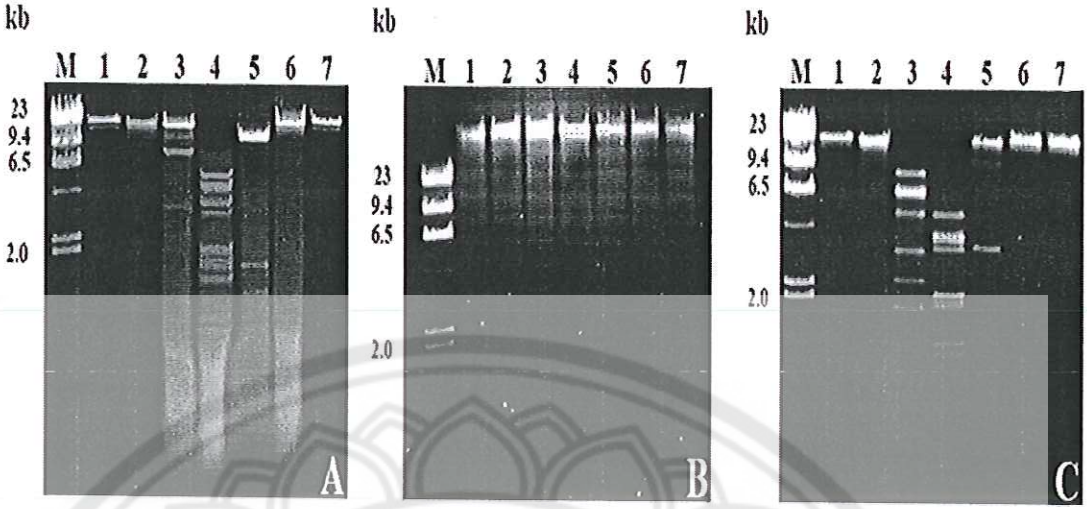
รูปที่ 7 Lytic activity of *A. baumannii* phages. Growth of *A. baumannii* in the presence of phage ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04. *A. baumannii* host was inoculated at an OD_{600} of 0.3, and after bacteriophage was added to the culture.



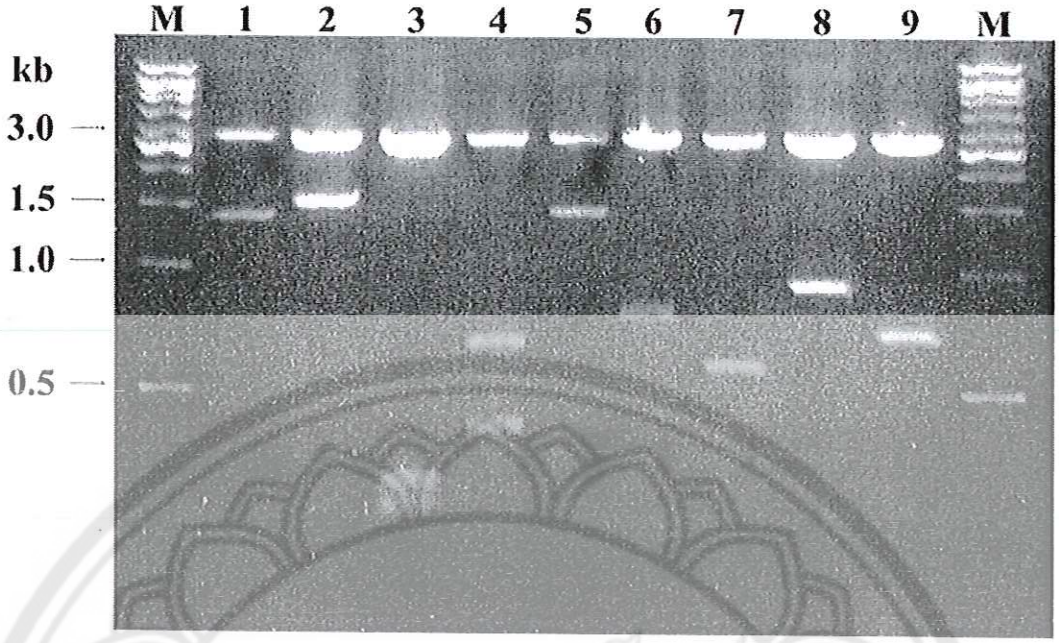
รูปที่ 8. One step growth of ØABP-01 (A), ØABP-02 (B) and ØABP-04 (C) bacteriophages against *A. baumannii* host strains.



รูปที่ 9. (A) SDS-PAGE analysis of *A. baumannii* bacteriophages. Lane M: molecular weight marker, Lane 1:Coomasie stain showing protein band of ØABP-01, Lane 2: Coomasie stain showing protein band of ØABP-02, Lane 3: Coomasie stain showing protein band of Coomasie stain showing protein band of ØABP-04 . (B) Amplification of endolysin gene from *A. baumannii* bacteriophages detected by 1 % agarose gel electrophoresis. Lane M; DNA marker, Lane1; ØABP-01, Lane 2; ØABP-02 , Lane 3; ØABP-04; Lane 4; Negative control



รูปที่ 10 Restriction pattern of *A. baumannii* bacteriophages. A) electrophoresis of Lambda DNA marker/HindIII (laneM); DNA of ØABP-01 uncut (lane 1); DNA of ØABP-01 cut with *Bam*HI (lane 2), *Eco*RI (lane3), *Hin*dIII (lane4), *Sph*I (lane5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7) B) electrophoresis of Lambda DNA marker/HindIII (laneM); DNA of ØABP-02 uncut (lane 1); DNA of ØABP-02 cut with *Bam*HI (lane 2), *Eco*RI (lane3), *Hin*dIII (lane4), *Sph*I (lane5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7) C) electrophoresis of Lambda DNA marker/HindIII (laneM); DNA of ØABP-04 uncut (lane 1); DNA of ØABP-04 cut with *Bam*HI (lane 2), *Eco*RI (lane3), *Hin*dIII (lane4), *Sph*I (lane5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7)



รูปที่ 11 Plasmid pBluscript containg phage genomic DNA clone cut with *Hin*dIII . Lane M: molecular weight marker, Lane 1: plasmid clone No 2,3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14

ตารางที่ 2 Phages isolated against *Acinetobacter baumannii* and theirs properties

Phage	Family	Plaque characteristic		One-step growth curve		Adsorption Time (min)	Stability	
		morphology	Size diameter (mm)	Latent period (min)	Burst size (PFU/infected cell)		pH	Temperature (°C)
ØABP-01	*Podoviridae*	Clear	5-7	15	110	8	6-9	50-70
ØABP-02	*Myoviridae*	Clear with turbid	6-8	20	120	8	5-9	50-70
ØABP-04	*Myoviridae*	Clear with turbid	3-5	20	150	8	5-9	50-70

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ phage genomic DNA บางส่วน

Clone ที่	ขนาดของ Insert	ORF	Homology
2	337 bp	✓ 98 aa M----------A	• Acinetobacter phage AB3 (hypothetical protein: AGC35306 = 1032 aa) identity 98% • Acinetobacter phage Abp1 (putative internal virion protein: AFV51021 = 1032 aa) identity 97% • Acinetobacter phage phiAB1 (putative internal virion core protein: ADQ12744 = 1032 aa) identity 94%
3	1,444 bp	✓ 454 aa M---------- ------L	• *A. baumannii* D1279779 (NAD-linked malate dehydrogenase: AGH34034 = 565 aa) identity 99% • *A. baumannii* MDR-TJ (malic enzyme: AFI97215 = 565 aa) identity 99% • *A. baumannii* MDR-ZJ06 (malate dehydrogenase: AEP04626 = 565 aa) identity 99%
4	1,641 bp	✓ 443 aa M---------- ---stop	• *A. baumannii* TYTH-1 (hypothetical protein: AFU37758 = 493 aa) identity 100% • *A. baumannii* MDR-TJ (type VI secretion system effector, Hcp1 family: AFI96010 = 167 aa) identity 100% (type VI secretion protein, EvpB/VC_A0108 family: AFI96011 = 493 aa) identity 100% • *A. baumannii* MDR-ZJ06 (conserve hypothetical protein: AEP05915 = 498 aa) identity 100% (conserve hypothetical protein: AEP05916 = 176 aa) identity 100%
5*	699	✓ 88 aa K--------stop (1-267) =DNA ligase ✓ 61 aa M----A (516-699)= DNA	• Acinetobacter phage Abp1 (hypothetical protein: AFV50996 = 326 aa) identity 99% • Acinetobacter phage phiAB1 (putative ATP-dependent DNA ligase: ADQ12720 = 328 aa) identity 99% • Acinetobacter phage AB3 (putative ATP-dependent DNA ligase: AGC35327 = 328 aa)

		polymerase	identity 97%
6	473 bp (257+216)	✓ 53 aa L----S (3-161) = reductase ✓ 76 aa M----S (244-471) = structural protein	• *A. baumannii* TYTH-1(hypothetical protein-Aldo-keto reductases (AKRs): AFU3978 = 333 aa) • *A. baumannii* MDR-TJ (putative oxidoreductase, aryl-alcohol dehydrogenase like protein: AFI93890 = 333 aa) • Acinetobacter phage phiAB1(structural protein: ADQ12734 = 83 aa)
8	1,051 bp (385+666)	✓ 268 aa M-------- stop (66-872) = helicase ✓ 55 aa M------stop (869-1033) = ligase	• Acinetobacter phage phiAB1 (putative DNA helicase: ADQ12719 = 432 aa) (putative ATP-dependent DNA ligase: ADQ12720 = 328 aa)
9	1,500 bp	✓ 117 aa M-----stop (126-476) = structural protein ✓ 299 aa M-----A (603-1500) = structural protein	• Acinetobacter phage Abp1 (hypothetical protein: AFV51020 = 961 aa) • Acinetobacter phage phiAB1(structural protein: ADQ12743 = 961 aa) • Acinetobacter phage AB3 (hypothetical protein: AGC35307 = 961 aa)
10	808 bp	✓ 265 aa L-----A (796-2) = internal virion protein	• Acinetobacter phage Abp1 (putative internal virion protein: AFV51021 = 1032 aa) identity 97% • Acinetobacter phage AB3 (hypothetical protein: AGC35306 = 1032 aa) identity 95%
11	176 bp	✓ 36 aa M-----stop (104-33) = DNA polymerase	• Acinetobacter phage Abp1 (DNA polymerase I: AFV50998 = 286 aa) identity 91%

12	579 bp	✓ 108 aa M--------- stop (76-402) = kinase ✓ 57 aa M--------A (411-579) = RNA polymerace	• Acinetobacter phage Abp1 (hypothetical protein: AFV51008 = 216 aa) identity 96% (phage-associated RNA polymerase: AFV51009 = 805 aa) identity 96% • Acinetobacter phage phiAB1 (putative dNMP kinase: ADQ12731 = 216 aa) identity 95% (putative RNA polymerase: ADQ12732 = 805 aa) identity 95%
13	945 bp	✓ 297 aa L--------A (892-1) = head-tail connector protein	• Acinetobacter phage phiAB1(putative head-tail connector protein: ADQ12735 = 518 aa) identity 99% • Acinetobacter phage Abp1 (head-to-tail joining protein: AFV51012 = 518 aa) identity 97% • Acinetobacter phage AB3 (putative head-tail connector protein: AGC35314 = 518 aa) identity 96%

ข้อวิจารณ์ (Discussion)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาทางสรีรวิทยาและอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01, ØABP-02 และ ØABP-04 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียโดยแบคเทอริโอเฟจทั้งสามพบว่ามีลักษณะรูปร่างและขนาดของพลาคจากการทำ Plaque assay แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างลักษณะรูปร่างและขนาดของพลาคนั้นเกิดจากความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียโฮสท์ โดยจากการศึกษา Gallet และคณะ (2011) พบว่าลักษณะรูปร่างและขนาดของพลาคเป็นผลที่เกิดจาก(1)ความจำเพาะของแบคทีเรียโฮสท์กับแบคเทอริโอเฟจ (2)ธรรมชาติของแบคเทอริโอเฟจ และ(3)ช่วงเวลาการบ่ม นอกจากนี้การแยกแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 ครั้ง พบว่ามีลักษณะรูปร่างและขนาดของพลาคแบ่งเป็น ลักษณะพลาคที่มีโซนใสและมีโซนขุ่นล้อมรอบมีขนาดประมาณ 3-5 mm ร้อยละ 43(23/54), ลักษณะพลาคที่มีโซนใสขนาดใหญ่มีขนาดประมาณ 3-8 mm ร้อยละ 33(18/54), ลักษณะพลาคที่มีโซนใสขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 1-2 mm ร้อยละ 15(8/54) และลักษณะพลาคที่มีจุดใสและมีโซนขุ่นล้อมรอบขนาดใหญ่ มีขนาดประมาณ 4-8 mm ร้อยละ 9(5/54) ตามลำดับ ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้บางไอโซเลตจะมีวงจรชีวิตแบบไลติคเฟจเช่น ØABP-01, ØABP-03, ØABP-21 และ ØABP-39 เป็นต้น เนื่องจากลักษณะของพลาคเป็นโซนใส ประกอบกับการทดสอบ spot test ก็พบว่าให้โซนใสเกิดกับแบคทีเรียโฮสท์แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้เกิดการทำลายแบคทีเรียโฮสท์เพื่อปล่อยแบคเทอริโอเฟจลูกหลานออกมาจึงทำให้แบคทีเรียโฮสท์ถูกทำลายจึงเป็นเกิดเป็นโซนใส (Kutter and Sulakvelidze, 2005) สำหรับลักษณะของพลาคที่มีโซนขุ่นล้อมรอบโซนใสนั้นเกิดจากบริเวณโซนใสนั้นแบคเทอริโอเฟจมีวงจรชีวิตแบบไลติคเฟจ ส่วนบริเวณโซนขุ่นล้อมรอบนั้นเกิดจากแบคเทอริโอเฟจติดเชื้อแบคทีเรียโฮสท์เริ่มแรกแบบไลติคเฟจเพื่อเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจลูกหลานจนถึงระยะหนึ่งแบคเทอริโอเฟจบางส่วนจะเปลี่ยนวงจรชีวิตเป็นแบบไลโสเจนิค โดยการส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าไปแทรกในโครโมโซมของแบคทีเรียแล้วเกิดการเพิ่มจำนวนตามการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียบริเวณนั้นเกิดเป็นโซนขุ่นเกิดขึ้น (Canchaya, et al.,2003) สำหรับการศึกษาความสามารถในการติดเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยการทำ spot test ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แบคเทอริโอเฟทั้งสามไอโซเลต สามารถติดเชื้อ *A. baumannii* ได้หลายๆไอโซเลตหรือมีคุณสมบัติในการติดเชื้อกว้าง โดยแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่ไวต่อการติดเชื้ออาจมีตำแหน่งตัวรับ(receptor site) ในการจับของแบคเทอริโอเฟจที่เหมือนกัน ในขณะที่แบคเทอริโอเฟจที่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อแคบ อาจมี receptor site ที่จำเพาะต่อการเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจสูง ความแตกต่างเหล่านี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแบคเทอริโอเฟจ และโครงสร้างของ receptor site ที่พิเศษอยู่บนผิว

เซลล์ของแบคทีเรีย (Rakhuba, et al., 2010) นอกจากนี้ผลการทดลองการติดเชื้อแบคทีเรีย สำหรับผลการศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ แบคเทอริโอเฟจทั้งหมดมีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมและมีส่วนหางยาวแตกต่างกัน โดยแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 สามารถจัดจำแนกอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* สอดคล้องกับงานวิจัยของLin และคณะ พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ØAB1, ØAB2, ØAB3, ØAB4, ØAB5, ØAB6, ØAB7 และ ØAB9 จัดอยู่ในในแฟมิลี *Podoviridae* (Lin, et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบในงานวิจัยของ Thawal และคณะ(2012) ศึกษาแบคเทอริโอเฟจ AB7-IBB2 พบว่าสามารถจัดจำแนกอยู่ในแฟมิลี Podoviridae สำหรับแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 และ ØABP-04 สามารถจัดจำแนกอยู่ใน แฟมิลี *Myoviridae* สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานการวิจัยที่พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ØAB8, ØAB11 (Lin, et al., 2010) AP22 (Popova, et al., 2012) และ Apb53 (Lee, et al., 2011) จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่ม Caudovirales ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีการค้นพบมากที่สุดจำนวนมากกว่าร้อยละ 96 ของแบคเทอริโอเฟจที่ถูกค้นพบทั้งหมดในปัจจุบัน (Ackermann, 2001: 2009)

จากการศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจต่อการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ พบว่า แบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำลายแบคทีเรียโฮสท์ตั้งแต่เวลา 2 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียโฮสท์สอดคล้องกับการศึกษาแบคเทอริโอเฟจ Apb53 พบว่าเมื่อเติมแบคเทอริโอเฟจที่มีค่า MOI เท่ากับ 1 ในแบคทีเรีย *A. baumanni* Apb53 ทำให้ค่าความขุ่นของแบคทีเรียโฮสท์ลดลงตั้งแต่เวลา 2 ชั่วโมง (Lee, et al., 2011) การทำลายแบคทีเรียโฮสท์แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถนำไปใช้ในการรักษา และควบคุมเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพได้ (Wang, 2006) สำหรับการศึกษาการเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจกับโฮสท์เซล ØABP-01 เกาะติดกับแบคทีเรียโฮสท์ได้ไวกว่าแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02และ ØABP-04 แสดงให้เห็นว่า ØABP-01 อาจมีตำแหน่ง receptor บนผิวเซลล์มากกว่าทำให้สามารถเข้าเกาะติดได้ไวกว่า (Lee, et al., 2011) ในการศึกษา One-step growth curve พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 มีช่วง Latent period สั้นกว่า แบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 และ ØABP-04 นอกจากนี้สิ่งที่น่าสนใจคือแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 มีค่า Burst size น้อยกว่า ØABP-02 และ ØABP-04 แสดงให้เห็นช่วงระยะเวลาอยู่ในเซลล์แบคทีเรียโสท์ของแบคเทอริโอเฟจมีผลต่อการเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจลูกหลาน (Gallet, Kannoly, and Wang, 2011) อีกสาเหตุหนึ่งที่อาจเป็นไปได้คือแบคเทอริโอเฟจ 3 สายพันธุ์ จัดอยู่ใน 2 แฟมิลี คือ *Podoviridae* และ *Myoviridae* จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า Podophage จะมีการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างประมาณ 40 โปรตีน ในขณะที่ Myophage

จะมีการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างประมาณ 200 โปรตีน ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ การประกอบรูปร่าง ภายในเซลล์มีความแตกต่างกัน (Aksyuk and Rossmann, 2011)

สำหรับการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อแบคเทอริโอเฟจพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ 3 สายพันธุ์ โดยแบคเทอริโอเฟจทั้งหมดจะสามารถอยู่รอดได้ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ได้ร้อยละ 8 สอดคล้องกับผลการทดสอบความทนต่ออุณหภูมิของแบคเทอริโอเฟจ AB1ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดได้ร้อยละ 10 (Yang, et al., 2011) สำหรับการทดสอบ pH พบว่าแบคเทอริโอเฟจ 3 สายพันธุ์ สามารถทนต่อ pH 4 - 9 ได้ดี แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจทั้งหมดมีความอยู่รอดในช่วง pH ที่กว้าง ดังที่พบในงานวิจัยของ Jin และคณะ (2012) จากการศึกษาแบคเทอริโอเฟจ ZZ1 พบว่าสามารถทนต่อ pH อยู่ในช่วง pH 4 – 9 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ และ pH เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อแบคเทอริโอเฟจในการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ (Jonczyk, et al., 2011) สำหรับการศึกษารูปแบบโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 สายพันธุ์ จากการศึกษาปรากฏว่าพบแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 มีโปรตีนหลักขนาดประมาณ 28 kDa และมีหลายๆโปรตีนย่อย ซึ่งโปรตีนหลักที่ปรากฏน่าจะเป็นแคปซิดซึ่งเป็นโปรตีนที่ล้อมรอบกรดนิวคลีอิก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และคณะ (2010) พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ØAB2 จัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* มีโปรตีนหลักขนาด 35 kDa เป็นแคปซิดโปรตีน และมีหลายๆโปรตีนย่อย ส่วนแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 จัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* มีโปรตีนหลักขนาด 25, 29 และ 45 kDa ซึ่งโปรตีนหลักขนาด 29 kDa น่าจะเป็นแคปซิดโปรตีน สำหรับแบคเทอริโอเฟจ ØABP-04 จัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* เมื่อพิจารณารูปแบบโปรตีนแล้วพบว่าโปรตีนหลักคล้ายกันซึ่งโปรตีนหลักขนาด 32 kDa น่าจะเป็นแคปซิดโปรตีน สอดคล้องกับลักษณะรูปแบบโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ AP22 พบว่าจัดอยู่ในแฟมิลี Myoviridae มีโปรตีนหลัก 3 ขนาดและมีหลายๆโปรตีนย่อย (Popova, et al., 2012) และ Abp53 พบว่าจัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* พบว่าโปรตีนหลักขนาด 32 kDa น่าจะเป็นแคปซิดโปรตีน (Lee, et al., 2011)

สำหรับการศึกษารูปแบบ DNA แบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 และ ØABP-04 มีขนาด DNA ประมาณ 23 kb ยกเว้น ØABP-02 มีขนาด DNA มากกว่า 23 kb เมื่อนำDNA ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ 6 ชนิด คือ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Sph*I, *Pst*I และ *Sma*I เพื่อยืนยันว่าแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้เป็นแบคเทอริโอเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ ผลปรากฏว่า แบคเทอริโอเฟจมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยรูปแบบ DNA ของ ØABP-01ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Sph*I ØABP-02 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะที่ใช้ในการทดลอง ØABP-04 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Sph*I

จากรูปแบบ DNA ของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01และ ØABP-04 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII มีแถบ DNA หลายขนาดเกิดขึ้นสอดคล้องกับ DNA ของแบคเทอริโอเฟจ AB7-IBB1(Yele, et al., 2012), AP22 (Popova, et al., 2012), Abp53 (Lee, et al., 2011) และ ØAB2 (Lin, et al., 2010) แต่ลักษณะรูปแบบ DNA นั้นมีลักษณะแตกต่างกัน นอกจากนี้ แบคเทอริโอเฟจที่คัดเลือกมีตำแหน่งบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์แตกต่างกันจากรูปแบบ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิด ดังนั้นจากผลการศึกษารูปแบบ DNA ของแบคเทอริโอเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ 6 ชนิด ยืนยันได้ว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้เป็นแบคเทอริโอเฟจคนละสายพันธุ์

แบคเทอริโอเฟจต้องการ เอ็นโดไลซิน ในการทำให้เกิดการแตกของผนังเซลแบคทีเรียในช่วงท้ายของ lytic cyle การตรวจหาเอ็นโดไลซิน ยีนในแบคเทอริโอเฟจทั้งสามสายพันธ์พบเฉพาะในสายพันธ์ ØABP-01 และ ØABP-04 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ØABP-01 และ ØABP-04 พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้งสองน่าจะมีวิวัฒนาการเชื่อมโยงกับแบคเทอริโอเฟจ phiAB1 และ phiAB2 ที่แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียในประเทศไต้หวันและ Acinetobacter phage AB3 ที่แยกได้จากประเทศจีน (Lin *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011). ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของจีโนมของ ØABP-01 พบว่าได้ 16 ORF โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับ Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 และ Acinetobacter phage AB3

สรุปผลการวิจัย

- **จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแบคเทอริโอฟาจ ØABP-01 ØABP-02 และ ØABP-04 พบว่า ØABP-01จัดอยู่ในแฟมิลี่ Podoviridae ส่วน ØABP-02 และ ØABP-04 จัดอยู่ในแฟมิลี่ Myoviridae**
- การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจทั้งสามพบอยู่ในช่วง 50 - 70 °C ØABP-02 และ ØABP-04 ทนต่อกรดด่างที่ pH 4.0 - 9.0 ส่วน ØABP-01ทนต่อกรดด่างที่ pH 5.0 - 9.0 แบคเทอริโอเฟจทั้งสามสามารถเกาะติดโฮลท์เซล 95 % ภายในเวลา 8 นาที One-step growth ของ ØABP-01, ØABP-02 และ ØABP-04 เท่ากับ15, 20 และ 20 นาทีตามลำดับ ส่วน burst sizes เท่ากับ 110, 120 and 150 PFU/cell ตามลำดับ
- การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ รูปแบบการถูกตัดด้วย restriction enzyme พบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้งสามมีความแตกต่างกัน
- การตรวจหา endolysin ขนาด 558 bp พบเฉพาะใน ØABP-01 และ ØABP-04 โดย endolysin gene มีความคล้ายคลึงกับ แบคเทอริโอเฟจ phiAB1 และ phiAB2
- การโคลนจีโนมของ ØABP-01ในเวกเตอร์ pBluescript และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของจีโนมของ ØABP-01 พบมีความคล้ายคลึงกับจีโนมของแบคเทอริโอเฟจ Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage Abp1 และ Acinetobacter phage AB3

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* ด้านสรีรวิทยาและอณูชีววิทยา โดยเฉพาะแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 ที่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อ *A. baumannii* กว้างและความสามารถในการทำลายแบคทีเรียโฮสท์ได้ดีเหมาะสำหรับงานพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในงานด้านการรักษาและควบคุมการติดเชื้อ *A. baumannii* ในอนาคตควรเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของเชื้อ *A. baumannii* ในการศึกษาความสามารถในการติดเชื้อของ แบคเทอริโอเฟจ เพื่อจะทราบความสามารถในการติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มากยิ่งขึ้น แบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 สามารถนำไปศึกษาการทำลาย biofilm ของเชื้อ *A. baumannii* ที่เป็นปัญหาต่อการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ นำไปศึกษาคุณสมบัติของ endolysin เพื่อนำไปผลิตเป็นเอนไซม์ทำลายแบคทีเรีย และนำไปพัฒนาผลิตเป็น phage cocktail เพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

พรรณทิพา จันทร์ทัง.(2553). การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียแลคติก ที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ กศ.ม., มหาวิทยาลัย ศรีนครินวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

นิศรา บุญเกิด.(2550). การดื้อยา carbapenem ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa*. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ. (2540). ไวรัสวิทยา.กรุงเทพฯ: อักษรสมัย.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). วิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพฯ: วี.เจ.พริ้นติ้ง.

ธวัชชัย กิตติ, วรรณา กะหวัง, ไอยนรรฐ กล้าหาญ, ดวงกมล ขันธเลิศ, พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ และ สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ (2555) การแยกและการศึกษาลักษณะแบคเทอริโอฟาจ ØNU001 ที่จำเพาะต่อ Acinetobacter baumannii A1589 ที่แยกจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (Proceeding) นำเสนอในงานวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 4 วันที่ 12-13 มีนาคม 2555 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Abedon, S. T., Hyman, P. and Thomas, C. (2003). Experimental examination of bacteriophage latent-period evolution as a response to bacterial availability. **Appl Environ Microbiol**, 69(12), 7499-7506.

Abedon, S. T.,Thomas-Abedon, C., Thomas, A. and Mazure, H. (2011). Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? **Bacteriophage**, 1(3), 174-178.

Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. **Arch Virol**, 146(5), 843-857.

Ackermann, H. W. (2009). Phage classification and characterization. **Methods Mol Biol**, 501, 127-140.

Adams, M.H. (1959). **Bacteriophages**. NewYork: Inter science Publishers.

Agnihotri, N, Gupta, V, Joshi, RM (2004). Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. Burns 30 :241–243.

Aksyuk, A. A. and Rossmann, M. G. (2011). Bacteriophage assembly. **Viruses**,3(3), 172-203.

Alvarez-Lerma, F., Palomar,M., Olaechea, P., Otal, J. J., Insausti, J. and Cerda, E. (2007). National study of control of nosocomial infection in intensive care units. evolutive report of the years 2003-2005. **Med Intensiva,** 31(1), 6-17

Bergogne-Berezin, E. and Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin Microbiol Rev,** 9(2), 148-165.

Bertin, A., de Frutos, M. and Letellier, L. (2011). Bacteriophage-host interactions leading to genome internalization. **Curr Opin Microbiol,** 14(4), 492-496.

Bigot, B., Lee, W. J., McIntyre, L., Wilson, T., Hudson, J. A., Billington, C., et al. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. **Food Microbiology,** 28(8), 1448-1452.

Biswas, B, Adhya, S, Washart, P, Paul, B, Trostel, AN, Powell, B, Carlton, R and Merril, CR (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. **Infect Immun** 70,204-210.

Bowler, P, Duerden, B, Armstrong, D (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin Microbiol Rev** 14(2) 244-69.

Bonomo, R. A. and Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis,** 43 (2), S49-56.

Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. and Brussow, H. (2003). Prophage genomics. **Microbiol Mol Biol Rev,** 67(2), 238-276.

Capparelli, R, Parlato, M, Borriello, G, Salvatore, P, Iannelli, D (2007). Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice. **Antimicrob Agents Chemother** 51(8), 2765-73.

Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, Couzigou C, Cattoen C, Chagnon JL, Nordmann P, Astagneau P (2005). Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum β-lactamase VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii in a hospital setting. **J Hosp Infect** 60,14–8.

Carter, J. and Saunders, V. (2007).**Virology principles and applications.** UK: John Wiley and Sons.

Chaiwarith, R., Mahatthanaphak, S., Boonchoo, M., Supparatpingy, K. and Sirisanthana, T. (2005). Pandrug-Resistant *acinetobacter baumannii* at Maharaj Nakorn Chiang Mai hospital. **J Infect Dis Antimicrob Agents,** *22*, 1- 8.

Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I. and Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii*invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiol**, 8, 216.

D'Herelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. **Comptes Rend Acad Sci Paris**, 165, 373-375.

De Vries, J., Harms, K., Broer, I., Kriete, G., Mahn, A., Düring, K., et al. (1999). The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, 22(2), 280-286.

Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. **Nat Rev Microbiol** 5(12), 939-51.

Dizbay, M.,Altuncekic, A., Sezer, B. E., Ozdemir, K.and Arman, D. (2008). Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. **Int J Antimicrob Agents**, 32(1), 29-32.

Duckworth, D. H. (1976). Who discovered bacteriophage?. **Bacteriol** Rev, 40(4), 793-802.

Erridge, C., Moncayo-Nieto, O. L., Morgan, R., Young, M. and Poxton, I. R. (2007). *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. **J Med Microbiol**, 56 (2), 165-171.

Eron, LJ (1999). Targeting lurking pathogens in acute traumatic and chronic wounds. **J Emerg Med,** 17(1),189-95.

Gaddy, J. A. and Actis, L. A. (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol,** 4(3), 273-278.

Gallet, R., Kannoly, S. and Wang, I. N. (2011). Effects of bacteriophage traits on plaque formation. **BMC Microbiol,** 11, 181.

Gehrlein, M., Leying, H., Cullmann, W., Wendt, S. and Opferkuch, W. (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumanii* is due to altered penicillin-binding proteins. **Chemotherapy,** 37(6), 405-412.

Gordon, N. C. and Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents,** 35(3), 219-226.

Hagens, S. and Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Appl Microbiol Biotechnol,** 76(3), 513-519.

Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **Int J Antimicrob Agents,** 30(2), 118-128.

Jin, J., Li, Z. J., Wang, S. W., Wang, S. M., Huang, D. H., Li, Y. H., et al. (2012). Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacterbaumannii* clinical isolates. **BMC Microbiol,** 12(1), 156.

Jonczyk, E., Klak, M., Miedzybrodzki, R. and Gorski, A. (2011).The influence of external factors on bacteriophages-review.**Folia Microbiol(Praha),** 56(3), 191-200.

Keerasuntonpong, A., Samakeenich, C., Tribuddharat, C. and Thamlikitkul, V. (2006). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections in Siriraj hospital. **Siriraj Med J,** 58(8), 951-954.

Khakhum, N., Yordpratum, U. and Wongratanacheewin, R. (2010). Bacteriophages and their medical applications. **Srinagarind Med J,** 25(1), 47-53.

Kropinski, A. M. (2006). Phage therapy - everything old is new again. **Can J Infect Dis Med Microbiol,** 17(5), 297-306.

Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (2005). **Bacteriophages: biology and applications.** USA: CRC Press.

Krylov VN (2001) Phage therapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, perspectives, safety, limitations. **Russion Journal of genetics,** 37(7), 715-730.

Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol, 8(5), 317-327.

Lai, M. J., Lin, N. T., Hu, A., Soo, P. C., Chen, L. K., Chen, L. H., et al. (2011). Antibacterial activity of*Acinetobacter baumannii* phage ØAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol,** 90(2), 529-539.

Lee, C. N., Tseng, T. T., Lin, J. W., Fu, Y. C., Weng, S. F. and Tseng, Y. H. (2011). Lytic myophage Abp53 encodes several proteins similar to those encoded by host *Acinetobacter baumannii* and phage phiKO2. **Appl Environ Microbiol,** 77(19), 6755-6762.

Lin, N. T., Chiou, P. Y., Chang, K. C., Chen, L. K. and Lai, M. J. (2010). Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. **Res Microbiol,** 161(4), 308-314.

Loeffler, J. M., Nelson, D. and Fischetti, V. A. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. **Science,** 294(5549), 2170-2172.

Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P. and van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. **Curr Opin Biotechnol,** 22(2), 157-163.

Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **J Infect Chemother,** 11(5), 211-9.

Marza JA, Soothill JS, Boydell P, Collyns TA (2006) Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in Pseudomonas aeruginosa infected patients. **Burns** 32, 644–646.

McVay CS, Velásquez M, Fralick JA (2007). Phage therapy of Pseudomonas aeruginosa infection in a mouse burn wound model. **Antimicrob Agents Chemother** 51(6), 1934-8.

National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. (n.d.). **Percent susceptibility.** Retrieved March 23, 2012, from http://narst.dmsc.moph.go.th/.

Nemec,A., Krızova, L., Maixnerova, M., Diancourt, L., Van, J. K., Reijden, D., et al. (2008). Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrugresistant strains of European clone II. J. **Antimicrob. Chemother,** 62, 484 - 489.

Niumsup, P. R., Boonkerd, N., Tansawai, U. and Tiloklurs, M. (2009). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. **Jpn J Infect Dis,** 62(2), 152-154.

Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M (1999) PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for Acinetobacter baumannii. **Res Microbiol** 150, 317-322.

Peleg, A. Y., Seifert, H. and Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev,** 21(3), 538-582.

Phumkhom, P. (2009). Bacteriophage therapy. **J Med Tech Phy Ther,** 21(2), 96-103.

Poirel, L. and Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect,** 12(9), 826-836.

Popova, A. V., Zhilenkov, E. L., Myakinina, V. P., Krasilnikova, V. M. and Volozhantsev, N. V. (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett,** 332(1), 40-46.

Puttilerpong, C., Chawanasit, W., Laohawaleesan, W., Rungsang, W. and Ritteeverakul, P. (2011). Antimicrobial use in hospital-acquired pneumonia with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*at King Chulalongkorn Memorial hospital. **Thai Pharm Health Sci J**, 6(1), 32-38.

Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S. and Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Pol J of Microbiol**, 59(3), 145-155.

Rodsathien, P. (2008). Multidrug resistance *Acinetobacter baumannii* at Lopburi hospital. **Khon Kaen Med J**, 32(6), 74-81.

Rungruanghiranya S, Somboonwit C, Kanchanapoom T (2005). Acinetobacter infection in the intensive care unit. **J Infect Dis Antimicrob Agents**, 22,77-92.

Santimaleeworagun, W., Wongpoowarak, P., Chayakul, P., Pattharachayakul, S., Tansakul, P. and Garey, K. W. (2011). Clinical outcomes of patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with single or combination antibiotic therapy. **J Med Assoc Thai**, 94(7), 863-870.

Seed, K. D. and Dennis, J. J. (2005). Isolation and characterization of bacteriophages of the *Burkholderia cepacia* complex. **FEMS Microbiol Lett**, 251(2), 273-280.

Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorsselaer, A., et al.(2006). Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. **J Proteome Res**, 5(12), 3385-3398.

Soothill, J. S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. **J Med Microbiol**, 37(4), 258-261.

Souli, M., Galani, I. and Giamarellou, H. (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Euro Surveill**, 13(47), 1-11.

Su, M. T., Venkatesh, T. V.and Bodmer, R. (1998). Large- and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA. **Biotechniques**, 25(1), 44-46.

Thawal, N. D., Yele, A. B., Sahu, P. K.and Chopade, B. A. (2012). Effect of a novel podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* biofilm. **Curr Microbiol,** 65(1), 66-72.

Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Wakiguchi H, Matsuzaki S. (2008). In silico and in vivo evaluation of bacteriophage phiEF24C, a candidate for treatment of Enterococcus faecalis infections. **Appl Environ Microbiol,** 74(13), 4149-63.

Vidal, R., Dominguez, M., Urrutia, H., Bello, H., Gonzalez, G., Garcia, A., et al (1996). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. **Microbios,** 86(346), 49-58.

Visalsawadi, J. (2008). Increasing of carbapenem-resistant and multiple drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Maharat Nakhon Ratchasima hospital. **Nakhon Ratch Med Bull,** 32, 19-28.

Wagenaar, J. A., Van Bergen, M. A., Mueller, M. A., Wassenaar, T. M. and Carlton, R. M. (2005). Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. **Vet Microbiol,** 109(3-4), 275-283.

Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. and Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev,** 18(2), 306-325.

Wang, I. N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. **Genetics,** 172(1), 17-26.

Watanabe, T., Morimoto, A. and Shiomi, T. (1975). The fine structure and the protein composition of gamma phage of *Bacillus anthracis*. **Can J Microbiol,** 21(11), 1889-1892.

Weigel, C. and Seitz, H. (2006). Bacteriophage replication modules. **FEMS Microbiol Rev,** 30(3), 321-381.

Weinbauer, M. G. and Hijfle, M. G. (1998). Size-specific mortality of lake bacterioplankton by natural virus communities. **Aquat Microb Ecol,** 15, 103-113.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. and Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis,** 39(3), 309-317.

Wroblewska, M. M., Towner, K. J., Marchel, H. and Luczak, M. (2007). Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. **Clin Microbiol Infect**, 13(5), 490-496.

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. **Virology**, 40(3), 734-744.

Yang, H., Liang, L., Lin, S. and Jia, S. (2010). Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiol**, 10, 131.

Yele, A. B., Thawal, N. D., Sahu, P. K. and Chopade, B. A. (2012). Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. **Arch Virol**, 157(8), 1441-1450.

You, L., Suthers, P. F. and Yin, J. (2002). Effects of *Escherichia coli* physiology on growth of phage T7 in vivo and in silico. **J Bacteriol**, 184(7), 1888-1894.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายธวัชชัย กิตติ นายระพี ธรรมมีภักดิ์ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ร่วมดำเนินการวิจัย และสุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เข้าร่วมนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract ในงานนเรศวรวิจัยวันที่ 28-29 ก.ค. 2556 ในหัวข้อเรื่อง "การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ *Acinetobacter baumannii* phage ABP-01"

ส่งบทความตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ Journal of Basic Microbiology ในหัวข้อเรื่อง Characterization of three novel *Acinetobacter baumannii* bacteriophages isolated from waste water treatment plants.

ภาคผนวก (Appendix I)

บทคัดย่อการไปเสนอผลงานนเรศวรวิจัยวันที่ 28-29ก.ค. 2556 เรื่อง การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ *Acinetobacter baumannii* phage ABP-01

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาของ *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01

ระพี ธรรมมีภักดิ์[1*] ธวัชชัย กิตติ[2] และ สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์[2]

Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01

Rapee Thummeepak[1*], Thawatchai Kitti[2] and Sutthirat Sitthisak[2]

[1] หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[2] ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[1] Masters Programs in Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University
[2] Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University
* Corresponding author. E-mail : Rapee_worm32@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ ØABP-01ซึ่งแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสีย จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าลักษณะทางสัญฐานวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01มีลักษณะหางแบบ short tail ยาว 9 นาโนเมตร และมี icosahedral head เส้นผ่านศูนย์กลาง 78 นาโนเมตร สามารถจัดอยู่ใน *Podoviridae* family จีโนมของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 มีขนาด 23 kb ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI *Eco*RI *Hind*III *Sph*I *Pst*I และ *Sma*I นอกจากนั้นยังถูกย่อยด้วย DNaseI ทำให้ทราบว่าจีโนมเป็นดีเอนเอสายคู่ จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS - polyacrylamide gel electrophoresis พบว่ามีแถบโปรตีนหลักๆอยู่หนึ่งแถบซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 28 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนอื่นๆซึ่งมีมวลโมเลกุลไล่เรียงตั้งแต่ 20 ถึง 97 กิโลดาลตัน การเพิ่มปริมาณยีนเอนโดไลซินของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 (endolysin; *lys*) ด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่ามีขนาด 558 bp จากนั้นนำยีนเอนโดไลซินไปโคลนและหาลำดับนิวคลิโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนเอนโดไลซินพบว่า มีบริเวณ open reading frame เท่ากับ 558 bp แปล

รหัสให้โปรตีนซึ่งมีมวลโมเลกุลจากการทำนาย 21.14 กิโลดาลตัน (กรดอะมิโน 185 ตัว) และมีค่า pI เท่ากับ 9.42 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีการอนุรักษ์กับแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์อื่น คือ Acinetobacter phage phiAB1 Acinetobacter phage phiAB2 และ Acinetobacter phage AB3 โดยที่ลำดับนิวคลิโอไทด์มี homology กับแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์ดังกล่าวคิดเป็นร้อยละ 94, 94 และ 93 ตามลำดับ ส่วนลำดับกรดอะมิโนมี homology กับแบคเทอริโอเฟจสายพันธุ์ดังกล่าวคิดเป็นร้อยละ 95, 95 และ 94 ตามลำดับการศึกษาต่อจากนี้คือการผลิตโปรตีนเอนโดไลซินลูกผสมของแบคเทอริโอเฟจ ØABP-01 เพื่อใช้ในการควบคุมการติดเชื้อ multidrug resistant *A. baumannii*

คำสำคัญ: *Acinetobacter baumannii* แบคเทอริโอเฟจ เอนโดไลซิน

Abstract

A. baumannii bacteriophage, ØABP-01 was isolated from waste water treatment plants. In this study, we examined the molecular characteristics of bacteriophage ØABP-01. Morphological characterization of ØABP-01 by transmission electron microscopy showed it had a short tail 9 nm and an icosahedral head 78 nm in diameter, suggesting that it belongs to the *Podoviridae* family. 23 kb genome of ØABP-01 was cut with restriction enzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sph*I, *Pst*I and *Sma*I and digested with DNaseI, revealed that ØABP-01 genome was double stranded DNA. Protein analysis using SDS - polyacrylamide gel electrophoresis revealed 1 major protein band of approximately 28 kDa and many minor protein bands with molecular weight ranging from 20 - 97 kDa. PCR product with 558 bp of endolysin gene (*lys*) was identified. The endolysin gene of ØABP-01 was subsequently cloned and sequenced. Sequence analysis revealed an open reading frame of 558 bp with a predicted molecular weight of 21.14 kDa (185 amino acid) and a deduced pI of 9.42. Alignment analysis indicated that the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence are conserved to other bacteriophage, including Acinetobacter phage phiAB1, Acinetobacter phage phiAB2 and Acinetobacter phage AB3. The homology for nucleotide sequences of ØABP-01 to that of these bacteriophages are 94%, 94% and 93%, respectively, and the homology for amino acid sequences are 95%, 95% and 94%, respectively. Future work is performing in respect to produce endolysin recombinant protein of ØABP-01 for further study in order to control multidrug resistant *A. baumannii* infection.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, bacteriophage, endolysi

ภาคผนวก 2 (Appendix II)

Manuscript ส่งวารสาร Journal of Basic Microbiology

Characterization of three novel *Acinetobacter baumannii* bacteriophages isolated from waste water treatment plant

Authors: Thawatchai Kitti[1], Rapee Thummeepak[1], Kamala Boonyodying[1] Duangkamol Kunthalert[1,2], Pannika ritvirool[1,2] and Sutthirat Sitthisak[1,2]

Address: [1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

[2]Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

Short Running Title: Characterization of *Acinetobacter baumannii* bacteriophages

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, bacteriophage, lytic, endolysin

*Author for correspondence:

Dr. Sutthirat Sitthisak

Department of Microbiology and Parasitology

Faculty of Medical Sciences, Naresuan University

Phitsanulok, Thailand

Tel: 66-55-964626; Fax: 66-55-964770

E-mail: sutthirats@nu.ac.th

Abstract

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen that exists widely in hospital environments. The emergence of multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) has been reported worldwide. Therefore, it is necessary to find a novel and effective treatment for MDRAB infection. In this study, three bacteriophages, designed as ØABP-01, ØABP-02, and ØABP-04 were selected for analysis. Transmission electron microscopy revealed that bacteriophage ØABP-01 belonged to the *Podoviridae* family and bacteriophage ØABP-02 and ØABP-04 were classified into the family *Myoviridae*. Thermal stability test showed that all bacteriophages survived at 50 - 70 °C. ØABP-02 and ØABP-04, were stable to the wide range of pH4.0 - 9.0. and ØABP-01remained stable at pH5.0 - 9.0. All bacteriophage showed 95% adsorbed to the host cells within 8 minutes. One-step growth of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 exhibited that the latent period were 15, 20 and 20 minutes and the burst sizes were 110, 120 and 150 PFU/cell respectively. Protein analysis using SDS-PAGE revealed variation in major and minor bands of bacteriophage proteins. DNA restriction analysis of three bacteriophages cutting with *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Sph*I, *Bam*HI and*Sma*I showed different DNA patterns. Bacteriophage ØABP-01from this study could be used as a candidate for studying to control MDRAB infections.

Introduction

Acinetobacter baumannii is a gram negative coccobacillus which is ubiquitous in the hospital setting. *A. baumannii* causes a diverse range of infection such as ventilator-associated pneumonia, skin and soft-tissue infections, urinary tract infection, wound and blood stream infection. It is an opportunistic pathogen that is a major cause of nosocomial infection which has a high mortality rate [1]. Emergence of multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) has been reported worldwide for decades, severely limiting the treatment of these infections [2,3,4,5]. The incidence of antibiotic resistance leads to the search for an alternative antimicrobial treatment. Phage therapy is one alternative choice for the treatment of multidrug resistant bacteria [6]. Clinical trials of bacteriophages and their derivatives as potential alternative agents for controlling multi drug resistance infection have been described in various bacterial pathogens [7,8,9,10]. Bacteriophages are able to replicate in the host cell and produce endolysin in order to lyse the host cell. Endolysin is a phage enzyme which is capable of degrading peptidoglycan of the bacterial cell wall, resulting in a rapid lysis of the bacterial cell [11, 12]. Phage endolysins have been studied in a variety of pathogenic bacteria including *A. baumannii* for theirs antibacterial activity [12,13,14]. A number of *Acinetobacter baumannii* bacteriophages have been isolated and characterized in the past three years [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. However, there are geographic differences in *A. baumannii* host

strains. Owing to their host specificity, bacteriophage isolates and phage endolysin from one area may not be effective in all areas. Thus, the aim of this study was to isolate and characterize the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage in waste water treatment plant from two hospitals in Thailand. *A. baumannii* phages designed as ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 were selected, characterized and detected for the endolysin gene.

Materials and methods

Bacterial strains and media

Eleven clinical MDRAB isolates obtained from Buddhachinaraj hospital, Phitsanulok, Thailand were used for screening of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage [24]. All *A. baumannii* were grown in Luria- Bertani broth (LB) or Luria- Bertani Agar (LBA).

Bacteriophage isolation

Phages were isolated from wastewater treatment plants in two hospitals (Buddhachinaraj hospital and Bang Rakam hospital, Phitsanulok). Samples were collected 3 times at monthly interval from October – December 2010. Samples were centrifuged and filtered through a 0.45-mm-pore-size membrane. Then, 5 ml each of the filtered supernatants were mixed with 5 ml double strength broth containing (v/v) of overnight culture *A. baumannii*. After 48 h of growth at 25°C, the culture was centrifuged and filtered through membrane filter (0.45 mm pore size). The presence of lytic phage in the filtrate was examined by using the double layer method with some modifications [25]. Briefly, 100 µl of the filtrate was mixed with 100 µl of

overnight culture of *A. baumannii* and 200 µl of 0.1 M $CaCl_2$. The mixture was incubated 5 minutes, added 2.5 ml soft agar (0.7% agar) and poured into TSA plate. The presence of lytic phage in the form of plaques was detected after incubation of the plate at 37°C for 7-8 hrs.

Phages enrichment and Purification

Lysates for phages purification were prepared by infecting 100 ml of bacterial host cells with a phages at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 and incubated with aeration until complete lysis. Afterthat, chloroform was added and bacterial debris was pelleted by centrifugation at 4000 g for 10 min.The supernatants were passed through a membrane filter. Three repeated rounds of complete lysis were performed and the filtrates were subjected to the double layer method as mentioned above.

Host range analysis

Host range analysis was determined by spot test using 11 *A. baumannii* clinical isolates, *A. baumannii* ATCC19606 and 14 strains of difference bacterial species (*Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). 100 ml of overnight bacterial cultures were added into a 2.5 ml of soft agar, mixed gently and poured into an agar plate. Afterthat, 5 µl phages (1.0×10^8 PFU) suspension were spotted on the lawn of bacteria. Plates were dried and incubated at 37 °C for 7 h.

Clearance zone indicating lysis at the spot of phages inoculation implied that the host was sensitive.

Lytic activity

The host lysis assay was performed by mixing phages (MOI = 1) with host cells grown in LB to an OD_{600} of 0.3 - 0.4. The mixtures were incubated at 30°C, and aliquots were taken every 2 hrs intervals to measure the OD_{600} until 10 hrs. Each host lysis activity test was repeated in triplicate.

Phage adsorption

Exponentially grown *A. baumannii* cells were mixed with the phage (MOI = 0.001) and incubated at room temperature. A volume of 100 µl of samples was taken in 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 mins, mixed with 900 µl of cold LB broth and centrifuged (12,000 x g, 5 min). Unadsorbed phages titer in each sample was measured by double-layer method after making appropriate dilutions. Each of the above experiments was repeated three times with triplicate samples.

One Step Growth

Cells of *A. baumannii* were harvested by centrifugation and then resuspended in fresh LB broth into concentration of 1×10^9 CFU/ml. Phages were added at an MOI of 0.001 and allowed to adsorb for 30 min at 4 °C. The mixtures were then centrifuged at 12,000 x g for 10 min and the pellet was resuspended in 20 ml of LB broth. Samples were taken every 5 min

over a period of 60 min and immediately assayed for plaque tittered by the method described earlier. Latent period, burst time and burst size were calculated from the one-step growth curve. Each of the above experiments was repeated three times with triplicate samples.

Morphology of phage

A drop of phages (10^{12} PFU/ml) was applied to the surface of a formvar-coated grid and negatively stained with 0.5% uranyl acetate for 3-5 min. After drying, the preparations were observed in a transmission electron microscope (Philips, Oregon, USA).

Thermal and pH sensitivity test

Phage suspensions (approximately 10^8 PFU/ml) were added to the water preheated to a desirable temperature, ranging from 50 to 90°C and incubated for 30 min. Surviving phage titer was assayed by the double layer method. For the study of pH destabilization of phages, phosphate buffered saline (PBS) with pH 3.0, 4.0, 5.0, 8.0, 9.0, 10 were used and the phage suspensions (about 10^8 PFU/ml) were inoculated overnight at 25°C. Upon re-adjustment to pH 7, the double layer method was performed to determine phage titer.

Analysis of phages proteins

To determine the major proteins present in the phages. Purified phage particles were mixed with protein sample buffer and heated in a boiling water bath for 5 min, followed by separation of the proteins in SDS-poly-Acrylamide gel (15%) electrophoresis. Gels were stained with 0.125% Coomassie blue R-250.

Analysis of phage DNA

Purified phage particles were treated with SDS (10%) at 65°C for 15 min. An equal volume of phenol-chloroform (1:1) was added to remove the proteinaceous materials. The extraction was repeated twice, and the nucleic acids were precipitated with 0.1 volume of 3 M sodium acetate and 1 volumes of isopropanol. Phage DNA was resuspend in TE buffer. Precipitation was repeated by adding 1 in 10 volume of 8 M potassium acetate and 1 volumes of isopropanol. The final pellet was washed twice with 70% ethanol, air dried, and then resuspended in TE buffer. One μg of phage DNAs were cut with restriction enzyme *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Sph*I, *Bam*HI and*Sma*I and analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gel containing 0.5 ug/ml ethidium bromide.

Detection of endolysin gene in bacteriophage genome

The sequence of endolysin was checked from the GenBank Database of the National Centre for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Primers specific for endolysin gene (forward: ATGATTCTGACTAAAGACGGATTTAGTATT and reverse: CTATAAGCTCCGTAGAGCACGTTC) were designed using biology workbench (http://workbench.sdsc.edu/). PCRs were performed in a DNA thermal cycler using phage DNA ØABP-01, ØABP-02 or ØABP-04 genomic DNA as a template. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gel containing 0.5 ug/ml ethidium bromide and sequenced using Applied Biosystems

Results

Phage isolation, lytic activity, host range analysis and morphology

Water samples from waste water treatment plants of 2 hospitals were taken for bacteriophage isolation. Fifty-four isolates of *A. baumannii* bacteriophages were collected. The host range of 54 isolates was determined using spot test. ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 with high lytic activity on a broad range of *A. baumannii* were selected for further characterization. ØABP-01 was able to lyse all *A. baumannii* tested (n= 12). ØABP-02 and ØABP-04 lysed 50 % of *A. baumannii* tested (n=6). Only ØABP-01 and ØABP-02 could completely lysed *A. baumannii* ATCC 19606. Host range analysis was detected using 14 bacterial species as host strains. No clear zone was observed against all tested bacteria. All 3 phages showed different plaque characteristics (Fig. 1). Plaques of ØABP-01 showed large clear zones (3-8 mm). ØABP-02 showed plaques with small clear zones inside (1-2mm) and large opaque zones around, whereas ØABP-04 showed plaques with clear zones inside and opaque zone around. Morphology of three bacteriophages was observed in a transmission electron microscope as showed on Fig. 2. Observation with an electron microscope showed ØABP-01 have an icosahedral head (78 nm) with a short tail (9 nm), belonging to the *Podoviridae* family. ØABP-02 has an icosahedral head (80-85nm) with long tail (67-125 nm) and ØABP-04 has an

icosahedral head (72 nm) with long tail (110 nm). Both were classified into the *Myoviridae* family.

Phage physiology, protein profile and DNA restriction fragment patterns

Lytic activity of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 is shown in Fig. 3. ØABP-01 demonstrrated good lytic activity than ØABP-02 and ØABP-04. All three bacteriophages showed 95% adsorbed to the host cells within 8 minutes (Table 1). The growth cycle of all three bacteriophages was characterized by one-step growth. Burst size and latent period of three bacteriophages were showed in Table 1. The latent periods of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 were 15, 20 and 20 minutes and the burst sizes of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 were 110, 120 and 150 PFU/cell respectively (Fig. 4). Effect of pH and temperature of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 are shown on Table 1. ØABP-02 and ØABP-04 are stable at pH 5-9, whereas ØABP-01 remained stable at pH 6-9. As shown in Table 1, all three bacteriophages showed 95 % survival at temperature range from 50-70 ^{o}C. According to gel electrophoresis of phage DNA, ØABP-01 and ØABP-04 have genome size approximately 23 kb (Figure 5A and 5C, lane 1). ØABP-04 revealed a large genome size which is higher than 23 kb (Fig. 5B). Analysis of all bacteriophage DNAs by restriction digest and digestion with DNaseI revealed that nucleic acid was double stranded DNA. As shown in Figure 5A, ØABP-01 and ØABP-04 genomes were cut with restriction enzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII and *Sph*I . All six restriction enzymes used in this study did not appear to cut the ØABP-02 genome. SDS-PAGE of ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-

04 virion proteins was showed in Fig. 6A. ØABP-01 exhibited 1 major structural protein bands of approximately 28 kDa and many minor structural protein band of molecular weight ranging from 20-97 kDa. ØABP-02 showed 3 major structural protein bands of approximately 25, 29 and 45 kDa and many minor structural protein bands. ØABP-04 showed 3 major structural protein bands of approximately 22, 32 and 40 kDa and many minor structural protein bands.

Detection of endolysin gene

PCR was utilized to investigate the presence of the endolysin gene. As shown in Figure 6B, amplified product with 530 bp of endolysin gene (*lys*) was present in ØABP-01 and ØABP-04 genomes. Sequencing the endolysin gene fragment of ØABP-01 yield 95% sequence identity to the sequence of the endolysin gene *(lys)* phage phiAB1 (Gene bank accession no.HQ186308.1) and phiAB2 (Gene bank accession no. HM755898.1) and 94% sequence identity to Acinetobacter phage AB3 (Gene bank accession no.KC311669.1) obtained from GenBank. In addition, sequence of the endolysin gene PCR fragment of ØABP-04 yield 93% identity to phage phiAB1 (Gene bank accession no.HQ186308.1) and phiAB2 (Gene bank accession no.HM755898.1) and 92 % identity to Acinetobacter phage AB3 (Gene bank accession no.KC311669.1)

Discussion

In this study, three bacteriophages designed as ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04 isolated from waste water treatment plant were characterized with regard to lytic activity, morphology,

stability, one step growth, protein and DNA restriction fragment patterns. Three bacteriophages showed variation in plaque characteristics which could be related to different types of bacteriophage. All three bacteriophages were tail bacteriophages and identified as members of order *Caudovirales*. To date, more than 96% of isolated bacteriophages belong to this order [26]. ØABP-01 was classified in the *Podoviridae* family which is in accordance with previous studies in bacteriophages infecting *A. baumannii* AB2 and AB7-IBB2 [15, 22]. Bacteriophage ØABP-02 and ØABP-04 were classified into the family *Myoviridae*. This family was also reported in bacteriophages ABp53, ZZ1 and AP22 [17, 19, 20]. All three bacteriophage showed lytic activity that completely lysed *A. baumannii* host (MOI = 1) within 10 hours. However, ØABP-01 has a shorter latent period and displayed good lytic activity compared to other bacteriophage isolates (Figure 3 and Table 1). Previous reports of bacteriophages infecting *A. baumannii* showed latent periods ranging from 9-25 mins and burst size from 22 to 409 PFU/infected cell [15, 16, 17, 19, 20, 21,22, 23, 20]. Temperature and pH are important factors that determine phage survival in the environment [27]. All bacteriophages can survive in the same temperature range from 50-70 °C. However, ØABP-01 can survive in a narrower range of pH than ØABP-02 and ØABP-04 (Table 1). The pH stability of three bacteriophages in this study was lower than that observed by Jin *et al* (2012) in ZZ1, which found to be resistant in the pH range 4 to 9 [19]. All three bacteriophage exhibited

different genome sizes and restriction patterns. ØABP-01 and ØABP-04 genomes were approximately 23 kb, whereas ØABP-02 genome is larger. ØABP-01 and ØABP-04 genomes were cut with *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII and *Sph*I. Interestingly, of the three bacteriophages, all restriction enzyme tested were unable cut ØABP-02 genome. SDS-PAGE study of bacteriophage protein ØABP-01 showed one major protein band with approximately 28 kDs that may correspond to the capsid protein. This is in accordance with the study of Lin, *et al* which observed a bacteriophage in the same family consists of only one major protein [15] . ØABP-02 and ØABP-04 which belonged to *Myoviridae* family showed 3 major structural protein bands. Our study is also in accordance with previous work, in which bacteriophage AP22, in the *Myoviridae* family, consists of three major proteins [20]. Bacteriophages required endolysin to break down bacterial peptidoglycan during the end of lytic cycle. In this study, a gene coding for endolysin was present in 2 of 3 bacteriophages. Sequencing of the endolysin gene shown that ØABP-01 and ØABP-04 may have a common ancestral DNA sequence with phage phiAB1 and phiAB2 isolated from Taiwan [14, 28] and Acinetobacter phage AB3 isolated from China.

In conclusion, three bacteriophages classified as *Podoviridae* and *Myoviridae* family members were characterized. Bacteriophages in this study are quite different from those of other reports in genome, morphology, and one-step growth curve. ØABP-01 has shown good

References

[1] Bergogne-Berezin, E., Towner, K. J., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev., **9**, 148-165.

[2] Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., *et al.*, 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin. Infect. Dis., **39**, 309-317.

[3] Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., *et al.*, 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii.* Antimicrob. Agents Chemother., **51**, 3471-3484.

[4] Souli, M., Galani, I., Giamarellou, H., 2008. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill., **13**, 1-11.

[5] Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R.D., 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence., **3**, 243-250.

[6] Lu, T.K., Koeris, M.S., 2011. The next generation of bacteriophage therapy. Curr. Opin. Microbiol., **14**, 524-31.

[7] Soothill, J.S., 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. J. Med. Microbiol., **37**, 258-226.

[15] Lin, N.T., Chiou, P.Y., Chang, K.C., Chen, L.K., *et al.*, 2010. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. Res. Microbiol., **161**, 308-314.

[16] Yang, H., Liang, L., Lin, S., Jia, S., 2010. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol., DOI:10.1186/1471-2180-10-131.

[17] Lee, C.N., Tseng, T.T., Lin, J.W., Fu, Y.C., *et al.*, 2011. Lytic myophage Abp53 encodes several proteins similar to those encoded by host *Acinetobacter baumannii* and phage phiKO2. Appl. Environ. Microbiol., **77**, 6755-6762.

[18] Jeon, J., Kim, J.W., Yong, D., Lee, K., *et al.*, 2012. Complete Genome Sequence of the Podoviral Bacteriophage YMC/09/02/B1251 ABA BP, Which Causes the Lysis of an OXA-23-Producing Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolate from a Septic Patient. J. Virol., **86**, 12437-12438.

[19] Jin, J., Li, Z.J., Wang, S.W., Wang, S.M., *et al.*, 2012. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. BMC Microbiol., DOI:10.1186/1471-2180-12-156.

[20] Popova, A.V., Zhilenkov, E.L., Myakinina, V.P., Krasilnikova, V.M., *et al.*, 2012. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett., **332**, 40-46.

[21] Shen, G.H., Wang, J.L., Wen, F.S., Chang, K.M., *et al.*, 2012. Isolation and characterization of φkm18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii.* PLoS One., DOI:10.1371/journal.pone.0046537.

[22] Thawal, N.D., Yele, A.B., Sahu, P.K., Chopade, B.A., 2012. Effect of a novel podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* biofilm. Curr. Microbiol., **65**, 66-72.

[23] Yele, A.B., Thawal, N.D., Sahu, P.K., Chopade, B.A., 2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. Arch. Virol., **157**, 1441-1450.

[24] Niumsup, P.R., Boonkerd, N., Tansawai, U., Tiloklurs, M., 2009. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. Jpn. J. Infect. Dis., **62**, 152-154.

[25] Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. NewYork: Inter science Publishers, Inc.

[26] Ackermann, H.W., 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. Arch. Virol., **146**(5), 843-857.

[27] Jonczyk, E., Klak, M., Miedzybrodzki, R., Gorski, A., 2011. The influence of external factors on bacteriophages. Folia Microbiol (Praha)., **56**, 191-200.

[28] Chang, K.C., Lin, N.T., Hu, A., Lin, Y.S., *et al.*, 2011. Genomic analysis of bacteriophage phiAB1, a phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii.* Genomics., **97**, 249-255.

Table Legends

Table 1. Phages isolated against *Acinetobacter baumannii* and theirs properties

Phage	Family	Plaque characteristic		One-step growth curve		Adsorption Time (min)	Stability	
		morphology	Size diameter (mm)	Latent period (min)	Burst size (PFU/infected cell)		pH	Temperature (°C)
ØABP-01	*Podoviridae*	Clear	5-7	15	110	8	6-9	50-70
ØABP-02	*Myoviridae*	Clear with turbid	6-8	20	120	8	5-9	50-70
ØABP-04	*Myoviridae*	Clear with turbid	3-5	20	150	8	5-9	50-70

Figure legend

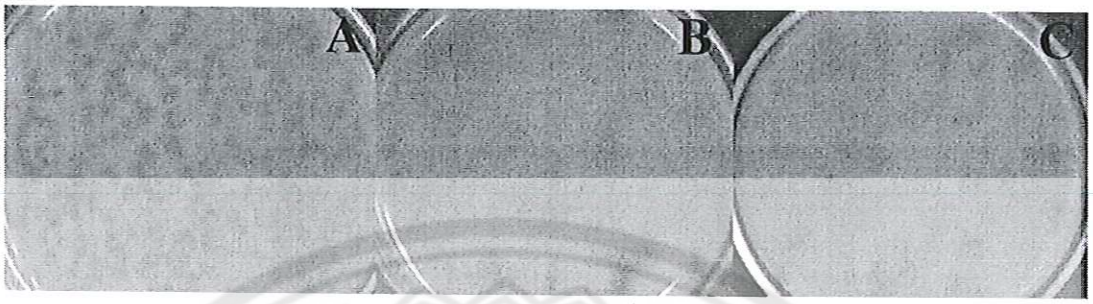


Figure.1 The appearance of plaques on a bacterial lawn formed by three *A. baumannii* bacteriophages. A) ØABP-01 plaque characteristic showed large clear zone. B) ØABP-02 plaque characteristic showed small clear zone inside with large opaque zone around. C) ØABP-04 plaque characteristic showed clear zone inside with an opaque zone around.

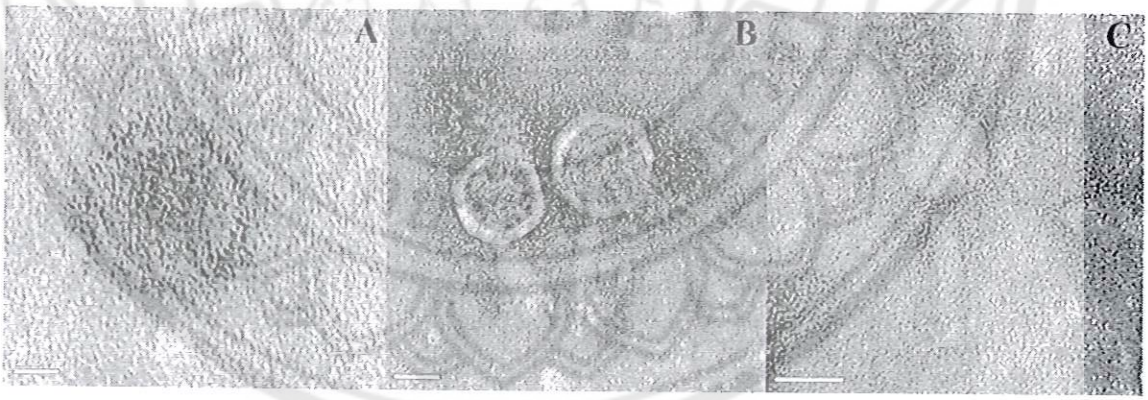


Figure.2 Electron micrograph of *A. baumannii* bacteriophages. A) ØABP-01, B) ØABP-02 and C) ØABP-04

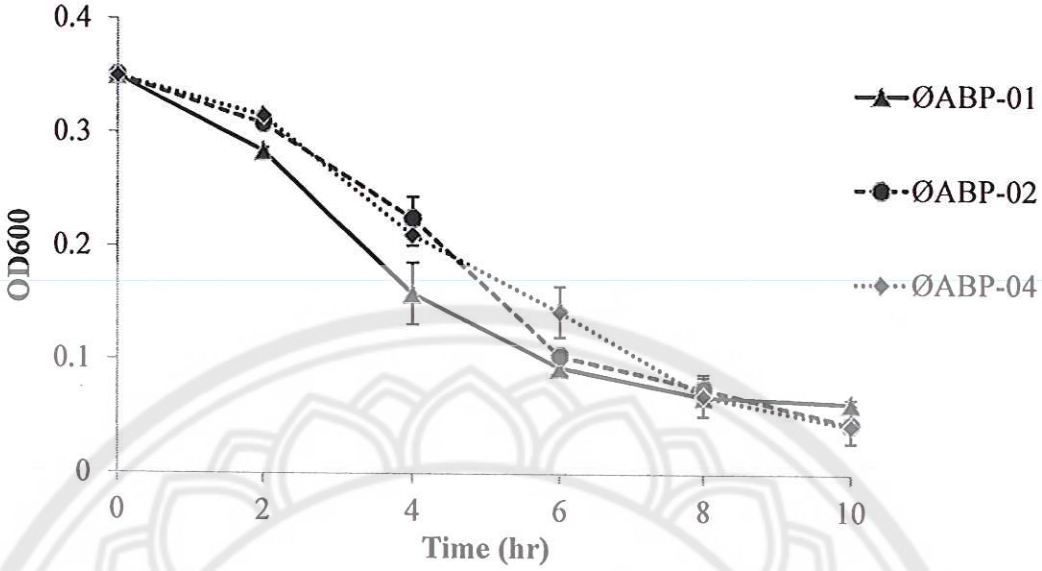


Figure.3 Lytic activity of *A. baumannii* phages. Growth of *A. baumannii* in the presence of phage ØABP-01, ØABP-02 and ØABP-04. *A. baumannii* host was inoculated at an OD_{600} of 0.3, and after bacteriophage was added to the culture.

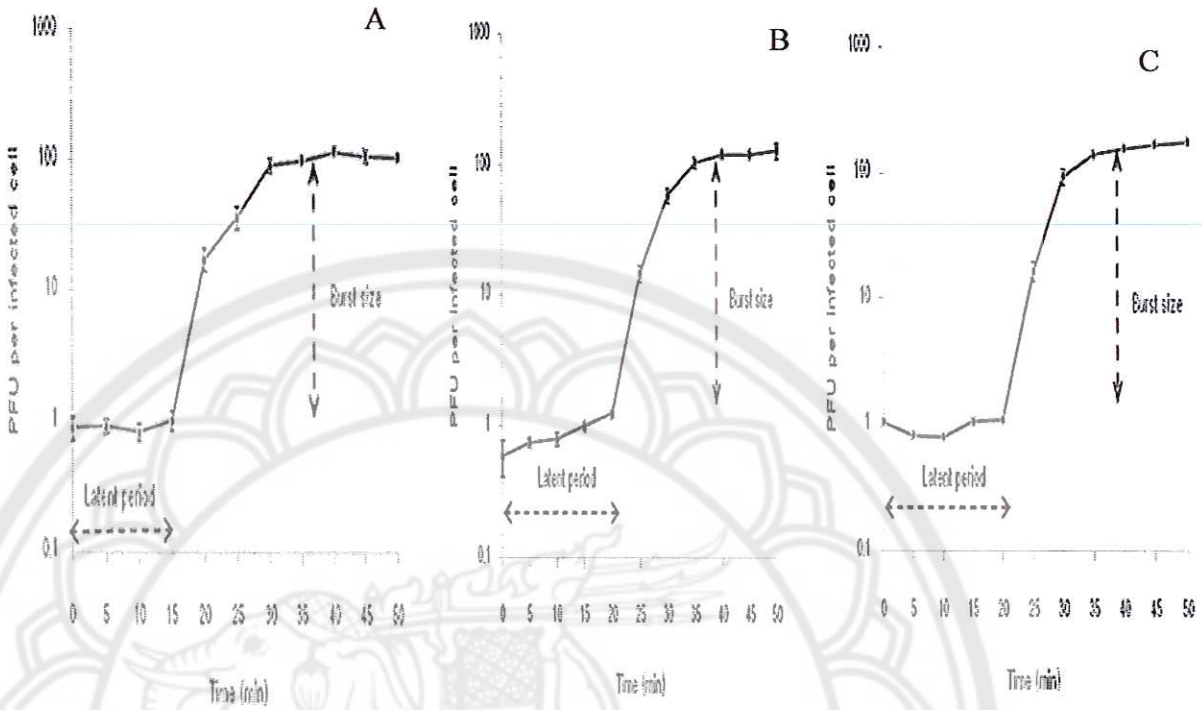


Figure 4. One step growth of ØABP-01 (A), ØABP-02 (B) and ØABP-04 (C) bacteriophages against *A. baumannii* host strains.

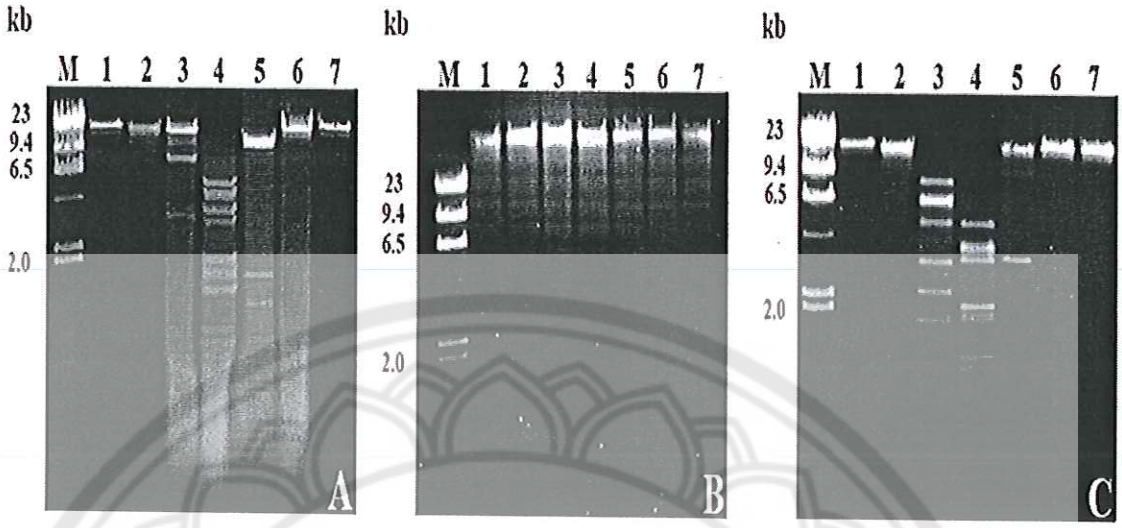


Fig. 5 Restriction pattern of *A. baumannii* bacteriophages. A) electrophoresis of Lambda DNA marker/HindIII (laneM); DNA of ØABP-01 uncut (lane 1); DNA of ØABP-01 cut with *Bam*HI (lane 2), *Eco*RI (lane3), *Hin*dIII (lane4), *Sph*I (lane5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7) B) electrophoresis of Lambda DNA marker/HindIII (laneM); DNA of ØABP-02 uncut (lane 1); DNA of ØABP-02 cut with *Bam*HI (lane 2), *Eco*RI (lane3), *Hin*dIII (lane4), *Sph*I (lane5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7) C) electrophoresis of Lambda DNA marker/HindIII (laneM); DNA of ØABP-04 uncut (lane 1); DNA of ØABP-04 cut with *Bam*HI (lane 2), *Eco*RI (lane3), *Hin*dIII (lane4), *Sph*I (lane5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7)

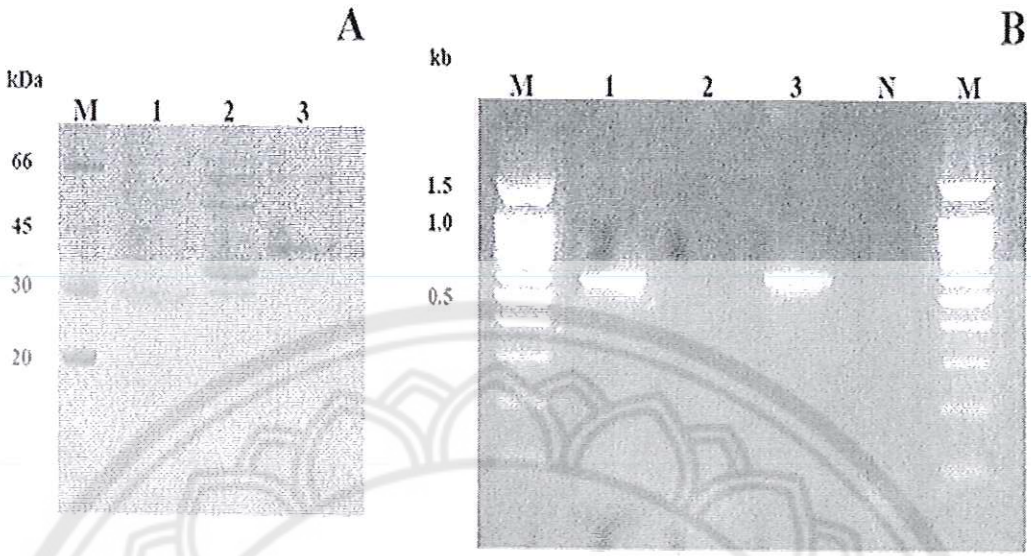


Figure. 6 (A) SDS-PAGE analysis of *A. baumannii* bacteriophages. Lane M: molecular weight marker, Lane 1:Coomasie stain showing protein band of ØABP-01, Lane 2: Coomasie stain showing protein band of ØABP-02, Lane 3: Coomasie stain showing protein band of Coomasie stain showing protein band of ØABP-04 . (B) Amplification of endolysin gene from *A. baumannii* bacteriophages detected by 1 % agarose gel electrophoresis. Lane M; DNA marker, Lane1; ØABP-01, Lane 2; ØABP-02 , Lane 3; ØABP-04; Lane 4; Negative control