อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2557B004

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาแบคเทอริโอเฟจเพื่อใช้พัฒนาเป็นวิธีตรวจสอบสำหรับเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ผศ.ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 25 ส.ค. 2559
เลขทะเบียน 1 1908925
เลขเรียกหนังสือ ว ยศ
จน.ง
ถ7755
2556

สนับสนุนโดย

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Executive Summary	3
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ (Introduction)	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and Methods)	18
ผลการวิจัย (Result)	26
ข้อวิจารณ์ (Discussion)	40
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	43
เอกสารอ้างอิง (References)	44
กิตติกรรมประกาศ	50
ภาคผนวก	51
Output ที่ได้จากโครงการ	52

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 1	ตารางแสดงสายพันธุ์แบคเทอริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา	18
ตารางที่ 2	ตารางค่ามาตรฐานการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพจาก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)	20
ตารางที่ 3	ผลทดสอบความสามารถในการต้านยาจุลชีพของเชื้อ A. baumannii จำนวน 65 isolate โดยเทคนิค Disk diffusion test	27
ตารางที่ 4	จำนวนเปอร์เซ็นต์เชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่างๆ ที่ถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ	28
ตารางที่ 5	Bacteriophage susceptibility group ของเชื้อ *A. baumannii* 65 isolates	31
ตารางที่ 6	ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อ *A. baumannii* ที่สร้าง strong biofilm จำนวน 16 isolates และร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์โดยแบคเทอริโอเฟจ	32
ตารางที่ 7	แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* โดยแบคเทอริโอเฟจ isolates	37
ตารางที่ 8	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ โดย bacteriophage cocktail	38

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ *A. baumannii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	8
รูปที่ 2	แสดงกลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*	11
รูปที่ 3	แสดงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Virulence factors) ของเชื้อ *A. baumannii*	13
รูปที่ 4	แสดงวงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ	16
รูปที่ 5	แสดงการทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ โดยวิธี Spot test	29
รูปที่ 6	แสดงการหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจ และ แบคทีเรียที่เหมาะสม	34
รูปที่ 7	แสดง % growth inhibition ของเชื้อ *A. baumanii* isolate AB033-AB059	35
รูปที่ 8	แสดงผล % growth inhibition ของ bacteriophage cocktail ต่อเชื้อ *A. baumannii* isolates	36
รูปที่ 9	แสดงการทดสอบ ด้วยวิธี Plaque assayเพื่อหาปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ	51

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นเชื้อฉวยโอกาสซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ cocktail ที่ได้จากแบคเทอริโอเฟจ 5 สายพันธ์เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ โดยคัดเลือกจากแบคเทอริโอเฟจสิบสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติติดเชื้อ *A. baumannii* ได้หลายสายพันธ์ (broad host range) โดย ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 และØABP-44 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีคุณสมบัติติดเชื้อได้กว้าง (40-65%) ได้รับการคัดเลือกนำมาจัดทำ bacteriophage cocktail ผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า ØABP-02 และØABP-44 เป็นแบคเทอริโอเฟจ family *Myoviridae* และØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 เป็นแบคเทอริโอเฟจ family *Podoviridae* จากนั้นประสิทธิภาพของ bacteriophage cocktail ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้นำมาทดสอบโดยใช้ *A. baumannii* 44 สายพันธ์โดยวิธี colorimetric microtiter plate method ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของ bacteriophage cocktail สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตกับ *A. baumannii* ตั้งแต่ 45.1- 96% โดย bacteriophage cocktail มีประสิทธิภาพสูงกับสายพันธุ์ *A. baumannii* ที่สามารถติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ 5 สายพันธ์ (> 77%) bacteriophage cocktail มีความจำเพาะกับเชื้อ *A. baumannii* สูงโดยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่าง species ได้แก่ *Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* typhi, *Shigella flexneri, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เลย งานวิจัยนี้มีประโยชน์ในการพัฒนา bacteriophage cocktail เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและรักษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต่อไป

Abstract

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen which is a major cause of nosocomial infection. Bacteriophages are bacterial viruses that are used as alternative agents in the treatment of multidrug resistant bacterial infections. In this research, our purpose was to investigate the efficacy of a cocktail of 5 bacteriophages. Ten bacteriophage isolates were determined for the host range analysis and five bacteriophages, ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 and ØABP-44, showed broad host range (36.9-64.6 %) were selected for the preparation of the bacteriophage cocktail. Transmission electron microscopy revealed ØABP-02 and ØABP-44 belonged to family Myoviridae and ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 belonged to family Podoviridae. The bacteriophage cocktail was tested for its efficacy on growth inhibition against 44 *A. baumannii* clinical isolates using the colorimetric microtiter plate method. The results of the growth inhibition assay of the bacteriophage cocktail showed that the growth inhibition against *A. baumannii* ranged from 45.1%- 96%. High efficacy of the bacteriophage cocktail was found against the *A. baumannii* strains that can be infected by the 5 bacteriophages (>77%). Our study demonstrated high efficacy of the bacteriophage cocktail on inhibiting the growth of *A. baumannii*. Bacteriophage cocktail was highly specific against *A. baumannii* and cannot inhibit the growth of other bacteria species such as *Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas fluorescens, Salmonella typhi, Shigella flexneri, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In conclusion,the bacteriophage cocktail is a valuable alternative agent for controlling the multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals.

Executive Summary

1. **Rationale (ความสำคัญและที่มาของปัญหา)**

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรีย Gram negative พบเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่พบได้บ่อย เช่น การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ กระแสเลือด ปอด ช่องท้อง เยื่อหุ้มสมอง แผลผ่าตัด และเยื่อบุหัวใจชั้นใน เป็นต้น ซึ่งกำลังเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก อุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาล เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 2-4 เป็นร้อยละ 10-30 ในระยะเวลา 15 ปีที่ผ่านมา (Rungruanghiranya *et al*., 2005, Chaiwarith, 2006) และยังพบว่า เชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้มักดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug-resistant *A. baumannii*; MDR-*AB*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อต่อยาในกลุ่มcarbapenems โดยมีรายงานการติดเชื้อ MDR-*AB* เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน รายงานจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์กล่าวว่าอัตราเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. baumannii* มีถึง 33.8 % (วีรพงศ์ วัฒนาวนิช; 2013)นอกจากคุณสมบัติในการต้านจุลชีพหลายชนิดยังพบว่าเชื้อ *A. baumannii* สามารถสร้างไบโอฟิลม์ช่วยให้แบคทีเรียมีความทนต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีความซับซ้อนมากขึ้น แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรียที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปและมีความสัมพันธ์กับวิวัฒนาการของแบคทีเรีย และมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับพันธุศาสตร์ของแบคทีเรีย ในปัจจุบันปัญหาสำคัญในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือการเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด ทำให้มีการหาทางเลือกใหม่และวิธีที่ช่วยในการรักษาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาคือการพัฒนาใช้แบคเทอริโอเฟจและเอ็นไซม์ที่ได้จากแบคเทอริโอเฟจ นอกจากนี้จากความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียจึงมีการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการนำมาช่วยในการวินิจฉัยแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆ ช่วยลดระยะเวลาในการวินิจฉัยเชื้อและช่วยลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยลงโดยมีการศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการแยกและศึกษาคุณสมบัติ ของ อซีเนโตแบคเตอร์ บอมมานิไอ แบคเทอริโอเฟจ โดยสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. baumannii* จากน้ำเสียในบ่อบำบัดของโรงพยาบาลในจังหวัดพิษณุโลก ได้มากกว่า 10 สายพันธ์ (ธวัชชัย กิตติ ; 2554) โดยแบคเทอริโอเฟจ ที่แยกได้มีคุณสมบัติทำลายเซลโฮสท์ *A. baumannii* ได้ดีน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้แต่เนื่องจากการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ประโยชน์ต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติและความจำเพาะของ

แบคเทอริโอเฟจในการทำลายเชื้อดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นโครงงานวิจัยต่อเนื่องที่ต้องการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acinetobacter* สปีชีส์ต่าง ๆ และเชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่าง ๆ และคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของ *A. baumannii* สายพันธ์ต่าง ๆโดยงานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการคัดเลือก phage เพื่อนำมาใช้ เป็น phage suspension เพื่อนำมาใช้พัฒนาในการผลิตชุดตรวจหรือนำมาใช้ในการรักษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต่อไป

2. Specific aims (วัตถุประสงค์)

1. ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ ในการทำลายเชื้อ Acinetobacter สปีชีส์ต่าง ๆ และเชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่าง ๆ

2. ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ ที่มีผลยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของ *A. baumannii* สายพันธ์ต่าง ๆ

3.คัดเลือกแบคเทอริโอเฟจเพื่อจัดทำ แบคเทอริโอเฟจ สำหรับทดสอบความจำเพาะต่อ *A. baumannii* สายพันธ์ที่ดื้อยาโดยวิธี colorimetric microtiter plate method

3. Research design and methods (ระเบียบวิธีวิจัย)

1. เก็บเชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ และ Acinetobacter สปีชีส์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากธรรมชาตินำมาทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาปฏิชีวนะ

2.ศึกษาคุณสมบัติความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *A. baumannii* โดยวิธี Spot test

3. ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii*

4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ของ bacteriophage cocktailโดยวิธี Colorimetric assay growth inhibition

5. การทดสอบความจำเพาะของ bacteriophage cocktailกับแบคทีเรียสายพันธ์ต่าง ๆ

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. รวบรวมข้อมูล จัดซื้อสารเคมี และครุภัณฑ์	←→					
2.ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ ในการทำลายเชื้อ *Acinetobacter* สปีชีส์ต่าง ๆ และเชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่าง ๆ	←	———	———	→		
3. การศึกษาความไว ต่อยาปฏิชีวนะและคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii*				←	———	→
4. การศึกษาคุณสมบัติของแบค เทอริโอเฟจที่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii*				←	———	→
5. การทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อ *A. baumannii* ที่ดื้อและไวต่อยาโดยวิธี growth inhibition assay				←	———	→
6.เขียนรายงาน นำเสนอผลงาน						←→

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่ได้

1. ส่งบทความตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติเรื่อง Efficacy of Acinetobacter baumannii bacteriophage cocktail on *Acinetobacter baumannii* growth ในวารสาร African Journal of Microbiology Research impact factor 0.5 (submit เมื่อวันที่ 4 สิงหาคม. 2558)

บทนำ (Introduction)

A. baumannii เป็นแบคทีเรีย Gram negative พบเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาล (nosocomial infection) โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด (MDR-bacteria) ซึ่งพบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแผล เช่น แผลเบาหวาน แผลไฟไหม้ โดยเชื้อสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในแผล (wound infection)) เมื่อผู้ป่วยมีการติดเชื้ออาจชักนำไปสู่การติดเชื้อในกระแสโลหิต และเสียชีวิตในที่สุด (Eron, 1999; Bowler et al., 2001; Agnihotri et al., 2003) นอกจากนี้จากข้อมูลของโรงพยาบาลมหาราชจังหวัดนครราชศรีมาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล และเชื้อดังกล่าวมีแนวโน้มดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (Visalsawadi 2008) โดยตั้งแต่ปี 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 กระทรวงสาธารณสุขพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ดื้อต่อยา carbapenem เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.1 ในปี 2543 เป็นร้อยละ 63 ในปี 2553 และดื้อยา cefoperazone/sulbactam ซึ่งเป็นยาด่านสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาเชื้อนี้จากร้อยละ 3 เพิ่มเป็นร้อยละ 44 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเชื้อที่แยกได้พบมีความสามารถในการดื้อต่อยาหลายๆชนิดเช่น ยาในกลุ่ม Carbapenem, tygecicline, meropenem โดยกลไกการดื้อยาเช่น 1) การสร้างเอ็นไซม์ β-lactamase ออกมาทำลายยา โดยเกี่ยวข้องกับการสร้างยีนดื้อยาที่ 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) และยีนที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น aac(3)-I, aac(6′)-I and 22 และ ant(3″)-I. (Noppe-Leclercq I, et al., 1999; Jin et al., 2009) 2) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายในการจับของยาโดยเชื้อมีการสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาต้านจุลชีพจับไม่ได้ให้มากขึ้นหรือไปลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาต้านจุลชีพจับได้ (Gehrlein, et al., 1991) 3) การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin 4) มีการสร้าง efflux pump ของ *A. baumannii* เพื่อขับยาต้านจุลชีพได้หลายกลุ่มทำให้เชื้อ *A. baumannii* เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพแบบไม่จำเพาะหรือดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายกลุ่มพร้อมกันได้ (Bonomo and Szabo, 2006)

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรียโดยเมื่อแบคเทอริโอเฟจเข้าไปในแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวน ในเซลล์แบคทีเรียและปลดปล่อยไวรัสลูกหลานออกมาโดยทำให้เซลแบคทีเรียแตก พบว่าการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาเป็นวิธีที่ค่อนข้างปลอดภัย เนื่องจากไม่เป็นพิษต่อ eukaryote อย่างไรก็ตามในยุคที่การพัฒนาของยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพ ร่วมกับการขาดข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีววิทยาของแบคเทอริโอเฟจ ทำให้ความสนใจในการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ประโยชน์มีน้อย ยกเว้นในบางประเทศ เช่น รัสเซีย โปแลนด์ และฝรั่งเศส ที่มีการใช้ แบคเทอริโอเฟจในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียมาเป็นระยะเวลานาน ปัจจุบันปัญหาสำคัญในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือการเกิดการดื้อยาของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด ซึ่งเป็นปัญหาทางสุขรูปที่สำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเกิดสายพันธ์ที่ดื้อยาได้ ทำให้มีการหาทางเลือกใหม่และวิธีที่ช่วยในการรักษาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีการดื้อยาโดยในปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อนำแบคเทอริโอเฟจไปใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาและวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์ 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) นอกจากนี้ยังมีการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมที่นำไปใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อต้นเหตุของการระบาดของเชื้อก่อโรคและพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดโดยการใช้มีข้อดีคือ สามารถทำได้ง่าย และลดค่าใช้จ่ายในการทดสอบอีกด้วย เช่น การผลิตชุดตรวจสอบเชื้อ Mycobacterium tubercurosis ด้วยแบคเทอริโอเฟจโดยใช้เทคนิค phage amplification assay ได้แก่ชุด FASTPlaque eTB™ test ของบริษัท Biotec Laboratories ประเทศอังกฤษ ซึ่งสามารถวินิจฉัยเชื้อได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (Trollip et al., 2001) หรือชุดตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย MRSA/MSSA ของบริษัท Microphage Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะและคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อในสกุล *Acinetobacter* spp. เป็นแบคทีเรียอยู่ใน family Moraxellaceae อยู่ใน genus *Acinetobacter* มีลักษณะเป็น gram negative, non-motile, encapsulated, non-fermentative, non-spore forming, strictly aerobic, catalase-positive, oxidase-negative ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ช่วยในการจำแนกออกจากเชื้อแกรมลบทรงแท่งตัวอื่น เชื้อ *Acinetobacter baumannii* บางครั้งอาจติดสีคล้ายแบคทีเรียแกรมบวก (Joyce M. et al.,2004) รูปร่างของเชื้ออาจเป็นได้ทั้งรูปร่างแบบกลมหรือแบบแท่ง แต่มักจะพบแบบกลมในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวและในช่วงแรกของการเจริญเติบโต มีขนาดประมาณ 1.0 ถึง 1.5 x 1.5 ถึง 2.5 ไมครอน นอกจากนี้อาจยังมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถจำแนกเชื้อชนิดนี้ออกจากเชื้ออื่นๆที่ก่อโรคในสิ่งส่งตรวจได้ยาก

รูปที่ 1 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ *A. baumannii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_9b/path/00001488.htm)

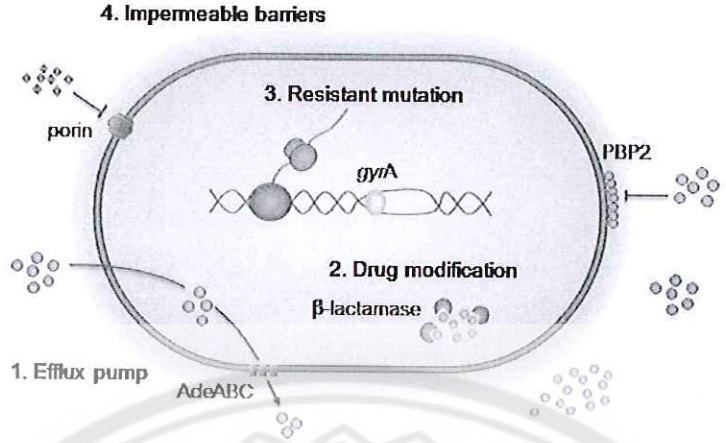
การจำแนกเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม สามารถแบ่งเชื้อออกได้ 25 สปีชีส์ แต่มีเพียง 10 สปีชีส์ที่ได้รับการตั้งชื่อ (Schreckenberger PC, et al., 2003) เนื่องจากสามารถพบเชื้ออาศัยอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งในดินและน้ำรวมถึงภายในโรงพยาบาล เชื้อสามารถมีชีวิตรอดทั้งในที่ชื้นและที่แห้งและอาจพบอาศัยเป็นเชื้อประจำถิ่นของผิวหนัง ช่องปาก ลำคอและช่องคลอด (Seifert H, et al., 1997) และยังเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจบ่อยรองจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ *A. baumannii* รองลงมาได้แก่ *A. lwoffii, A. haemolyticus* และ *A. johnsonii* นอกจากนี้เชื้อ *A. calcoaceticus* และ *A. junii* อาจพบก่อโรคในคน

ได้ ส่วนเชื้อ *A. radioresistens* มักพบอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปเชื้อ *Acinetobacter* spp.ไม่ก่อโรคในคนปกติแต่พบก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง รวมถึงผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคไตวาย และผู้ติดสุราเรื้อรัง เชื้อมีความสำคัญทางคลินิกเนื่องจากสามารถมีชีวิตรอดในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน ดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด และมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีอัตราการตายสูง ปัจจุบันในการก่อโรคของเชื้อยังไม่ทราบชัดเจนไม่พบการสร้างสารพิษที่มีบทบาทในการก่อโรค โดยแคปซูลของเชื้ออาจมีส่วนช่วยต้านการถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว ส่วนใหญ่มักทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ (Allen DM and Hartman BJ.,2000) นอกจากนี้ยังพบการก่อให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อของบาดแผล เยื่อบุช่องท้องอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ข้ออักเสบ การติดเชื้อของกระดูกและกล้ามเนื้อและการติดเชื้อในกระแสเลือด ปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อเช่นการได้รับยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลานาน การมีบาดแผลรวมถึงแผลผ่าตัด การใส่สายสวนหรือเครื่องมือแพทย์เข้าสู่ร่างกาย และการพักรักษาตัวในโรงพยาบาล นอกจากนี้เชื้อยังสามารถอาศัยอยู่แบบ colonization ที่ผิวหนัง ทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาล เชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยากลุ่ม penicillins และ cephalosporins นอกจากนี้ยังพบอัตราการดื้อต่อยาหลายชนิดเพิ่มสูงขึ้น (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.), 2555) โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลมักดื้อยาหลายชนิดในระดับสูง จึงควรทำการทดสอบความไวต่อยาเสมอ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาที่เหมาะสมในการรักษา จากผลการตรวจเชื้อก่อโรคห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกปี พ.ศ 2549 และ พ.ศ. 2550 พบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาแบบ multidrug resistance เป็นอันดับหนึ่งของเชื้อแกรมลบดื้อยาคือร้อยละ 37.12 และ 36.47 ตามลำดับ โดยผลการทดสอบ susceptibility test ของเชื้อ *A. baumannii* ที่พบจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย พบว่าเชื้อมีความไวต่ำต่อยาต้านจุลชีพเมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่นๆ(ภัทราภรณ์ รอดเสถียร, 2551) จากการติดตามเฝ้าระวังสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่มีมานานกว่า 10 ปี จากประวัติของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลินทรีย์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า *A. baumannii* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในโรงพยาบาล พบมีการระบาดของเชื้อชนิดนี้ที่ดื้อยาทุกชนิด เชื้อนี้มีอัตราดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันสูงถึง 55 % ได้แก่ดื้อยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides), เบต้า-แลคแทม (beta-lactams), ควิโนโลน (quinolones) แม้แต่ยาที่เคยใช้รักษาได้ดีในอดีต เช่น ยากลุ่มคาบาพีเนม (carbapenems) ในปี 2543 ดื้อยาอิมิพีเนม (imipenem) เพียง 1-2% แต่ใน ปี 2554 ดื้อเพิ่มขึ้นเป็น 64% และเชื้อนี้ที่ก่อโรคในผู้ป่วยใน ICU พบว่าการดื้อยาอิมิพีเนม สูงถึง 85% และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

เมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อ *A. baumannii* ในผู้ป่วยที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพกับกรณีที่ติดเชื้อไม่ดื้อยา พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยามีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและการเสียชีวิตที่สูงกว่าการติดเชื้อที่ไวกับยา จากการศึกษาของ Lee และคณะพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ*A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายชนิด (multi-drugs resistant *A. baumannii*; MDR- *A.baumannii*) ต้องอยู่โรงพยาบาลเพิ่มขึ้น 13.4 วัน และเสียค่าใช้จ่ายเพิ่ม 3,758 เหรียญสหรัฐ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่ไม่ใช่ MDR- *A. baumannii* (Lee NY, et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MDR- *A. baumannii* มีอัตราการตายที่สูงพบว่าอัตราการตายที่ 30 วัน หลังจากการรักษาสูงถึงร้อยละ 49 ดังนั้นนอกจากจะส่งผลกระทบต่อตัวผู้ป่วยโดยตรงแล้วการติดเชื้อ *A. baumannii* ยังเพิ่มค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลอีกด้วย (Kuo LC, et al., 2007)

2.การดื้อยาและกลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายชนิด (MDR- *A. baumannii*) เป็นปัญหาทางสาธารณสุข โดยเกณฑ์ในการจัดเป็น MDR *A.baumannii* คือ เชื้อมีการดื้อยาต้านจุลชีพตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป จากกลุ่มยา หรือชื่อยาดังต่อไปนี้ คือ aminoglycosides, antipseudomonal penicillins, carbapenems, cephalosporins, quinolones, colistin, ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam หรือ tetracyclines (Falagas ME, et al., 2006) เชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยกลไกหลายกลไก ได้แก่ 1) การสร้างเอนไซม์ทำลายยา 2) การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin 3) การขับยาออกจากเซลล์โดยใช้ efflux pump และ 4) การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา(Bergogne-Berezin, et al.,1996) โดยกลไกการดื้อยาที่พบบ่อยที่สุดได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา เช่น Amp-C β-lactamase, OXA-type carbapenemase และ metalo-β-lactamase ซึ่งพบว่าเอนไซม์ 2 ชนิดหลังสามารถทำลายยา β-lactam ได้ทั้งกลุ่มรวมถึงยา กลุ่ม carbapenems กลไกการดื้อยาในเชื้อตัวหนึ่งๆ อาจเกิดจากกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือ อาจเกิดขึ้นพร้อมกันในหลายกลไกก็เป็นได้



รูปที่ 2 แสดงกลไกการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii*

2.1 การขับยาออกจากเซลล์ (Efflux pump)

Efflux pump อยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่ขับยาที่เข้ามาในเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ระดับยาในเซลล์ลดลงจนไม่สามารถยับยั้งเชื้อนั้นได้ ลักษณะของ efflux pump ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีความแตกต่างกันในด้านโครงสร้าง โดยระบบ efflux pumpในเชื้อแกรมลบมีลักษณะที่ซับซ้อนและแบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อย (triple-component transporters) คือ ส่วนที่อยู่ใน cytoplasmic membrane ส่วน efflux pump ของเชื้อแกรมบวก เป็นระบบที่ไม่ซับซ้อนและมีเพียงองค์ประกอบเดียว (single-component transporters) คือ ส่วนที่อยู่ใน cytoplasmic membrane การดื้อยาโดยการสร้าง efflux pump สามารถขับยาต้านจุลชีพออกจากเซลล์ได้หลายกลุ่ม เช่นยาปฏิชีวนะชนิด tetracyclines, chloramphenical, aminoglycosides, quinolones, และ β – lactams (Magnet S, et al., 2001) เนื่องจากการดื้อยาโดยการสร้าง efflux pump ของ *A. baumannii* สามารถขับยาปฏิชีวนะได้หลายกลุ่ม ทำให้เชื้อชนิดนี้เกิดการดื้อยาแบบไม่จำเพาะหรือดื้อยาหลายกลุ่มพร้อมกันได้

2.2 การสร้างเอนไซม์ทำลายยา (Drug modification)

การดื้อยาของเชื้อ MDR- *A. baumannii* โดยการสร้างเอนไซม์ เชื้อมีการสร้างเอนไซม์หลายชนิด ทั้งที่ทำลายยา กลุ่ม β-lactam ได้แก่ Amp-C β-lactamase,OXA-type carbapenemase และ metalo-β-lactamase ซึ่งไปทำลายส่วนโครงสร้างตรงวงแหวน β-lactam ring และการทำลายยากลุ่ม aminoglycosides เช่น aminoglycosidemodifying enzymes โดยการเติมหมู่บางชนิดในโครงสร้างยาทำให้ยาออกฤทธิ์ไม่ได้(Bergogne-Berezin E., 1996)

2.3 การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยา (Resistant mutation)

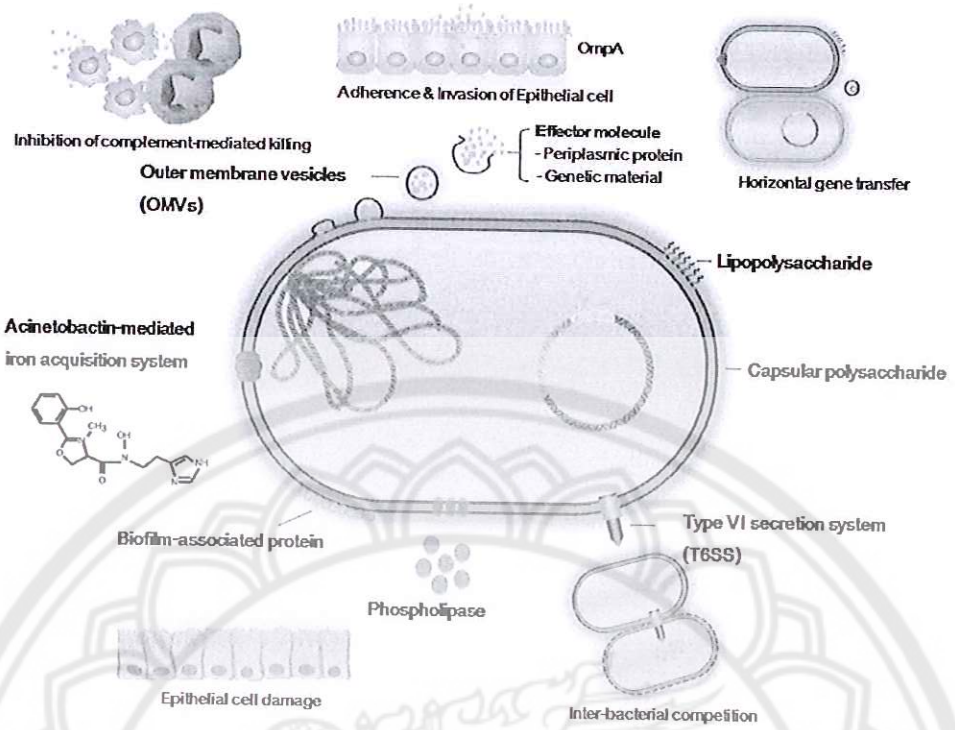
การดื้อยาในกลุ่ม β-lactams เชื้อจะเปลี่ยนเป้าหมายของยา คือ penicillin binding protein(PBP) ซึ่งมีได้ 2 ลักษณะ คือ การสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่ยาจับไม่ได้ให้มากขึ้น หรือ ไปลดการสร้าง PBP ชนิดที่ยาจับได้ ทั้งสองกรณีล้วนส่งผลให้เกิดการดื้อยากลุ่ม β-lactams (Gehrlein M. et al., 1991) แต่การดื้อยาด้วยกลไกนี้พบได้น้อยในเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบ แต่พบมากกว่าในเชื้อแกรมบวก (Poirel L. et al., 2006)

2.4 การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin (Impemeable barriers)

การเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรียของยาต้านจุลชีพบางชนิด เช่น β-lactam ไม่สามารถซึมผ่านเข้าได้โดยตรง ต้องใช้ช่องทางในการนำยาเข้า เรียกว่า porin โดยปกติ porin เป็นก้อนโปรตีนที่ประกอบขึ้นให้มีลักษณะคล้ายช่องที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane)สำหรับนำสารที่ละลายน้ำได้ดีเข้าสู่เซลล์ เมื่อเชื้อลดการสร้าง porin ช่องทางสำหรับนำยาเข้าเซลล์จึงลดลง ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ (Bonomo RA, Szabo D., 2006)

3.ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Virulence factors) ของเชื้อ *A. baumannii*

A. baumannii เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์ การศึกษาจีโนมในเชื้อ *A. baumannii* ซึ่งเป็น microbial virulence จึงถือว่ามีความสำคัญ โดยเชื้ออาจมียีนที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตที่ทำให้สามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ อีกทั้งอาจมีการถ่ายทอดยีนซึ่งมีผลทำให้เชื้อมีการก่อโรคเพิ่มสูงขึ้น กลไกการก่อโรคของเชื้อ *A. baumannii* และความรุนแรงของโรค ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ทั้งตัวมนุษย์และตัวเชื้อ โดยเฉพาะปัจจัยก่อโรค (virulence factors) จากตัวเชื้อ ดังนั้นการศึกษา virulence gene จึงเป็นอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญและสามารถนำไปพัฒนาเพื่อทราบถึงกลไกการทำลายยีนที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในเชื้อ *A. baumannii* ต่อไปได้ โดยเชื้อสามารถสร้าง virulence factors ได้หลายชนิด เช่น Biofilm-associated protein (Bap) , Outer membrane protein (OmpA), Acinetobactin , export outer membrane protein (EpsA) เป็นต้น โดย virulence factors ที่สำคัญๆ แสดงดังภาพต่อไปนี้



รูปที่ 3 แสดงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (Virulence factors) ของเชื้อ *A. baumannii*

ที่มา: Rapee Thummeepak และคณะ (2558) Thammasat Medical Journal. Vol. 15. No. 2.

3.1. Bap (Biofilm-Associated Protein) เป็น virulence factor ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *A. baumannii* มีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการก่อโรค โดยโปรตีนนี้จะทำหน้าที่ในการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งลักษณะการสร้างไบโอฟิล์ม(biofilm) ของเชื้อส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สร้างและปล่อยออกมาจากเชื้อมีคุณสมบัติสำคัญในการช่วยปกป้องเชื้อจากการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะหรือสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Knezevic et al., 2008) โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ *Bap* gene

3.2. OmpA (Outer membrane protein A) เป็น virulence factor ที่ทำหน้าที่เป็น protease และ hemolysin ซึ่งเป็นกลไกที่เชื้อใช้ป้องกันการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของมนุษย์ และมีส่วนช่วยให้เกิดการเกาะติด (adherence) การรุกราน (invasion) ของเชื้อใน epithelial cellทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ บริเวณทางเดินหายใจในระหว่างการติดเชื้อโดยกลไกการ apoptosis (Choi et al., 2005)และนอกจากนี้ยังทำให้เกิดกระบวนการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยทำให้ไม่เกิดการกระบวนทำลายแบคทีเรียแบบ complement-mediated killing ทำให้เชื้อมีความสามารถในการก่อโรคได้มากขึ้น(Kim et al., 2009) โดยยีนที่กำหนดการสร้าง protein Omp A คือ *OmpA* gene

3.3. EpsA (export outer membrane protein / Capsular polysaccharides) เป็น virulence factor ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหลบหลีกและการปกป้อง *A. baumannii* จากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถอยู่ในร่างกายได้และยังช่วยเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค (Russo et al., 2010) โดยยีนที่กำหนดการสร้าง export outer membrane protein คือ *eps A* gene

3.4. Acinetobactin เป็น virulence factor ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยน Fe^{3+}ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ โดยเชื้อสามารถดึงเอาเหล็กมาใช้ในเซลล์ผ่านระบบ acinetobactin-mediated system ซึ่ง acinetobactin จัดเป็นสารพวก siderophore นอกจากนั้นยังทำให้บริเวณที่เชื้อเจริญเกิด cell damage และ cell death จากกลไกการ apoptosis ส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญได้ในร่างกาย (Gaddy et al., 2012) โดยยีนที่กำหนดการสร้าง acinetobactin คือ *BauD-BauC* gene

4. ลักษณะและคุณสมบัติกับการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือเฟจ(Phage) เป็นไวรัสที่ infect bacteriaประกอบด้วยจีโนม ซึ่งหุ้มล้อมด้วยโปรตีน(Capsid) โดย genome นั้นอาจจะเป็นdouble-stranded DNA, single-stranded DNA,double-stranded RNA หรือ single-stranded RNAซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (Linear) และวงกลม (Circular) capsidของแบคเทอริโอเฟจ มีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น hexagonal ขนาดเล็กfilamentous หรือรูปร่างซับซ้อนที่ประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง ปัจจุบัน International Committeefor Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจออกเป็น1 order 13 families และ 30 genera ตามชนิดของกรดนิวคลีอิก (Nature of nucleic acid) และรูปร่างลักษณะ (Particle morphology) โดยแบคเทอริโอเฟจ จำนวนมากกว่าร้อยละ 96 เป็น tailed phage และส่วนใหญ่มี dsDNA เป็นสารพันธุกรรม แบคเทอริโอเฟจ มีขนาดต่าง ๆ กันโดยเฉลี่ยประมาณ 20-200 นาโนเมตร ที่รู้จักกันดีอยู่ในกลุ่ม tailed phages ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจ ที่เก่าแก่ที่สุด โดยมีกำเนิดมาก่อนที่จะมีการแยก eubacteria ออกจาก euryarchaeota (3.5 พันล้านปี) แบคเทอริโอเฟจสามารถพบได้ในแบคทีเรียกว่า 140 generaและยังพบในสิ่งมีชีวิตจำพวก archaea และ eubacteria และมีการศึกษามากมายกว่า 1,500 ชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โครงสร้างประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะกับโฮสต์ในระดับหนึ่ง โดยแบคเทอริโอเฟจจะจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิดได้แก่ teichoic acid, lipoteichoic acid, flagella, capsule, lipopolysaccharide และ porin (อัญชุลี เลิศสงคราม.2555)

แบคเทอริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1915 โดย Twort พบว่ามีสารบางอย่างที่เปลี่ยนโคโลนีของเชื้อชนิด Micrococcus ให้มีลักษณะใส ซึ่งเกิดจากการทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยสิ่งที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์

ดังกล่าวน่าจะเป็นไวรัส ต่อมา Felix D'Herelle รายงานว่าสิ่งที่สามารถทำให้เซลล์ของ *Shigella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวแต่นั้นคือไวรัสของแบคทีเรียและเรียกว่า bacteriophage (Ackermann, 1997) แบคเทอริโอเฟจพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยประมาณกันว่ามีจำนวนและความหลากหลายสูงที่สุดในโลกของสิ่งมีชีวิตและพบได้ทั่วไปในน้ำ อุจจาระ ดินและแม้แต่น้ำทะเล โดยพบว่าจำนวนของแบคเทอริโอเฟจและโฮสต์จะมีความไม่แน่นอน สามารถเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล นอกจากนี้ยังพบว่า แบคเทอริโอเฟจในทะเล (Marine phage) ยังมีบทบาทโยงสัมพันธ์ชนิดอาหาร (Food web) โดยการไปทำลายเซลล์โฮสต์ให้แตกออกทำให้สารอาหารต่างๆ ถูกปล่อยออกมาหรือมีการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปอื่นซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

แบคเทอริโอเฟจมีความจำเพาะสูงต่อ host โดยพบว่า แบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ แบคเทอริโอเฟจจัดเป็น obligate parasite สามารถเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฉพาะภายในเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้นดังนั้น จึงมีผู้นำแบคเทอริโอเฟจไปใช้เป็นเครื่องมือพื้นฐานสำหรับการพัฒนาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) เพื่อนำยีนที่สนใจใส่เข้าไปในแบคทีเรีย นอกจากนี้ด้วยความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การจำแนกแบคทีเรีย (Phage typing)การควบคุมทางชีววิทยา (Biocontrol) และการใช้เพื่อรักษา (Phage therapy) เนื่องจากเอนไซม์ที่สำคัญของ แบคเทอริโอเฟจ คือ endolysin ซึ่งแบคเทอริโอเฟจใช้ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อจะปลดปล่อยประชากรของแบคเทอริโอเฟจที่เพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์แบคทีเรียออกสู่ภายนอก เป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ (Infectious disease) ที่เกิดจากแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือแบคทีเรียที่สร้างbiofilm ซึ่งยากต่อการรักษา (อัญชุลี เลิศสงคราม, 2555)

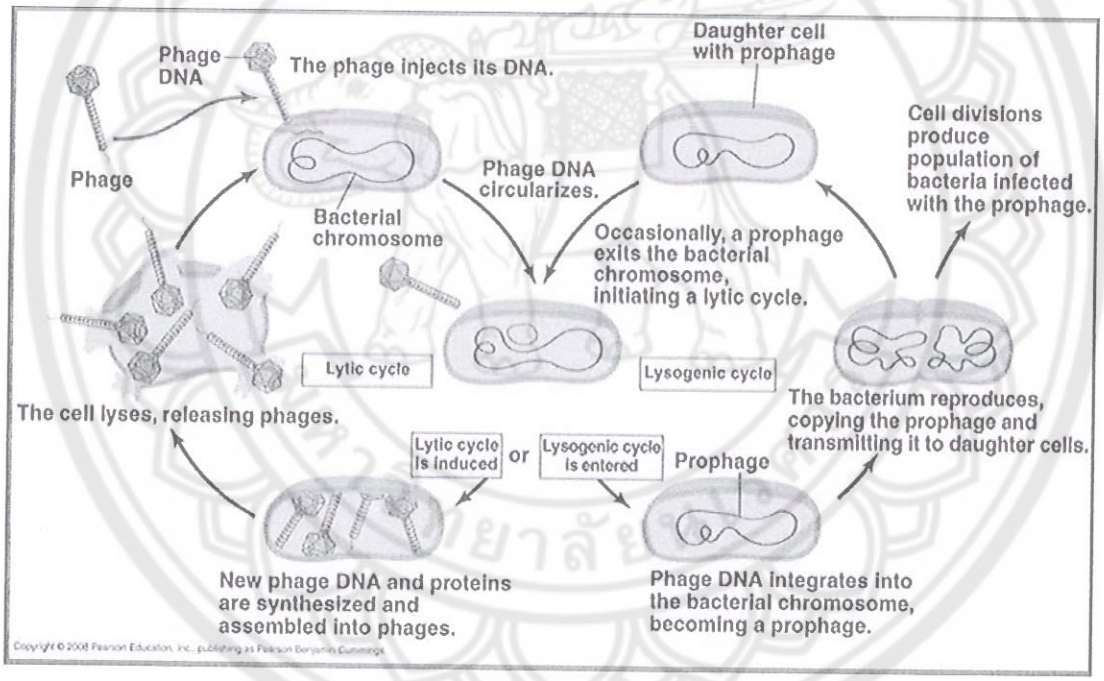
5.วงจรชีวิต (Phage life cycle)

แบคเทอริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามวงจรชีวิตในแบคทีเรีย (อัญชุลี เลิศสงคราม, 2555) คือ

5.1. Lytic phage หรือ virulent phage หมายถึง แบคเทอริโอเฟจที่เมื่อเข้าสู่แบคทีเรียแล้วมีการเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นภายในเซลล์โดยใช้สารต่าง ๆ จากโฮสต์ในการสร้างโปรตีนและจีโนม จากนั้นจะประกอบส่วนต่าง ๆ เข้าเป็น phage progeny แล้วทำให้แบคทีเรียแตกออกเพื่อให้ progeny ออกมาเพื่อเข้าสู่เซลล์อื่นต่อไปเมื่อเลี้ยงเฟจร่วมกับแบคทีเรียแล้วผสมวุ้นราดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะสังเกตเห็นแบคทีเรียถูกทำลายเป็นวงใส เรียกว่าพลัค (Plaque)

5.2. Lysogenicphage หรือ temperatephage หมายถึง แบคเทอริโอเฟจที่เข้าสู่แบคทีเรียแล้วไม่มีการสร้าง phage progeny แต่จีโนมของแบคเทอริโอเฟจจะแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรียโดย genetic

recombination เรียกจีโนมของ แบคเทอริโอเฟจ ระยะนี้ว่า prophage เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี prophage แฝงอยู่ด้วย กระบวนการนี้เรียกว่า lysogenization แบคทีเรียที่มี prophage แฝงอยู่เรียกว่า lysogen หรือ lysogenicbacteria แต่ก็มี prophage ชนิดที่จีโนมของเฟจไม่ได้อยู่ในสภาพสอดแทรกรวมกับโครโมโซมของแบคทีเรีย แต่อยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึม การอยู่ร่วมกันระหว่างโฮสต์และ lysogenic phage สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (Coevolution)โดยเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตผ่านทาง lateral หรือ horizontal gene transferปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย เช่น การเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (Nonpathogenic strain)เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (Virulent strain) นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจยังช่วยป้องกันไม่ให้โฮสต์ถูกทำลายจากแบคเทอริโอเฟจอื่นได้อีกด้วย



รูปที่ 4 แสดงวงจรชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ

http://brownapreview.wikispaces.com/Molecular+Genetics

6.การประยุกต์ใช้ bacteriophage ในด้านต่าง ๆ

ปัจจุบันได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพันธุวิศวกรรม อุตสาหกรรม เกษตรกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงด้านการแพทย์ ดังต่อไปนี้ (อัญชุลี เลิศสงคราม, 2555)

6.1 Genetic engineering เป็นการนำแบคเทอริโอเฟจมาเป็น genetic tool เพื่อการตัดต่อพันธุกรรมโดยตัดบางส่วนที่ไม่จำเป็นสำหรับแบคเทอริโอเฟจออกแล้วใช้เป็น cloning vectorที่สามารถใส่ชิ้น DNA ขนาดใหญ่ได้ถึงประมาณ 25 กิโลเบสเข้าไปแทน เช่น l phage ที่มีขนาด genome ประมาณ 49 กิโลเบสเป็น temperate phage ของ *E. coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปใน l phage DNA จะได้เป็น DNA สายผสม (Recombinant DNA) จากนั้นนำเข้าสู่โฮสต์เซลล์แบคทีเรีย แบคเทอริโอเฟจจะนำDNAสายผสมแทรกเข้าไปใน genome ของแบคทีเรีย และใช้กลไกของโฮสต์เพื่อสร้างโปรตีนของแบคเทอริโอเฟจ รวมทั้งโปรตีนจากDNAที่ใส่เข้าไปด้วย

6.2 Phage typing เป็นการจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในจีนัส (Genus) และสปีชีส์ (Species) เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ โดยมักใช้แบคเทอริโอเฟจชนิดต่างๆ รวมกันเป็นชุด (Panel) ในการศึกษาทั้งนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างการเกาะติดของแบคเทอริโอเฟจกับที่รับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเกิดการ lysis ของแบคทีเรียจะสังเกตเห็นplaque หรือ clear zone เกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่เป็นวงใสเล็ก ๆ บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar surface) เป็นประโยชน์สำหรับงานทางระบาดวิทยาในการสืบหาเชื้อต้นเหตุของการระบาด

6.3 Bio-control tool จากคุณสมบัติที่จำเพาะของ endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์จากแบคเทอริโอเฟจ ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Food industry) เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการและแบคทีเรียที่ก่อโรค (Pathogenic bacteria) ที่อาจปนมาในอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่สุก โดยไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่นเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการเร่งให้เนยแข็งเกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วขึ้น สำหรับทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการใช้แบคเทอริโอเฟจในการสร้างพืชจำลองพันธุ์ (Transgenic plant) ซึ่งมี phage endolysin gene เพื่อต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ก่อโรคในพืช (Phytopathogenic bacteria)

6.4 Phage therapy ในอดีตได้มีการนำแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียมาใช้ในการรักษาโรค แต่เมื่อมีการค้นพบยาปฏิชีวนะ ที่ฆ่าเชื้อได้กว้างกว่า จึงทำให้ความสนใจในการใช้แบคเทอริโอเฟจลดความสำคัญลง แต่ในประเทศรัสเซียได้มีการพัฒนาการใช้มาอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันด้านการแพทย์ได้นำ endolysin บริสุทธิ์มาใช้เป็น therapeutic agent โดยอาจใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อทำลายแบคทีเรียดื้อยา (Antibiotic-resistant bacteria) หรือแบคทีเรียที่สร้าง biofilm ซึ่งยากในการกำจัด เนื่องจากเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงและมีความจำเพาะในการทำลายแบคทีเรียที่ก่อโรค สิ่งที่น่าสนใจคือแบคเทอริโอเฟจเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่ใช้เป็นอาวุธชีวภาพ (Bio-warfare)

วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and Methods)

1.1 สายพันธ์แบคทีเรียและสายพันธ์แบคเทอริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้จะใช้เชื้อ *Acinetobacter* สปีชีส์ต่างๆ และ *A. baumannii* โดยใช้เชื้อจากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ โรงพยาบาลพุทธชินราช และ *Acinetobacter* สปีชีส์ต่างๆ ที่แยกได้จากธรรมชาติโดยแบคทีเรีย *A. baumannii* จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth (Criterion,USA) LB agar (Criterion,USA) และใช้แบคเทอริโอเฟจ 10 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ที่แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาลพุทธชินราชและโรงพยาบาลบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก (Kitti et al., 2014) โดยแบคเทอริโอเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนและการศึกษาหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี Plaque assay (Su *et al.*, 1998)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงสายพันธุ์แบคเทอริโอเฟจที่ใช้ในการศึกษา

แบคเทอริโอเฟจ	สายพันธุ์โฮสท์ *A. baumannii*	แหล่งที่เก็บ (บ่อบำบัดน้ำเสีย)	ลักษณะพลาค	ขนาดพลาค (มิลลิเมตร)
ØABP-01	A1589	รพ.พุทธชินราช	โซนใสขนาดใหญ่	5-8
ØABP-02	A1389	รพ.พุทธชินราช	จุดใสตรงกลางมีโซนขุ่นขนาดใหญ่ล้อมรอบ	6-8
ØABP-04	A1522	รพ.พุทธชินราช	โซนใสมีโซนขุ่นล้อมรอบ	3-5
ØABP-05	A1521	รพ.พุทธชินราช	โซนใสมีโซนขุ่นล้อมรอบ	3-5
ØABP-07	A1386	รพ.พุทธชินราช	โซนใสขนาดใหญ่	3-5
ØABP-24	A1244	รพ.พุทธชินราช	โซนใสขนาดใหญ่	3-5
ØABP-29	A1589	รพ. บางระกำ	โซนใสขนาดใหญ่	5-7
ØABP-19	A1589	รพ.พุทธชินราช	โซนใสขนาดใหญ่	5-7
ØABP-39	A1511	รพ.พุทธชินราช	โซนใสขนาดเล็ก	1-2
ØABP-44	ATCC19606	รพ.พุทธชินราช	จุดใสตรงกลางมีโซนขุ่นขนาดใหญ่ล้อมรอบ	4-6

1.2 การทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาปฏิชีวนะ

เชื้อที่แยกได้จะถูกนำมาทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาปฏิชีวนะยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactam, Aminoglycosides, Quinolones, Tetracyclines, Phenolics และ โดยใช้วิธี disk diffusion method (CLSI, 2010)

1.2.1 การทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disk diffusion method โดยนำเชื้อ *Acneitobacter baumannii* ที่เป็น Multidrug resistance มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อที่สดใหม่และนำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ได้จากการบ่มมาเจือจางใน 0.85 % NaCl และปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ No.0.5 Mcfanland นำไม้พันสำลีจุ่มลงในเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วมา swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เตรียมไว้รอให้เชื้อที่ swab บนอาหารแห้ง แล้วจึงวางแผ่นยาต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบลงบนเชื้อที่ swab ไว้แผ่นยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ amikacin (30µg), cefotaxime (30µg), ceftazidime (30µg), ceftriazone (30µg), cefepime (30µg), ciprofloxacin (5µg), gentamicin (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), TMX/SXT (1.25/23.75µg), tetracycline (30µg), cefopera/sulbactam (105µg), piperaci/taz (110µg), colistin (10µg)และ tigecycline (15µg) แล้วนำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 oC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกผลโดยการวัด Zone size (mm) และแปลผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้เกณฑ์มาตราฐานจาก Clinical and LaboratoryStandards Institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing standards ดังตารางที่ 2

1.2.2 การทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี microdilution method โดยการ ถ่ายอาหาร Mueller-Hinton broth ลงในแต่ละ well ของ microtiter plate ปริมาตร well ละ 50 µl เขียนระบุระดับความเข้มข้นของแต่ละ well ดังนี้ 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0 µg/ml จากนั้นปิเปตสารละลายยาปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 512 µg/ml ปริมาตร 50 µl ลงใน well ที่เขียนระบุระดับความเข้มข้น 128 µg/ml ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 50 µl ลงใน well ที่เขียนระบุระดับความเข้มข้น 64 µg/ml ผสมให้เข้ากัน แล้วทำซ้ำเช่นนี้จนถึง well สุดท้ายจึงดูดสารละลายทิ้งไป 50 µl เตรียมเชื้อทดสอบโดยการปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อที่เจือจางแล้วนี้ปริมาตร 50 µl ลงใน well ทั้ง 11 well ผสมให้เข้ากัน เชื้อในแต่ละ well จะมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^5 CFU/ml นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC จาก well ที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 2 ตารางค่ามาตรฐานการแปลผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพจาก Clinical and LaboratoryStandards Institute (CLSI)

Drug	Resistance	Intermediate d	Susceptibility
Amikacin (AK)	14	15-16	17
Cefotaxine (CTX)	14	15-22	23
Ceftazidime (CAZ)	14	15-17	18
Ceftriazone (CRO)	13	14-20	21
Ciprofloxacin (CIP)	15	16-20	21
Gentamicin (CN)	12	13-14	15
Imipenem (IPM)	13	14-15	16
Trimethoprim/ sulfamethoxazole (TMX/SXT)	10	11-13	16
Tetracycline (TE)	11	12-14	15
Cefopera/sulbactam (SUL)	14	15-17	18
Piperaci/Taz (PIP)	17	18-20	21
Colistin (CT)	11	12-13	14
Tigecycline (TGC)	12	13-13	14

ที่มา: CLSI;2010

2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายเชื้อ *Acinetobacter* สปีชีส์ต่าง ๆ และ ***A. baumannii*** **(Phage specificity)**

นำแบคทีเรีย *A. baumannii* และ *Acinetobacter* สปีชีส์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงไว้ 16-18 ชั่วโมงปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 0.7 (soft agar) ที่หลอมละลายแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วเทลงบนอาหารแข็ง TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 1.5 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดแบคเทอริเฟจที่แยกได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเกิดพลาคบริเวณที่หยดแบคเทอริโอเฟจในการติดเชื้อแบคทีเรีย A. baumannii โดยอ่านผลเป็นใส (clear) หรือ ขุ่น (turbid)

3 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii*

เชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่างๆจะถูกนำมาศึกษาการสร้างไบโอฟิมล์โดยวิธี microtiter plate assay โดยขั้นตอนการทำเริ่มจากนำเชื้อแบคทีเรียเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร LB broth ที่เติม 1% glucose ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.4 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร จากนั้นนำมาแบ่งใส่ใน 96-well microtiter plates (flat bottom) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ช.ม. จากนั้นล้างเซลล์ออกด้วย PBS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง(air-dried) แล้ว fixed เซลล์แบคทีเรียด้วยการเติม 250 ไมโครลิตร Absolute methanol บ่มไว้ 15 นาที ปล่อยให้แห้ง (air-dried) เติม 200 ไมโครลิตร ของ0.4% crystal violet บ่มไว้ 15 นาที แล้วล้างออกด้วย น้ำ(tap water) ปล่อยให้แห้ง(air-dried) จากนั้นเติม 250 ไมโครลิตร ของ33% acetic acid บ่มไว้ 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD595 โดยใช้ Micro-plate Reader

4 การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii*

4.1 คุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*

การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ทำโดยนำแบคทีเรีย *A. baumannii* มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร LB broth ที่เติม 1% glucose ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.4 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร จากนั้นนำมาแบ่งใส่ใน 96-well microtiter plates (flat bottom) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแบคเทอริโอเฟจแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 50 ไมโครลิตร ของ 0.1% filter-sterilized TTC บ่มไว้ 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD540 โดย Micro-plate Reader

4.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่มีผลการสร้างไบโอฟิลม์

การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ ที่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ ทำโดยนำแบคทีเรีย *A. baumannii* มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาใส่ลงในอาหาร MLB broth ที่เติม 1% glucose ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเชียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.4 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร จากนั้นนำมาแบ่งใส่ใน 96-well microtiter plates (flat bottom) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแบคเทอริโอเฟจแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ออกด้วย PBS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง(air-dried) แล้ว fixed เซลล์แบคทีเรียด้วยการเติม 250 ไมโครลิตร Absolute methanol บ่มไว้ 15 นาที ปล่อยให้แห้ง(air-dried) เติม 200 ไมโครลิตร ของ0.4% crystal violet บ่มไว้ 15 นาที แล้วล้างออกด้วย น้ำ(tap water) ปล่อยให้แห้ง(air-dried) จากนั้นเติม 250 ไมโครลิตร ของ 33% acetic acid บ่มไว้ 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{595} โดย Micro-plate Reader คำนวณหาค่า % การยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์โดยแบคเทอริโอเฟจจาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{the average absorbance of controls- the average absorbance of treated wells} \times 100}{\text{the average absorbance of controls}}$$

5 การตรวจหาปริมาณ bacteriophage โดยวิธี Plaque assay (Adums, 1959)

การทดสอบด้วยวิธี Plaque assay ทำโดยใช้วิธี double-layer method โดยนำตัวอย่าง bacteriophage ที่ต้องการศึกษาปริมาตร 0.1 ml มาผสมกับเชื้อ *A. baumannii* ที่เจริญอยู่ในช่วง mid-log phase ปริมาตร 0.1 ml และ 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 0.2 ml จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดเติมลงในอาหาร TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 0.7 (soft agar)ที่หลอมละลายแล้วปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนอาหารแข็ง TSA plateที่มีวุ้นร้อยละ 1.5 อย่างรวดเร็ว หมุนจานอาหารเพื่อให้ soft agar กระจายทั่วผิวหน้า ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง และนำจานอาหารบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา6-8 ชั่วโมง จากนั้นจานอาหารที่เกิด plaque มานับจำนวนและนำไปคำนวณหาปริมาณไวรัสต่อไปโดยการตรวจหาปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ จะมีการเจือจางแบคเทอริโอเฟจที่ต้องการศึกษาแบบ 10-fold Serial dilution ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า จากนั้นนำ bacteriophage ที่เจือจางทุกระดับของการเจือจางมาตรวจหา plaque ที่เกิดขึ้น โดยวิธี Plaque assay ตามวิธีการข้างต้น ซึ่งการตรวจหาปริมาณของแบคเทอริโอเฟจจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำไปหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจในหน่วย Plaque forming unit per millitre (PFU/ml) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ความสามารถในการเกิดพลาค(PFU/ml)} = \frac{\text{จำนวน plaque}}{\text{ปริมาณ bacteriophageที่ใช้ x ค่าความเจือจาง}}$$

6. การหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจ และ bacteria ที่เหมาะสมในการทำ growth inhibition assay

เตรียมแบคทีเรีย *A. baumannii* เพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture ปริมาตร 0.1 ml ไปdilute ใน LB brothปริมาตร 9.9 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 - 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm (ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ $2x10^9$ CFU/ ml) และ dilute แบคเทอริโอเฟจ ใน SM buffer ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ จากนั้นเติม double strengthen LB broth ที่มี 1% glucose ปริมาตร 0.1 ml ใน Sterile 96-well microtiter plate ที่มีลักษณะเป็น flat bottom ทุกหลุม และdilute แบคทีเรีย *A.baumannii* ที่ใช้เป็น host สำหรับแบคเทอริโอเฟจ แต่ละตัว โดยเติมเชื้อ *A. baumannii* แต่ละ isolate (3 isolate) ปริมาตร 0.1ml ลงในแถวที่ 1 ,5 และ 9 แล้ว dilute ต่อเรื่อยๆจนครบซึ่งแต่ละเชื้อจะสามารถ dilute ได้ทั้งหมด 3 dilution และสุดท้ายเติม phage ที่ dilute แล้วปริมาตร 0.1 ml ในแถว A ถึง F โดยใช้แถว G เป็น bacterial control (ไม่เติม phage) และแถว H เป็น broth control (ไม่เติม bacteria และ phage) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง หลังจาก incubate แล้วเติม 50 µl ของ 0.1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) ในทุกหลุม จากนั้น incubate ไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง(ห่อฟรอยด์ไว้ เนื่องจาก TTC มีความไวต่อแสง) สุดท้ายนำไปวัดค่า absorbance ที่ 540 nm โดยใช้ microplate reader เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *A. baumannii* จากปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่เหลืออยู่ และหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจ และแบคทีเรีย ที่เหมาะสมในการทำ growth inhibition assay ต่อไป

7. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* โดย bacteriophage โดยวิธี growth inhibition (Knezevic, et al 2008)

เตรียมแบคทีเรีย *A. baumannii* เพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture ปริมาตร 0.1 ml ไปdilute ใน LB brothปริมาตร 9.9 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 - 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm และ diluteแบคเทอริโอเฟจ ใน SM buffer ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้แบคเทอริโอเฟจ ที่ระดับความเจือจาง เท่ากับ 10^6 PFU/ml จากนั้นเติม double strengthen LB broth ที่มี 1% glucose ปริมาตร 50 µl ใน Sterile 96-well microtiter plate ที่มีลักษณะเป็น flat bottom ทุกหลุม และเติมเชื้อ *A. baumannii* ปริมาตร 50 µl โดย เชื้อ *A. baumannii* 1 isolate จะเติมประมาณ 2 แถว คือ A และ B, C และ D, E และ F (microtiter plate 1 plate จะใช้เชื้อประมาณ 3 isolate) ส่วน

แถว G และ H ใช้เป็น broth control (จะมีเฉพาะอาหาร LB broth ไม่เติม bacteria และ phage) และเติม phage ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. baumannii* โดยจะทำ 3ซ้ำต่อ Phage 1 isolate (3 หลุม) หลุมละ 100 µl ส่วนหลุมที่เหลือจะใช้เป็น bacterial control (ไม่เติม phage) สุดท้ายเติม SM buffer ในหลุมที่เป็น broth control และ bacterial control เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับหลุมที่ใช้ในการทดลอง (test) โดยเติม SM buffer ปริมาตร 150 µl และ 100 µl ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง หลังจาก incubate แล้วเติม 50 µl ของ 0.1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) ในทุกหลุม จากนั้น incubate ไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ห่อฟรอยด์ไว้ เนื่องจาก TTC มีความไวต่อแสง) นำไปวัดค่า absorbance ที่ 540 nm โดยใช้ microplate reader เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *A baumannii* จากปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่เหลืออยู่ คำนวณหาค่า % การยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอริโอเฟจจาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{the absorbance of controls - the absorbance of treated wells} \times 100}{\text{the average absorbance of controls}}$$

8. การทดสอบความจำเพาะของ bacteriophage cocktail กับแบคทีเรียสายพันธ์ต่าง ๆเพื่อพัฒนาใช้ตรวจสอบเชื้อ *A baumannii*

ทดสอบความจำเพาะของmix bacteriophages กับแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ โดยใช้แบคทีเรีย 13 สายพันธ์ที่แตกต่างกันได้แก่ *Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* typhi, *Shigella flexneri, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้เตรียมแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture ปริมาตร 0.1 ml ไปdilute ใน LB brothปริมาตร 9.9 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที จนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 - 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm และ dilute mix แบคเทอริโอเฟจ ชนิด ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 และ ØABP- 44 (10^6 PFU/ml) สัดส่วน 1:1:1:1:1 ใน SM buffer จากนั้นเติม double strengthen LB broth ที่มี 1% glucose ปริมาตร 50 µl ใน Sterile 96-well microtiter plate ที่มีลักษณะเป็น flat bottom ทุกหลุม และเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 50 µl และเติม dilute mix แบคเทอริโอเฟจจาก

ว QR
วน.ท
ส๗๗๕๕
๒๕๕๙
i 1908925

สำนักหอสมุด
25 ส.ค. 2559

นั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง หลังจาก incubate แล้วเติม 50 µl ของ 0.1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) ในทุกหลุม จากนั้น incubate ไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง(ห่อฟรอยด์ไว้เนื่องจาก TTC มีความไวต่อแสง) นำไปวัดค่า absorbance ที่ 540 nm โดยใช้ microplate reader เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่เหลืออยู่

ผลการวิจัย (Result)

1. การทดสอบความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยาปฏิชีวนะ

สำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านยาจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* พบเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น Multidrug resistance (MDR) โดยเทคนิค Disk diffusion test จำนวน 66 isolate พบว่าเชื้อ *A. baumannii* มีอัตราดื้อต่อยา amikacin, cefotaxime , ceftazidime , ceftriazone , cefepime , ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, meropenem , trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, colistin, cefpopera/ sulbactam, piperacillin/tazobactam จำนวน 59.09%, 71.21%, 74.24%, 71.21%, 68.18%, 75.75%, 74.24%, 63.63%, 63.63%, 50.0%, 39.39%, 1.51%, 30.30% and 68.18 % โดยไม่พบการดื้อต่อยา tigecycline เลย ดังแสดงในตารางที่ 3

2. การศึกษาคุณสมบัติความจำเพาะของbacteriophageในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. baumannii* โดยวิธี Spot test

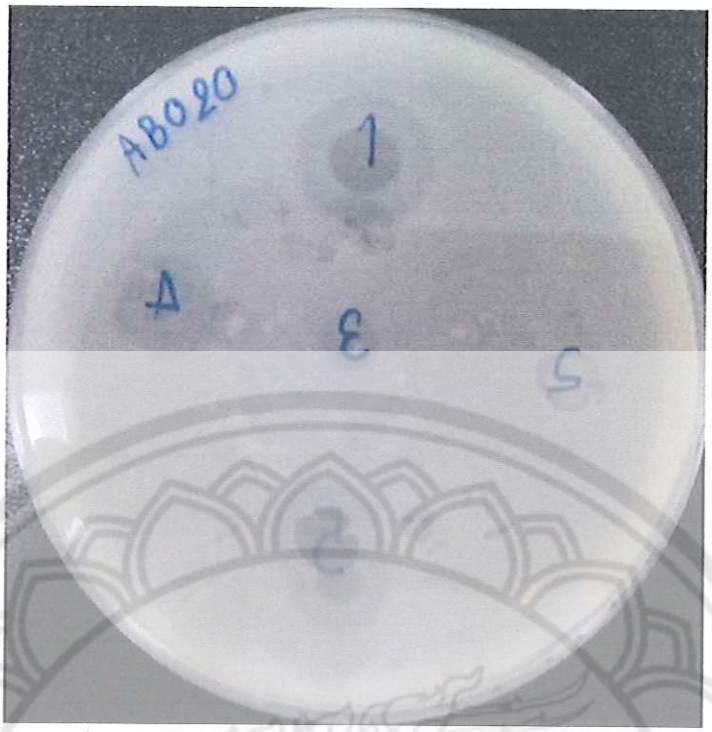
จากการทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ ที่แยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก 10 isolate คือ ØABP-01, ØABP-02, ØABP-04, ØABP-05, ØABP-07, ØABP-19, ØABP-24, ØABP-29, ØABP-39, ØABP-44 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์จำนวน 65 isolate และเชื้อที่แยกได้จากธรรมชาติในจังหวัดพิษณุโลก 8 isolate แสดงดังรูปที่ 5 และตารางที่ 4 พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ØABP-29 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.baumannii* ได้ดีที่สุดคือ 50 isolate คิดเป็น 75.75% รองลงมาคือ ØABP-19 สามารถยับยั้งการเจริญได้ 49 isolate คิดเป็น 74.24% , ØABP-02 สามารถยับยั้งการเจริญได้ 35 isolate คิดเป็น 53.03% ØABP-39 สามารถยับยั้งการเจริญได้ 34 isolate คิดเป็น 43.93% และ ØABP-44 สามารถยับยั้งการเจริญได้ 29 isolate คิดเป็น 43.93% ส่วน ØABP-01, ØABP-04, ØABP-05, ØABP-07 และ ØABP-24 มีความ44 สามารถยับยั้งการเจริญได้ต่ำอยู่ในช่วง 0-25.75% จึงเลือก ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39, ØABP-44 มาใช้ในการศึกษาเพื่อเป็น mixture phage ต่อไป

ตารางที่ 3 ผลทดสอบความสามารถในการต้านยาจุลชีพของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 65 isolate โดยเทคนิค Disk diffusion test

ชื่อยา	จำนวน(%)
amikacin (AK)	59.09
cefepime (FEP)	68.18
cefopera/sul	30.30
cefotaxime (CTX)	71.21
ceftazidime (CAZ)	74.24
ceftriazone (CRO)	71.21
ciprofloxacin (CIP)	75.75
colistin (CT)	1.51
gentamicin (CN)	74.24
imipenem (IPM)	63.63
meropenem (MEM)	63.63
piperaci/taz	68.18
tetracycline (TE)	39.39
tigecycline (TGC)	0
Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMX/SXT)	50.0

ตารางที่ 4 จำนวนเปอร์เซ็นต์เชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่างๆ ที่ถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ	จำนวนเชื้อ *A. baumannii* สายพันธ์ต่างๆ ที่ถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ (%)		
	เชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลพุทธชินราช N=12	เชื้อ *A. baumannii* จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ N= 65	*A. baumannii* ที่แยกได้จากธรรมชาติ N=8
ØABP-01	12 (100)	6 (9.23)	1 (12.5)
ØABP-02	6(50)	32 (49.23)	2()
ØABP-04	6(50)	16 (24.61)	0(0)
ØABP-05	6(50)	0 (0)	0(0)
ØABP-07	5 (41.6)	3 (4.62)	0(0)
ØABP-19	8(66.6)	41 (63.07)	4(50)
ØABP-24	2 (16.6)	3 (4.62)	0(0)
ØABP-29	8 (66.6)	42 (64.61)	4(50)
ØABP-39	5(41.6)	33 (50.8)	0(0)
ØABP-44	4 (33.33)	29 (36.92)	2(25)



รูปที่ 5 แสดงการทดสอบความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ โดยวิธี Spot test

2. การจัดกลุ่มตามความไวต่อ Bacteriophage 5 สายพันธ์ของเชื้อ *A. baumannii*

จากการศึกษาโดยใช้ *A. baumannii* จำนวน 65 สายพันธ์เพื่อจัดกลุ่มตามตามความไวต่อ Bacteriophage 5 สายพันธ์โดยวิธี spot tests สามารถจัดกลุ่ม *A. baumannii* ได้เป็น 12 กลุ่มคือ A-L (ตารางที่ 5) จากแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมดพบว่า 21 สายพันธ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ไวต่อแบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 เลย (กลุ่ม A) และแบคทีเรียทั้ง 21 สายพันธ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ดื้อต่อยา จากแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมดพบว่า 14 สายพันธ์เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อแบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 ตัว (กลุ่ม L) และแบคทีเรียทั้ง 14 สายพันธ์เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา (ตารางที่ 5).

3. การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii*

การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิลม์โดยคัดเลือกแบคทีเรียเชื้อที่ให้ strong biofilm production (OD_{595} > 1.50) จากเชื้อ 66 พบเชื้อ *A. baumannii* ที่สร้าง strong biofilm จำนวน 16 ตัว เมื่อนำ *A. baumannii* ที่สามารถสร้างไบโอฟิลม์ ได้สูงมาทดสอบผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ *A. baumannii* โดย phage ØABP-02 : ØABP-19 : ØABP-29 : ØABP-39 : ØABP-44 mixture พบว่าแสดงดังตารางที่ 6 พบว่า bacteriophage cocktail สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อ phage อยู่ในช่วง 51-90 % โดยไม่พบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อสายพันธ์ที่ไม่ไวต่อ bacteriophage

ตารางที่ 5 Bacteriophage susceptibility group ของเชื้อ *A. baumannii* 65 isolates

Typing	Phage susceptibility pattern	MDR (%)	Non-MDR (%)	% inhibition of phage cocktail
A	Non-susceptible	0(0)	21 (32.3)	-
B	ØABP-19	1(1.5)	0 (0)	47.8± 3.6
C	ØABP-19/29	4(6.2)	0 (0)	45.1± 8 - 80.7± 3.3
D	ØABP-29/39	1 (1.5)	0 (0)	77.6± 2.98
E	ØABP-2/44	1(1.5)	0 (0)	91.2± 1.58
F	ØABP-2/19/29	2(3.1)	0 (0)	73.8± 3.3 - 92.4± 1.2
G	ØABP-19/29/39	1(1.5)	0 (0)	57.2± 2.7
H	ØABP-2/19/29/39	10(15.5)	0 (0)	45.4± 2.8 - 95.0± 0.7
I	ØABP-2/19/29/44	2(3.1)	0 (0)	73.8± 2.9 - 84.6± 3.0
J	ØABP-2/29/39/44	1 (1.5)	0 (0)	91.6± 5.37
K	ØABP-19/29/39/44	6 (9.2)	0 (0)	86.8± 5.7 - 94.5± 0.2
L	ØABP-2/19/29/39/44	15 (23.1)	0 (0)	77.4± 3.2 - 95.7± 0.4

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อ *A. baumannii* ที่สร้าง strong biofilm จำนวน 16 isolates และร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์โดยแบคเทอริโอเฟจ

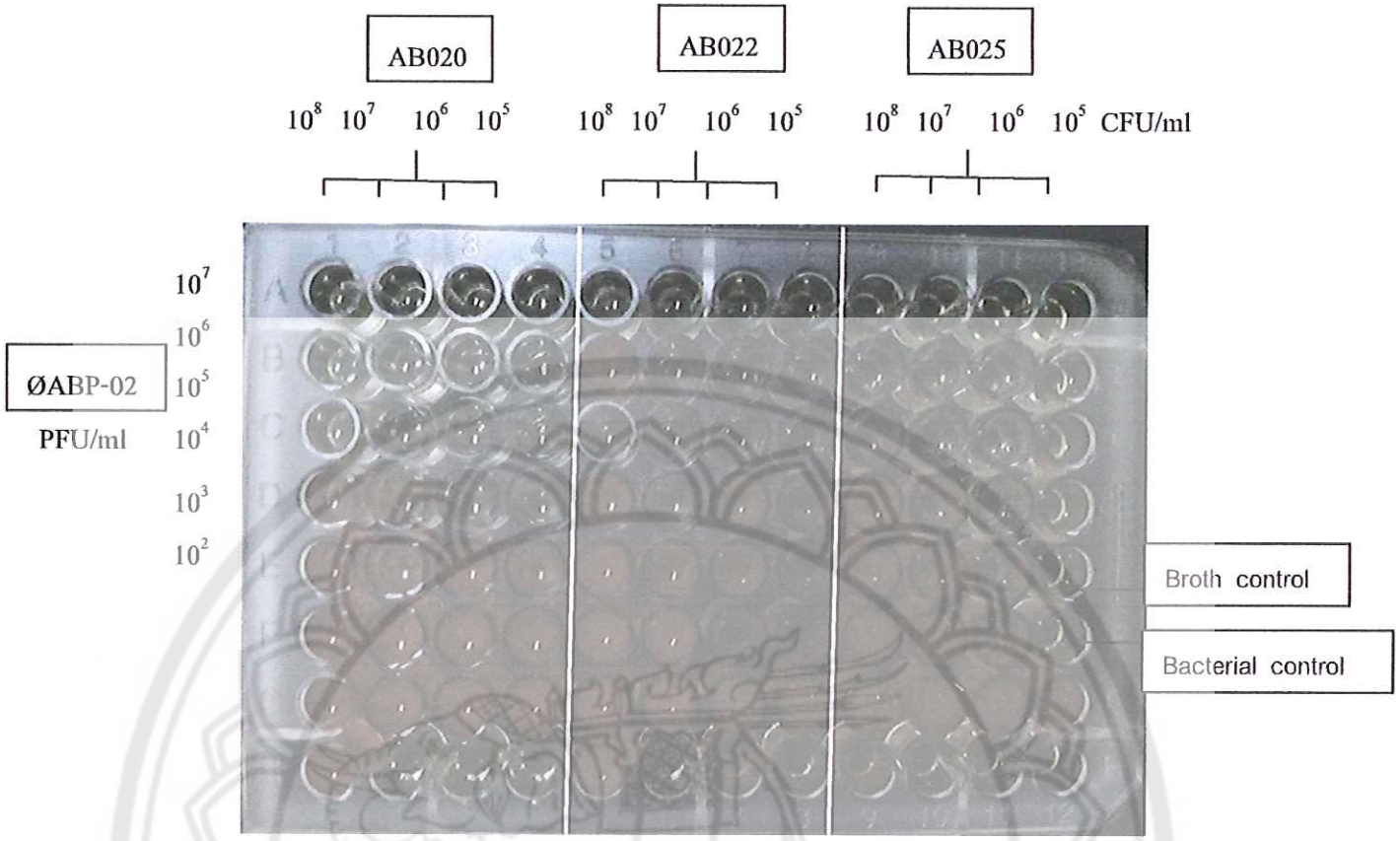
เชื้อ	OD 595	ร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์โดยแบคเทอริโอเฟจ	ความไวต่อ แบคเทอริโอเฟจของเชื้อ
AB15	2.76± 0.20	ไม่ยับยั้ง	no susceptible
AB24	3.45±0.40	51.33065	ØABP-19
AB25	1.67±0.42	60.61947	ØABP-2/19/29/39
AB26	3.05±0.26	78.47571	ØABP-2/19/29/39/44
AB35	3.21±0.27	ไม่ยับยั้ง	no susceptible
AB38	3.44±0.38	65.35362	ØABP-2/44
AB52	3.18±0.35	51.11761	ØABP-19/29
AB58	2.10±0.13	93.2547	ØABP-2/19/29/39
AB61	1.64±0.45	81.37741	ØABP-2/19/29/39
AB63	1.5±0.35	77.70547	ØABP-2/19/29/39/44
AB65	1.90±0.33	81.71968	ØABP-2/19/29/39
AB66	1.52±0.36	ไม่ยับยั้ง	no susceptible
AB67	1.88±0.21	90.8575	ØABP-2/19/29/39
AB68	2.00±0.48	86.48649	ØABP-2/19/29/44
AB71	2.04±0.32	78.631	ØABP-2/19/29/39
AB86	1.53±0.54	ไม่ยับยั้ง	ØABP-19/29

4.การหาปริมาณ bacteriophage และ bacteria ที่เหมาะสมในการทำ growth inhibition assay

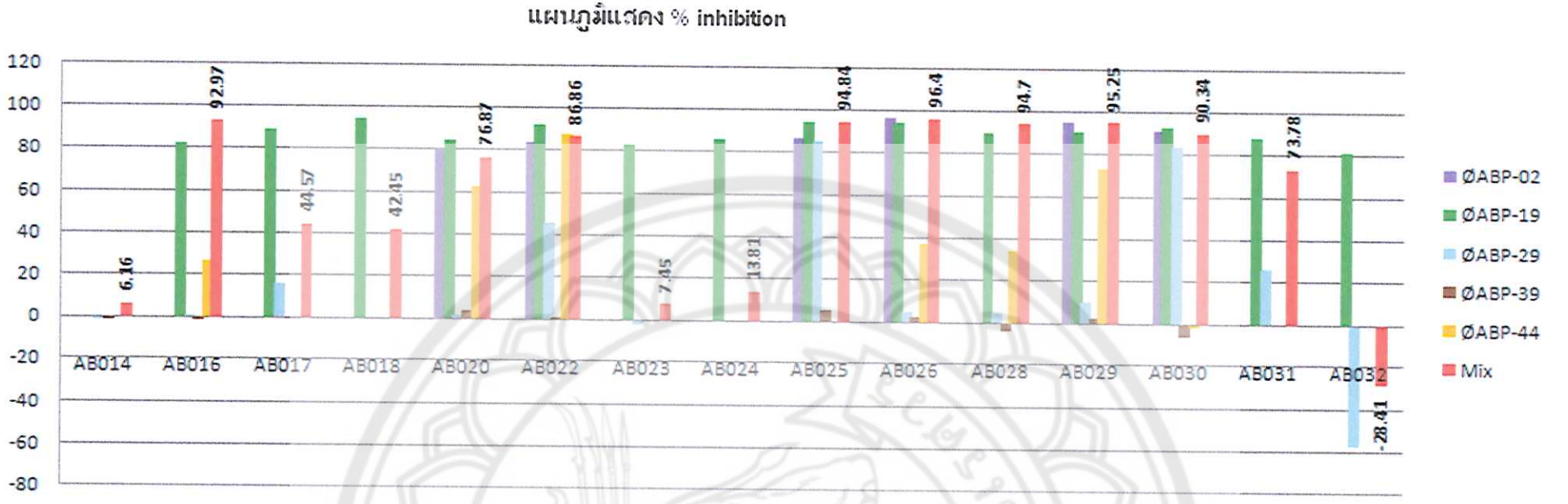
จากการทดสอบเพื่อหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจ และ bacteria ที่เหมาะสมโดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อ *A. baumannii* 3 isolate คือ AB020, AB022 และ AB025 ที่อยู่ในระยะ log phase และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nmประมาณ 0.3 – 0.4 (มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml) และทำการเจือจางเชื้อ AB020, AB022 และ AB025 ให้ได้ระดับความเจือจางเป็น 10^5-10^8 CFU/ml เมื่อนำมาทดสอบกับแบคเทอริโอเฟจ ØABP-02 ที่ระดับความเจือจาง 10^2-10^7 PFU/ml พบว่าปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10^5-10^7 PFU/ml ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ได้ตั้งแต่ well ที่ไม่ได้ทำการเจือจางเชื้อจนถึงความเจือจาง 10^6 CFU/ml (รูปที่ 6) ดังนั้นผู้ทำการศึกษาจึงเลือกปริมาณแบคเทอริโอเฟจ เท่ากับ 10^6 PFU/ml และเลือกปริมาณ bacteria ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 0.3 – 0.4 เท่ากับ 10^8 CFU/ml (undilute) สำหรับใช้ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* โดยแบคเทอริโอเฟจ isolate ต่างๆ โดยวิธี growth inhibition assay ต่อไป

5.การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* โดย แบคเทอริโอเฟจ โดย วิธี Colorimetric assay growth inhibition

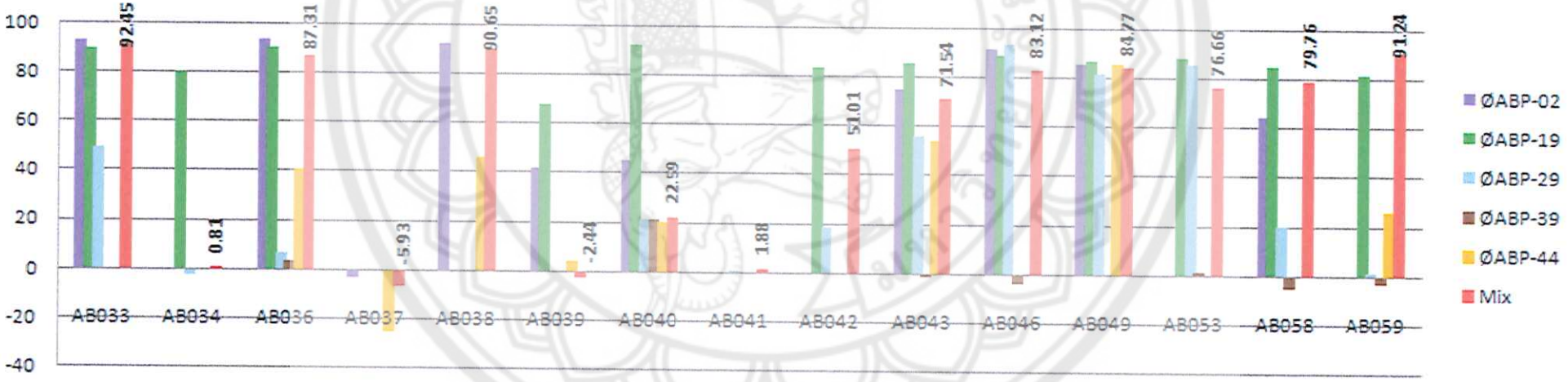
จากการทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้ปริมาณแบคเทอริโอเฟจตั้งต้นเท่ากับ 10^6 PFU/ml โดยผสมแบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 สายพันธ์ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 : 1 และใช้เชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml (undilute) ได้ผล % growth inhibition ของแบคเทอริโอเฟจ แต่ละ isolate ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ได้มากกว่า 50 % แสดงดังตารางที่ 7 และรูปที่ 7 จากนั้นทดสอบความสามารถของ bacteriophage cocktail กับ *A. baumannii* โดยใช้ *A. baumannii* 44 สายพันธ์วิธี Colorimetric assay growth inhibition ผลแสดงดังรูปที่ 8



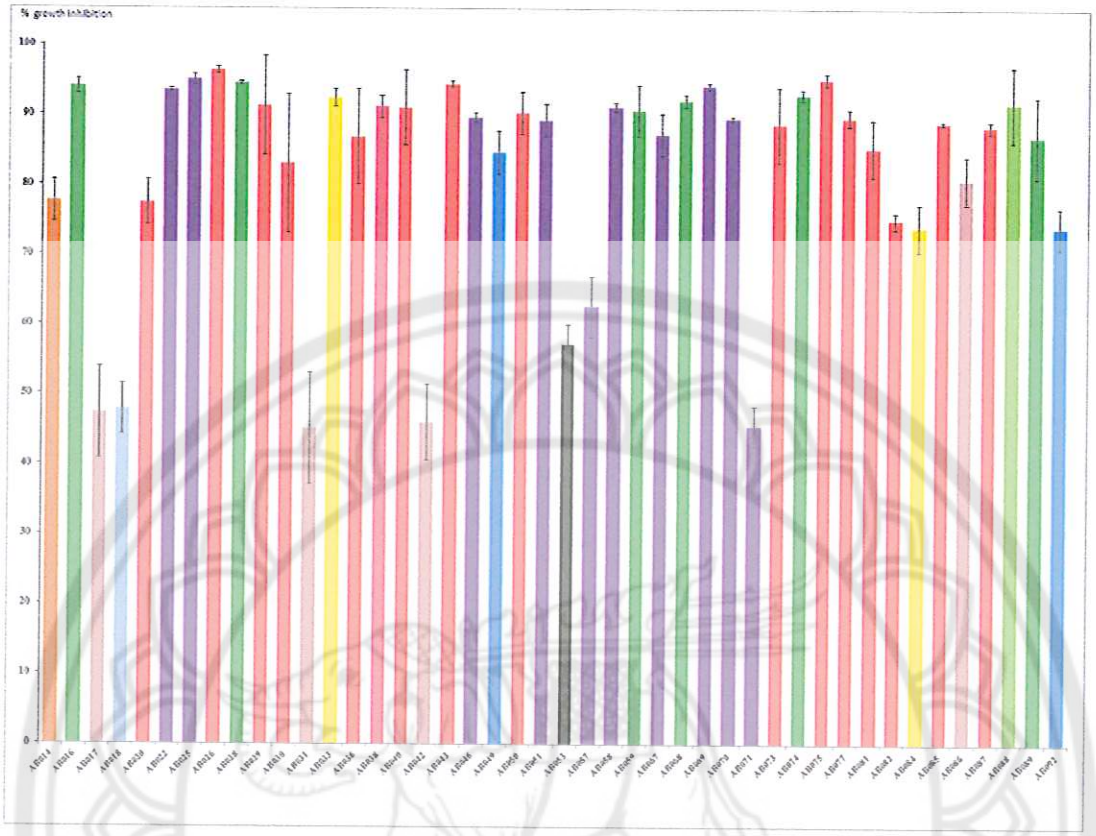
รูปที่ 6 แสดงการหาปริมาณแบคเทอริโอเฟจ และ แบคทีเรียที่เหมาะสม



รูปที่ 8 แสดง % growth inhibition ของเชื้อ *A. baumanii* isolate AB014-AB032



รูปที่ 7 แสดง % growth inhibition ของเชื้อ *A. baumanii* isolate AB033-AB059



รูปที่ 8 แสดงผล % growth inhibition ของ bacteriophage cocktail ต่อเชื้อ *A. baumannii* isolates แต่ละแท่งแสดง % growth inhibition ต่อเชื้อ *A. baumannii* strains. The color of the bar represents the bacteriophage susceptibility group; Group B; light blue, Group C; brown Group D; orange, Group E; pink, Group F; yellow Group G; black Group H; violet Group I; dark blue, Group J; light green Group K; dark green Group L; red

ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* โดยแบคเทอริโอเฟจ isolates

bacteriophage	%growth inhibitionที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 50 %
ØABP-02	48.08
ØABP-19	88.46
ØABP-29	21.15
ØABP-39	0
ØABP-44	11.54
Bacteriophage cocktail	59.62

หมายเหตุ

Bacteriophage cocktail ที่ใช้เตรียมจากอัตราส่วนของ phage ØABP-02 : ØABP-19 : ØABP-29 : ØABP-39 : ØABP-44 เท่ากับ 1 : 1 : 1 : 1 : 1 ซึ่งมีปริมาณแบคเทอริโอเฟจ เท่ากับ 10^6 PFU/ml เช่นเดียวกับแบคเทอริโอเฟจ isolateอื่นๆ

6. การทดสอบความจำเพาะของ bacteriophage cocktail กับแบคทีเรียสายพันธ์ต่าง ๆ

ผลการทดสอบความจำเพาะของ bacteriophage cocktail กับแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ เทียบกับ *A. baumannii* ที่ไวต่อ bacteriophages พบว่า bacteriophage cocktail มีความจำเพาะกับ *A. baumannii* ค่อนข้างสูง โดยให้ค่าเฉลี่ย % growth inhibition โดย bacteriophage cocktailอยู่ในช่วง 20- 83% ขึ้นอยู่กับความไวต่อแบคเทอริโอเฟจของเชื้อ โดย bacteriophage cocktailไม่สามารถยับยั้งหรือยับยั้ง แบคทีเรีย species อื่นๆใน เปอร์เซ็นต์ต่ำ มีค่าเฉลี่ย % growth inhibition 0-25 % (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ โดย bacteriophage cocktail

แบคทีเรียสายพันธ์ต่าง ๆ	ความไวต่อ แบคเทอริโอเฟจของเชื้อ	ค่าเฉลี่ย % growth inhibition โดย mixture bacteriophages
A. baumannii AB016	ØABP-19/29/39/44	82.92 + 0.3
A. baumannii AB020	ØABP-2/19/29/39/44	83.25± 0
A. baumannii AB022	ØABP-2/19/29/39	69.79±0.7
A. baumannii AB026	ØABP-2/19/29/39/44	82.45+0.8
A. baumannii AB028	ØABP-19/29/39/44	77.40±1.23
A. baumannii AB033	ØABP-2/19/29	39.33±6.8
A. baumannii AB034	ØABP-19/29	20.39±2.6
A. baumannii AB040	ØABP-2/19/29/39/44	73.80±0.7
A. baumannii AB043	ØABP-2/19/29/39/44	58.95±0.4
A. baumannii AB058	ØABP-2/19/29/39	62.49±4.3
A. baumannii AB063	ØABP-2/19/29/39/44	72.79±5.4
A. baumannii AB065	ØABP-2/19/29/39	68.03±0.92
A. baumannii AB073	ØABP-2/19/29/39/44	78.15±0.43
A. baumannii AB074	ØABP-19/29/39/44	75.87±0.57
A. baumannii AB088	ØABP-2/29/39/44	83.95±0.57

A. baumannii AB089	ØABP-19/29/39/44	81.72±0.89
B.cereus	Non susceptible	-2.02±1.5
B.subtilis	Non susceptible	25.65±4.9
E. faecalis	Non susceptible	0±18.6
E. aerugenea	Non susceptible	4.696449±2
E. coli	Non susceptible	0±2
K. pneumoniae	Non susceptible	0±11
Ps. Aeruginosa	Non susceptible	3.93±2.4
Ps. Fluorescens	Non susceptible	11.0±6.1
P. mirabilis	Non susceptible	-3.15±3.57
S. flexneri	Non susceptible	3.98±4.0
S. typhi	Non susceptible	1.8±1.1
V. parahemolyticus	Non susceptible	0±2.2
B. megaterium	Non susceptible	0±7.8

ข้อวิจารณ์ (Discussion)

เมื่อนำเชื้อ *A.baumannii* มาทดสอบความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *A.baumannii* ด้วยวิธี Disc diffusion test พบว่าเชื้อ *A.baumannii* มีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด แต่มียาต้านจุลชีพเพียง 2 ชนิด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A.baumannii* ได้ คือ Tigecycline และ Colistin ซึ่งในปัจจุบันสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยความชุกของการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A.baumannii* ส่วนมากดื้อยา carbapenems ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์แรงที่สุดและเป็นยาขนานสุดท้ายสำหรับรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ *A.baumannii* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ carbapenems ร้อยละ 2 ในปี พ.ศ. 2541 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 32 ในปี พ.ศ. 2546 และ ร้อยละ 73 ในปี พ.ศ. 2548 ไม่กี่ปีต่อมามีรายงานว่า*A.baumannii* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิด เรียกว่า pandrug-resistant *A.baumannii* (PDAB) ทำให้ยากต่อการรักษา(คณะกรรมการโครงการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) การรักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อยา carbapenems จึงต้องกลับไปใช้ยา colistin ที่เป็นยาเก่าเมื่อ 50 ปีก่อนซึ่งเป็นยาที่มีพิษ (สถาบันวิจัยสาธารณสุข,2555) ในช่วงปี 2545-2546 โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบยาต้านจุลชีพที่มีความไวต่อเชื้อ *A.baumannii* มากที่สุดคือ colistin มีความไวร้อยละ 96.4 ในพ.ศ. 2548 พบว่า ในโรงพยาบาลศิริราช เชื้อ *A.baumannii* มีความไวของเชื้อต่อยา cetriaxone ร้อยละ 3.9 และ cefoperazone/sulbactam ร้อยละ 42.1 (กัลยาณี ศุระศราค์และคณะ, 2007) การศึกษาของ Ailaterini Mastoraki และคณะ ซึ่งได้ศึกษาถึงอุบัติการณ์การติดเชื้อ *A.baumannii* พบว่ายาที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดคือยา colistin (Mastoraki et al., 2008)

แบคเทอริโอเฟจ(Bacteriophage) เป็นไวรัสที่สามารถinfectแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะโดยแบคเทอริโอเฟจจะจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น Capsule, Lipopolysaccharide (Boyd, et al 1995) การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการยับยั้งเชื้อที่เป็น bacterial host สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Plaque assay ,colorimetric microtiter plate method (Knezevic et al, 2008) ซึ่งวิธี Plaque assay เป็นวิธีที่มีการใช้ทั่วไปสำหรับการหาปริมาณ แบคเทอริโอเฟจโดยการเทวุ้นแข็ง (1.5% agar) ลงใน plate เพื่อเป็นพื้น แล้วเททับด้วยวุ้นอ่อน (0.5-0.7% agar) ที่ผสมด้วยเซลล์แบคทีเรียและ phage ที่จำเพาะกับแบคทีเรียนั้น เมื่อปล่อยให้แบคทีเรียเจริญจะเห็นบริเวณกลมใสที่เรียกว่า plaque ซึ่งเป็นบริเวณที่แบคทีเรียถูก ทำลายเนื่องจาก phage เพิ่มจำนวนในแบคทีเรียนั้นและทำให้เซลล์แตกส่วนบริเวณที่ไม่มี phage ก็จะเห็นเป็นพื้นสีขาวขุ่นเนื่องจากแบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนโดยไม่ถูกทำลาย ส่วน Colorimetric microtiter plate method เป็นวิธีที่วิเคราะห์การเปรียบเทียบ

ความเข้มของสีวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์(Spectrophotometer) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด ตัวอย่างเช่น การวัดปริมาณโปรตีน (protein assay), การหาปริมาณไนไตรต์ และ การหาปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากมีการนำไปใช้ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยใช้ แบคเทอริโอเฟจ เช่น *Pseudomonas aerugiosa* และยังไม่ค่อยนิยมนำมาใช้ในการศึกษา Phage ของ *A. baumannii* โดยวิธีนี้มีข้อดีคือใช้เวลาในการตรวจดูความสามารถของ Phage น้อยกว่า Plaque assay นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีขั้นตอนง่ายไม่ซับซ้อน รวมทั้งปริมาณ phage ที่ใช้ในการทดสอบใช้เพียงปริมาณเล็กน้อย จากประโยชน์และคุณสมบัติของวิธี Colorimetric microtiter plate method ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะนำวิธีนี้มาประยุกต์ใช้กับการศึกษาความสามารถของ phageในการศึกษา Phage ของเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้หาปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยวิธี colorimetric microtiter plate มาใช้ในขั้นตอนการทำ Growth inhibition โดยใช้ Triphenyltetrazolium chloride (TTC เป็น reagent ในการตรวจหาเซลล์ที่มีชีวิต) เมื่อทำปฏิกิริยา reduction กับ H^+ สารนี้จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นสาร Formazan ที่มีสีแดง เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ dehydrogenase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหายใจและปลดปล่อย H^+ ออกมา เกิดการทำปฏิกิริยากับ TTC เปลี่ยนเป็นสีแดง ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตก็จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสี จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการแยกเซลล์ที่มีชีวิตออกจากเซลล์ที่ไม่มีชีวิตได้ (สุธนัย ภักดีและคณะ ,2557) โดยในการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถของ phageในการศึกษา Phage ของ *A. baumannii* ด้วยวิธี growth inhibition มีการใช้ปริมาณ phage เท่ากับ 10^6 PFU/ml ส่วนปริมาณ Bacterial host เท่ากับ 10^8 CFU/ml วัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 0.3-0.4 ซึ่งผลการทดสอบพบว่า % growth inhibition ของแบคเทอริโอเฟจ แต่ละ isolate ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 50 % ดังนี้ ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39, ØABP-44และ Bacteriophage cocktail เท่ากับ 48.08% ,88.46% ,21.15% ,0% ,11.54% และ 59.62% ตามลำดับ ในงานวิจัยอื่นๆก่อนหน้าได้มีการศึกษาผลของ phage ต่อการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดย Knezevic และ Petrovic ได้มีการรายงานว่า phage สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ 50% (Knezevic et al., 2008) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เช่นเดียวกัน

ในการศึกษาการจัดกลุ่มตามความไวต่อแบคเทอริโอเฟจ 5 สายพันธ์ของเชื้อ *A. baumannii* พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม A ที่ไม่ไวต่อแบคเทอริโอเฟจทั้ง 5 และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ดื้อต่อยา โดยแบคทีเรียที่มีการพัฒนากลไกการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งในปัจจุบันกลไกของแบคทีเรียที่ต้านการติดเชื้อของแบคเทอริโอเฟจมี 3 กลไกได้แก่ 1) การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลของแบคทีเรียที่ทำหน้าที่เป็น receptor 2) ความ

หลากหลายของ restriction–modification (RM) systems ของแบคทีเรียที่มีต่อการทำลาย genome ของแบคเทอริโอเฟจและ 3) การมีลำดับยีนที่มีผลต่อต้านทำลายแบคเทอริโอเฟจของจุลินทรีย์ในตำแหน่ง CRISPR (Bikard et al., 2012) *A. baumannii* ที่อยู่ในกลุ่ม L (14 สายพันธุ์) สามารถการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจได้ทั้ง 5 สายพันธ์ แบคทีเรียกลุ่มนี้อาจจะมีความหลากหลายของ receptor ที่จำเพาะต่อแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกาะและการเจาะเข้าไปในเซลล์โฮสต์ (Rakhuba et al., 2010) การศึกษาครั้งนี้พบว่า ØABP-01 ซึ่งเคยมี lytic สูง และมีการติดเชื้อกว้าง (100%) เมื่อใช้โฮสต์ *A. baumannii* ซึ่งถูกแยกออกจากโรงพยาบาลเดียวกับโรงพยาบาลที่แยก bacteriophage (Kitti et al., 2014) กลับมีการติดเชื้อ *A. baumannii* ได้แคบ (9.23%) โดยสามารถอธิบายได้ด้วย receptor site ที่จำเพาะต่อแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้ที่อยู่บนผิวแบคทีเรีย *A. baumannii* มีความจำเพาะสูงโดยพบว่าหากแบคทีเรียมีความแตกต่างของ cell wall polysaccharide บนผนังเซลก็จะเป็นปัจจัยสำคัญในความไวต่อแบคเทอริโอเฟจ (Ainsworth et al., 2014) ความแตกต่างของค่า multiplicity of infection (MOI) ระหว่างแบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจพบว่ามีผลต่อความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ในการศึกษานี้เราพบว่า MOI 0.01 ของแบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจให้ผลการยับยั้งที่ดี MOI นี้จึงถูกใช้ในการทำ growth inhibition ผลการศึกษาพบว่า bacteriophage cocktail สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม I, J, K และ L ได้ดี โดยให้ค่า % growth inhibition มากกว่า 70 % ซึ่งเชื้อ *A. baumannii* กลุ่ม I, J, K และ L เป็นสายพันธ์ที่มีคุณสมบัติติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจได้อย่างน้อย 4 หรือ 5 แบคเทอริโอเฟจ อย่างไรก็ตาม bacteriophage cocktail สามารถยับยั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรีย A. baumannii บางกลุ่ม (B, C, G, H) ได้ต่ำ ซึ่งอาจเป็นผลจากการเกิดขึ้นของสายพันธุ์แบคทีเรียที่กลายพันธุ์และสามารถทนต่อแบคเทอริโอเฟจ การกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้ในช่วงข้ามคืนบ่มของเชื้อแบคทีเรียกับแบคเทอริโอเฟจ ในระบบ microplate (Fridholm et al., 2005)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1.จากการศึกษาปริมาณแบคเทอริโอเฟจ และ bacteria ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* โดยแบคเทอริโอเฟจ isolate ต่างๆ โดยวิธี growth inhibition assay พบว่าปริมาณแบคเทอริโอเฟจ ที่เหมาะสมเท่ากับ 10^6 PFU/ml ส่วนปริมาณ bacteria ที่เหมาะสมเท่ากับ 10^8 CFU/ml (ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 0.3 – 0.4)

2.จากการทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* โดยใช้ปริมาณแบคเทอริโอเฟจ เท่ากับ 10^6 PFU/ml และใช้เชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ประมาณ 0.3 – 0.4 (มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml) พบว่า %growth inhibition ของ แบคเทอริโอเฟจ แต่ละ isolate ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 50 % ดังนี้ ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39, ØABP-44และ Bacteriophage cocktail เท่ากับ 48.08% ,88.46% ,21.15% ,0% ,11.54% และ 59.62% ตามลำดับ

3. จากการศึกษาคุณสมบัติของ bacteriophage cocktail ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* พบว่า bacteriophage cocktail สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตกับ A. baumannii ตั้งแต่ 45.1- 96% โดย bacteriophage cocktail มีประสิทธิภาพสูงกับสายพันธุ์ *A. baumannii* ที่สามารถติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ 5 สายพันธ์ (> 77%)

4. จากการศึกษาคุณสมบัติของ Bacteriophage cocktail ที่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ของเชื้อ*A. baumannii* พบว่า bacteriophage cocktail สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อ *A. baumannii* ที่ไวต่อ phage อยู่ในช่วง 51-90 % โดยไม่พบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อสายพันธ์ที่ไม่ไวต่อ bacteriophage

6. จากการศึกษาคุณสมบัติความจำเพาะของ bacteriophage cocktail กับ แบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ พบว่า bacteriophage cocktail มีความจำเพาะกับ *A. baumannii* ค่อนข้างสูง โดยให้ค่าเฉลี่ย % growth inhibition โดย bacteriophage cocktailอยู่ในช่วง 20- 83% ขึ้นอยู่กับความไวต่อแบคเทอริโอเฟจของเชื้อ โดย bacteriophage cocktail ไม่สามารถยับยั้งหรือยับยั้ง แบคทีเรีย species อื่นๆ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถนำ bacteriophage cocktail ไปประยุกต์เพื่อใช้ในการตรวจสอบและรักษาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. วีรพงศ์ วัฒนาวนิช. การติดเชื้ออะซินิโตแบคเตอร์ในผู้ป่วยที่รับการรักษาที่หออภิบาล. Songkla Med J 2013; 31:91-100.
2. โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.โรคติดต่อจากเชื้อ *Acinetobacter baumannii*; 2555 [สืบค้นเมื่อ 27 มิถุนายน 2557]. สืบค้นได้ที่: http://www .med.cmu.ac.th/etc/icc/2012/index.php/25-epidemic/2012-02-29-03-26-32/76-*acinetobacter-baumannii*
3. ธวัชชัย กิตติ การแยกและศึกษาลักษณะแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Acinetobacter baumannii* ที่แยกจากบ่อบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. 2555.
4. ภัทราภรณ์ รอดเสถียร.การดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายขนานของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในโรงพยาบาลลพบุรี.ขอนแก่นเวชสาร.2551;32:74-81.
5. วิชัย สันติมาลีวรกุล.สถานการณ์การติดเชื้อและกลไกการดื้อยาโดยเชื้อ*Acinetobacter baumannii* . ไทยไภษัชยนิพนธ์.2552;(3):1-16.
6. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.สถานการณ์เชื้อดื้อยาในประเทศไทย.2555.
7. สุธนัย ภักดี , วิชชา สอาดสุด, อุราภรณ์ สอาดสุด, และ ชาติชาย โขนงนุช.การทดสอบการช้ำบนผิวส้มสายน้ำผึ้งด้วยสาร 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride The Bruise Detection on Tangerine cv. Sainampueng with 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 2557
8. อัญชุลี เลิศสงคราม. แบคเทอริโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม.2555;3:16-23.
9. Ackermann HW and Felix d'Herelle-decouvreur (1997) des bacteriophages. Med. Sci. 8:3–6
10. 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
11. Ainsworth S, Sadovskaya I, Vinogradov E, Courtin P, Guerardel Y, Mahony J et al (2014) Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity. MBio 5(3):e00880-14

12. Allen DM, Hartman BJ (2000) Acinetobacter specied. In: Mandell GL,Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5 th ed. Philadelphia, Pennsylvania. Churchill Livingstone. 2339-44.

13. Alp E, Coruh A, Gunay GK, Yontar Y, Doganay M (2012) Risk factors for nosocomial infection and mortality in burn patients: 10 years of experience at a university hospital. J Burn Care Res 33(3):379-85

14. Bergogne-Berezin, Towner KJ (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens:microbiological, clinical, and epidemiological features. Clinical Microbiology Reviews. 9(2):148-65

15. Bikard D, Marraffini LA (2012) Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. Curr Opin Immunol. 24(1):15-20

16. 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

17. Bonomo, R. A., and Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis, 43 Suppl 2, S49-56. doi: 10.1086/504477.

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

19. Boyd, RF(1995) Basic Medical Microbiology. 5th Ed. The United States of America:Little and Brown

20. 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

21. 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 □-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. J Hosp Infect 60:14–8

22. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiol. 8(6):769-83

23. Chaiwarith R, Mahatthanaphak S, Boonchoo M, Supparatpinyo K, Sirisanthana T (2005) Pandrug-resistant Acinetobacter baumannii at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. J Infect Dis Antimicrob Agents 22:1-8

24. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol 7:1127-38

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

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

27. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA (2006) The diversity of definitions of multidrugresistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology. 55:1619-29.

28. Fridholm H, Everitt E (2005) Rapid and reproducible infectivity end-point titration of virulent phage in a microplate system. J Virol Methods 128(1-2):67-71

29. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA (2012) Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 with human lung epithelial cells, Galleria mellonella caterpillars and mice. Infect Immun 80:1015-24.

30. 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.

31. Jin H, Xu XM, Mi ZH, Mou Y, Liu P (2009) Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. Chin Med J 122(9):1080

32. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH, Li YH et al (2012) Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects Acinetobacter baumannii clinical isolates. BMC Microbiol 12:156

33. Joyce M, Woods CW (2004) Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. Infect Dis Clin North Am 18:401-34

34. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, et al (2009) Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS Microbiol Lett 301:224-31

35. Kitti T, Thummeepak R, Thanwisai A, Boonyodying K, Kunthalert D, Ritvirool P et al (2014) Characterization and detection of endolysin gene from three *Acinetobacter baumannii* bacteriophages isolated from sewage water. Indian J Microbiol 54(4):383-8

36. Knezevic P, Petrovic O (2014) A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on Pseudomonas aeruginosa biofilm. J Microbiol Methods 74(2-3):114-8

37. Kuo LC, Lai CC, Liao CH, et al (2007) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. Clinical Microbiology and Infection. 13(2):196-8

38. Lee NY, Lee HC, Ko NY, et al. (2007) Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. Infection Control and Hospital Epidemiology. 28(6): 713-9

39. Lee CN, Tseng TT, Lin JW, Fu YC, Weng SF, Tseng YH (2011) Lytic myophage Abp53 encodes several proteins similar to those encoded by host *Acinetobacter baumannii* and phage phiKO2. Appl Environ Microbiol 77:6755–6762

40. Magnet S, Courvalin P, Lambert T (2001) Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(12): 3375-80.

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

42. 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.

43. Niumsup PR, Boonkerd N, Tansawai U and Tiloklurs M (2009) Carbapenem-resistant A. baumannii producing OXA-23 in Thailand. Jpn J Infect Dis 62(2):152-4.

44. 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.

45. Poirel L, Nordmann P (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* :mechanisms and epidemiology. Clinical Microbiology and Infection 12(9):826-36.

46. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Pol J of Microbiol 59(3):145-155

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

48. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, et al (2010) The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect Immun 78:3993-4000.

49. Schreckenberger PC, Daneshvar ML, Weyant RS, Hollis DG (2003) Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and other nonfermentative gram negative rods. In: Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C. American Society for Microbiology 749–79.

50. Seifert H. Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Baneechoutte M (1997) Distribution of Acinetobacter species on human skin ; comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol 35:2819 – 25.

51. Su, MT, Venkatesh, TV and Bodmer, R (1998) Large- and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA. Biotechniques 25(1):44-46.

52. Trollip A, Albert H, Maskell T (2001) Bacteriophage-based technologies for the rapid diagnosis and drug susceptibility testing of tuberculosis. Am Clin Lab 20(9):39-42

53. 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.

54. 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.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายระพี ธรรมมีภักดิ์ นางสาวอุดมลักษณ์ เหลืองทองคำ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร นางสาวกรณ์พินภรณ์ มณีน้อย นางสาวพัทยา พรวิชัย นายมนัสวี คนหลัก นายณัฏฐพล อยู่คง นิสิตปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ นายธวัชชัย กิตติภาควิชาแพทย์ตะวันออก วิทยาลัยเชียงราย ที่ร่วมดำเนินการวิจัย และสุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและภาควิชา จุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

ภาคผนวก 1 (Appendix I)

รูปที่ 9 แสดงการทดสอบ ด้วยวิธี Plaque assayเพื่อหาปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ

ภาคผนวก 2 (Appendix II)

Output ที่ได้จากโครงการ

ส่งบทความตีพิมพ์ในวรสารระดับนานาชาติ African Journal of Microbiology Research (0.5) ในหัวข้อเรื่อง

""Efficacy of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage cocktail on Acinetobacter baumannii growth"

Efficacy of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage cocktail on *Acinetobacter baumannii* growth

Thawatchai Kitti[1], Rapee Thummeepak[2], Udomluk Leungtongkam, Duangkamol Kunthalert[2], Sutthirat Sitthisak[2,3]

[1]Faculty of Oriental Medicine, Chiang Rai College, Chiang Rai, Thailand, 57000

[2]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000.

[3]Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000.

Running title: Growth inhibition of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage cocktail

Correspondence: Assist. Prof.Dr.Sutthirat Sitthisak

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

(Tel): 66-55-964626, 66-84-5734203

(Fax): 66-55-964770

(E-mail): sutthirats@nu.ac.th

Abstract

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen which is a major cause of nosocomial infection. Bacteriophages are bacterial viruses that are used as alternative agents in the treatment of multidrug resistant bacterial infections. In this research, our purpose was to investigate the efficacy of a cocktail of 5 bacteriophages. Ten bacteriophage isolates were determined for the host range analysis and five bacteriophages, ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 and ØABP-44, that showed broad host range (36.9-64.6 %) were selected for the preparation of the bacteriophage cocktail. Transmission electron microscopy revealed ØABP-02 and ØABP-44 belonged to family Myoviridae and ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 belonged to family Podoviridae. The bacteriophage cocktail was tested for its efficacy on growth inhibition against 44 *A. baumannii* clinical isolates using the colorimetric microtiter plate method. The results of the growth inhibition assay of the bacteriophage cocktail showed that the growth inhibition against *A. baumannii* ranged from 45.1%- 96%. High efficacy of the bacteriophage cocktail was found against the *A. baumannii* strains that can be infected by the 5 bacteriophages (>77%). Our study demonstrated high efficacy of the bacteriophage cocktail on inhibiting the growth of *A. baumannii*. The bacteriophage cocktail is a valuable alternative agent for controlling the multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals.

Keywords: Bacteriophage, *Acinetobacter baumannii*, growth inhibition, host range

Introduction

A. baumannii are opportunistic pathogens that cause a variety of infections such as respiratory tract infections, urinary tract infections, skin infections and bacteremia. *A. baumannii* develop antibiotic resistance which is a serious problem in the treatment of these infections. The infections of multi-drug resistant *A. baumannii* (MDR-AB) and extensively drug-resistant *A. baumannii* (XDR-AB) are of particular concern in patients in intensive care and burn units which cause high mortality rates [1, 2]. In recent decades, the prevalence of MDR-AB and XDR-AB has increased worldwide. MDR-AB and XDR-AB infected patients must stay longer in hospital than patients without such drug resistant infections. This leads to a higher cost of hospitalization. Novel methods are therefore needed for the treatment of MDR-AB and phage therapy is one candidate for treating MDR-AB. Bacteriophages are viruses that infect bacteria which lyse the host cell when the progeny of the phage particle leave the cell. So far, more than 10 *A.baumannii* bacteriophages have been isolated and investigated for their biological properties [3-13]. These bacteriophages have been examined for being potential candidates in phage therapy. The host range of bacteriophages is significant to bacteriophages to use as antibacterial agents. However, narrow host specificity of *A. baumannii* bacteriophages have been reported from different geographical isolates which ranged from 13%-59% [5, 9, 12]. Consequently, to assure that bacteriophages possess a broad host range activity that includes the target bacteria, multiple phage types possessing a diversity of host ranges are often combined into mixtures called 'phage cocktails' [14]. Phage cocktails are applied to improve the chances of success in bacterial killing in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* and *E.coli* O157:H7 [14]. Due to the narrow host range of *A. baumannii* bacteriophages, the objective of our study

was to screen new bacteriophages with broad host range activity and determine the efficacy of *A.baumannii* bacteriophage cocktail in inhibiting the growth of *A.baumannii.*

Materials and methods

Bacteria strains and bacteriophages in this study

Ten *A. baumannii* bacteriophages which isolated from wastewater treatment plants from two hospitals in Phitsanulok Province were used in this study [11]. These are designated as ØABP-01, ØABP-02, ØABP-04, ØABP-05, ØABP-07, ØABP-19, ØABP-24, ØABP-29, ØABP-39 and ØABP-44. Sixty-five *A.baumannii* isolates were obtained from SawanPracharak Hospital, Nakorn Sawan, Thailand. Confirmation of the Acinetobacter species was based on biochemical tests and detection of the 16S rRNA gene.

Host range analysis

Host range analysis of the ten bacteriophages was determined by spot tests using 65 *A. baumannii* clinical isolates. 100 ul of overnight bacterial cultures were added to 2.5 ml of soft agar, mixed gently and poured into an agar plate. Subsequently, 5 µl aliquots of phage suspension (1.0×10^8 PFU) were spotted on the lawn of bacteria. Plates were dried and incubated at 37°C for 7 hrs. The clearance zone indicating lysis at the spot of phage inoculation implied that the host was sensitive.

Morphology of bacteriophages

Five bacteriophages which showed high lytic activity were used to determine the morphology. Phage suspension (10^{12} PFU/ml) was dropped onto 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).

Bacteriohage enrichment and preparation of bacteriophage cocktail

A.baumannii were grown in 100 ml LB broth until OD_{600} reached 0.4. Phages were added at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 and incubated at 37°C until complete lysis. Then, 2-3 ml chloroform was added and bacterial debris was pelleted by centrifugation at 4000 g for 10 min. Each phage was enriched three times and the phage concentration was determined using the plaque assay method [11]. The phage stocks were stored at 4 ± 1 °C. Bacteriohage titer was determined before a growth inhibition assay was performed. The titer of each bacteriophage was determined and diluted into 10^6 PFU/ml in SM buffer. Each bacteriophage was mixed (1:1:1:1:1) to prepare the bacteriophage cocktail.

Growth inhibition assay

A bacterial growth inhibition assay was performed as described by Knezevic et al (2008) using the cocktail of five *A.baumannii* bacteriophages [15]. Briefly, *A. baumannii* were cultured in LB broth incubated at 37°C with shaking at 150 rpm / min for 24 hrs. The overnight cultures were diluted (1:100) into LB broth and incubated at 37°C with shaking at 150 rpm / min until OD_{650} reached 0.4 then 50 ul (approximately 2 × 10^8 CFU/ml) were inoculated in 50 ul double strength LB broth into 96-well microtiter plates wells flat bottom (Nunc,USA). One hundred microliters of the five bacteriophage cocktail was added to each well. Then 50 ul of 0.1% filter sterilized TTC (Hi-media) was added. The plate was incubated at 37°C in the dark for 24 hrs. The absorbance at OD540 was measured by a Micro-plate Reader. The experiment was repeated twice with triplicate samples. The percentage inhibition of the bacteriophage cocktail against all *A. baumannii* was calculated using the formula:

% inhibition = The absorbance of controls -the absorbance of treated wells x 100

The absorbance of controls

Results

1. Host range analysis

Ten *A. baumannii* bacteriophages isolated from hospitals in Phitsanulok Province were used to investigate the ability to infect 65 *A. baumannii* isolated from a hospital in Nakorn Sawan Province. Five bacteriophages that showed a broad host range were ØABP-02 (49.23%), ØABP-19 (63.07%), ØABP-29 (64.61%), ØABP-39 (50.8 %) and ØABP-44 (36.9 %) (Table 1). Five that showed low specific host range from 0%-25.75% were ØABP-01, ØABP-04, ØABP-05, ØABP-07 and ØABP-24 (Table 1). ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 and ØABP- 44 were selected in this study for the preparation of the bacteriophage cocktail.

2. Bacteriophage susceptibility type of *A. baumannii*

We classified 65 *A. baumannii* by spot tests using 5 bacteriophages, into 12 groups; A-L (Table 2). Among the bacterial strains tested, 21 were bacteriophage non-susceptible strains (group A) and were also non multi-drug resistant strains. Fourteen *A. baumannii* were susceptible to infection by 5 bacteriophages. All of them were multi-drug resistant bacteria and belonged to group L (Table 2).

Phage morphology

To classify ØABP-02, ØABP-19, ØABP-29, ØABP-39 and ØABP- 44 into morphotype specific groups, phage particles were examined with an electron microscope. Our data showed ØABP-19, ØABP-29 and ØABP-39 have an icosahedral head (70, 110, 70 nm) with a short tail, belonging to the Podoviridae family

(Fig. 2a, b, c). ØABP-02 and ØABP-44 showed a contractile tail (11, 60 nm) and an icosahedral head (80, 44 nm) (Fig. 2d,e), a morphology characteristic of the family Myoviridae. All five bacteriophages were tailed bacteriophages and identified as members of order Caudovirales

3. Effect of bacteriophage cocktail on *A. baumannii* growth

We used the colorimetric microtiter plate method to determine the efficacy of the five bacteriophages in inhibiting *A. baumannii* growth. The ratio of bacteriophage to infected target host was preliminarily determined using one bacteriophage. We found that the amount of bacteriophage and *A. baumannii* that showed good inhibition effects was 10^6 PFU/ml and 10^8 CFU/ml (data not shown). The effects of the bacteriophage cocktail on bacterial growth was tested using 44 *A. baumannii.* The results of the growth inhibition assay using the bacteriophage cocktail are presented in Table 2 and Fig. 2. The bacteriophage cocktail exhibiting the growth inhibition of *A. baumannii* ranged from 45.1%-96% (Fig. 2). *A. baumannii* that can be infected with the 5 bacteriophages (group L) showed the percentage growth inhibition higher than 77 % (Fig. 2). No growth inhibition was found in the non MDR-AB strains which are bacteriophage non susceptible strains (group A).

Discussion

Bacteriophages have been used as antibacterial agents in some countries in Eastern Europe, particularly Poland, and the former Soviet republics [16]. Several studies have developed phage cocktails to increase the efficacy of bacteriophages [14]. In this study, we determined the host range of ten bacteriophages to identify five potential bacteriophages as a candidates for developing phage cocktails. Among the five bacteriophages in our study, two types belonging to podoviridae and myoviridae were observed under an

electron microscope. This reflects similar previous findings that most of the *A.baumannii* bacteriophages identified so far belong to Podoviridae and Myoviridae [3, 5-7, 9]. They are classified in Caudovirales which include 96% of bacteriophages isolates identified to date [17]. The host range activity is important information for using bacteriophages. None of our bacteriophages can infect the non-MDR *A. baumanii* (groupA). Bacteria have evolved an immunity mechanism to resist bacteriophage infection. To date, three bacterial immunity mechanisms have been found: first, the modification of surface elements that serve as phage receptors and second, the diversification of restriction–modification (RM) systems that attack phage genomes. The third is the generation of anti-phage sequences in CRISPR loci [18]. *A. baumannii* that belong to group L (14 isolates) was infected with the five bacteriophages. This group may have a variety of receptor sites on the cell surface that involve phage adsorption and penetration into the host cell. [19]. Our data indicates that ØABP-01, which showed high lytic activity and a broad host range (100%) when using *A. baumannii* host, which was isolated from the same hospital as the bacteriophage isolates, showed narrow host range activity (9.23%) [11]. This can be explained by the receptor site on the cell surface among *A. baumannii* isolates being highly specific for the bacteriophages. Differences in the cell wall polysaccharide structure receptor on the bacterial surface are found to be major factors in bacteriophage sensitivity [20].

The different MOI of bacteria and bacteriophages are involved in efficacy of inhibition. In this study we found the MOI 0.01 of bacteriophages and *A. baumannii* showed good inhibition effects. This MOI was used in the growth inhibition system. The bacteriophage cocktail showed high percent growth inhibition (> 70%) against the *A. baumannii* groups I, J, K and L. These strains are susceptible to at least 4 or 5

bacteriophages. However, a low percent of growth inhibition was found against some of the groups of *A. baumannii* (B, C, G, H). The occurrence of bacteriophage resistant mutant isolates may explain this phenomenon. Mutation can occur during overnight incubation of bacteria with bacteriophages in a microplate system [21].

Conclusion

In conclusion, this study showed the high efficacy of the bacteriophage cocktail against most phage susceptible *A. baumannii*. The bacteriophage cocktail was found to be potential agent against multi-drug resistance bacteria and have some future important in phage therapy.

Acknowledgements

We are grateful to Mr. Roy Morrien from Naresuan University language center for editing this manuscript. This work was supported by the grant from Office of Research Council of Thailand 2014 (R2557B004).

References

1. Alp E, Coruh A, Gunay GK, Yontar Y, Doganay M (2012) Risk factors for nosocomial infection and mortality in burn patients: 10 years of experience at a university hospital. J Burn Care Res 33(3):379-85
2. Park SY, Choo JW, Kwon SH, Yu SN, Lee EJ, Kim TH et al (2013) Risk Factors for Mortality in Patients with *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. Infect Chemother. 45(3):325-30
3. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ (2010) Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. Res Microbiol 161:308–314
4. Yang H, Liang L, Lin S, Jia S (2010) Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1

of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol 10:131

5. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH, Li YH et al (2012) Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. BMC Microbiol 12:156

6. Lee CN, Tseng TT, Lin JW, Fu YC, Weng SF, Tseng YH (2011) Lytic myophage Abp53 encodes several proteins similar to those encoded by host *Acinetobacter baumannii* and phage phiKO2. Appl Environ Microbiol 77:6755–6762

7. Popova AV, Zhilenkov EL, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Volozhantsev NV (2012) Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 332:40–46

8. Shen GH, Wang JL, Wen FS, Chang KM, Kuo CF et al (2012) Isolation and characterization of ukm18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 7:1–1

9. Thawal ND, Yele AB, Sahu PK, Chopade BA (2012) Effect of a novel podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* biofilm. Curr Microbiol 65:66–72

10. Yele AB, Thawal ND, Sahu PK, ChopadeBA (2012) Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. ArchVirol 157(8):1441-50

11. Kitti T, Thummeepak R, Thanwisai A, Boonyodying K, Kunthalert D, Ritvirool P et al (2014) Characterization and detection of endolysin gene from three *Acinetobacter baumannii*

bacteriophages isolated from sewage water. Indian J Microbiol 54(4):383-8

12. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G et al (2014) Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 9(8):e104853

13. Chang KC, Lin NT, Hu A, Lin YS, Chen LK, Lai MJ (2012) Genomic analysis of bacteriophage/AB1, a/KMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Genomics 97:249–255

14. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiol. 8(6):769-83.

15. Knezevic P, Petrovic O (2014) A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on Pseudomonas aeruginosa biofilm. J Microbiol Methods 74(2-3):114-8

16. Verbeken G, Pirnay JP, De Vos D, Jennes S, Zizi M, Lavigne R, Casteels M, Huys I (2012) Optimizing the European regulatory framework for sustainable bacteriophage therapy in human medicine. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 60(3):161-72

17. Ackermann HW (2009). Phage classification and characterization. Methods MolBiol 501:127-140

18. Bikard D, Marraffini LA (2012) Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. Curr Opin Immunol. 24(1):15-20

19. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Pol J of Microbiol 59(3): 145-155

20. Ainsworth S, Sadovskaya I, Vinogradov E, Courtin P, Guerardel Y, Mahony J et al (2014)

Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity. MBio 5(3):e00880-14

21. Fridholm H, Everitt E (2005) Rapid and reproducible infectivity end-point titration of virulent phage in a microplate system. J Virol Methods 128(1-2):67-71

Table Legends

Table 1. *A. baumannii* bacteriophages: host, source, plaque morphology and host range

Phage Isolates	Host bacteria	Source	Plaque size (mm)	Host range N = 65 (%)
ØABP-01	A1589	Buddhachinaraj hospital	5-8 clear	6 (9.23)
ØABP-02	A1389	Buddhachinaraj hospital	6-8 Clear with turbid	32 (49.23)
ØABP-04	A1522	Buddhachinaraj hospital	3-5 Clear with turbid	16 (24.61)
ØABP-05	A1521	Buddhachinaraj hospital	3-5 Clear with turbid	0 (0)
ØABP-07	A1386	Buddhachinaraj hospital	3-5 Clear	3 (4.62)
ØABP-19	A1589	Buddhachinaraj hospital	5-7 Clear	41 (63.07)
ØABP-24	A1244	Buddhachinaraj hospital	3-5 Clear	3 (4.62)
ØABP-29	A1589	Bangragam hospital	5-7 Clear	42 (64.61)
ØABP-39	A1511	Buddhachinaraj hospital	1-2 Clear	33 (50.8)
ØABP-44	ATCC19606	Buddhachinaraj hospital	4-6 Clear	24 (36.92)

Table 2 Bacteriophage susceptibility group among 65 *A. baumannii* isolates

Typing	Phage susceptibility pattern	MDR (%)	Non-MDR (%)	% inhibition of phage cocktail
A	Non-susceptible	0(0)	21 (32.3)	-
B	ØABP-19	1(1.5)	0 (0)	47.8± 3.6
C	ØABP-19/29	4(6.2)	0 (0)	45.1± 8 - 80.7± 3.3
D	ØABP-29/39	1 (1.5)	0 (0)	77.6± 2.98
E	ØABP-2/44	1(1.5)	0 (0)	91.2± 1.58
F	ØABP-2/19/29	2(3.1)	0 (0)	73.8± 3.3 - 92.4± 1.2
G	ØABP-19/29/39	1(1.5)	0 (0)	57.2± 2.7
H	ØABP-2/19/29/39	10(15.5)	0 (0)	45.4± 2.8 - 95.0± 0.7
I	ØABP-2/19/29/44	2(3.1)	0 (0)	73.8± 2.9 - 84.6± 3.0
J	ØABP-2/29/39/44	1 (1.5)	0 (0)	91.6± 5.37
K	ØABP-19/29/39/44	6 (9.2)	0 (0)	86.8± 5.7 - 94.5± 0.2
L	ØABP-2/19/29/39/44	15 (23.1)	0 (0)	77.4± 3.2 - 95.7± 0.4

Figure Legends

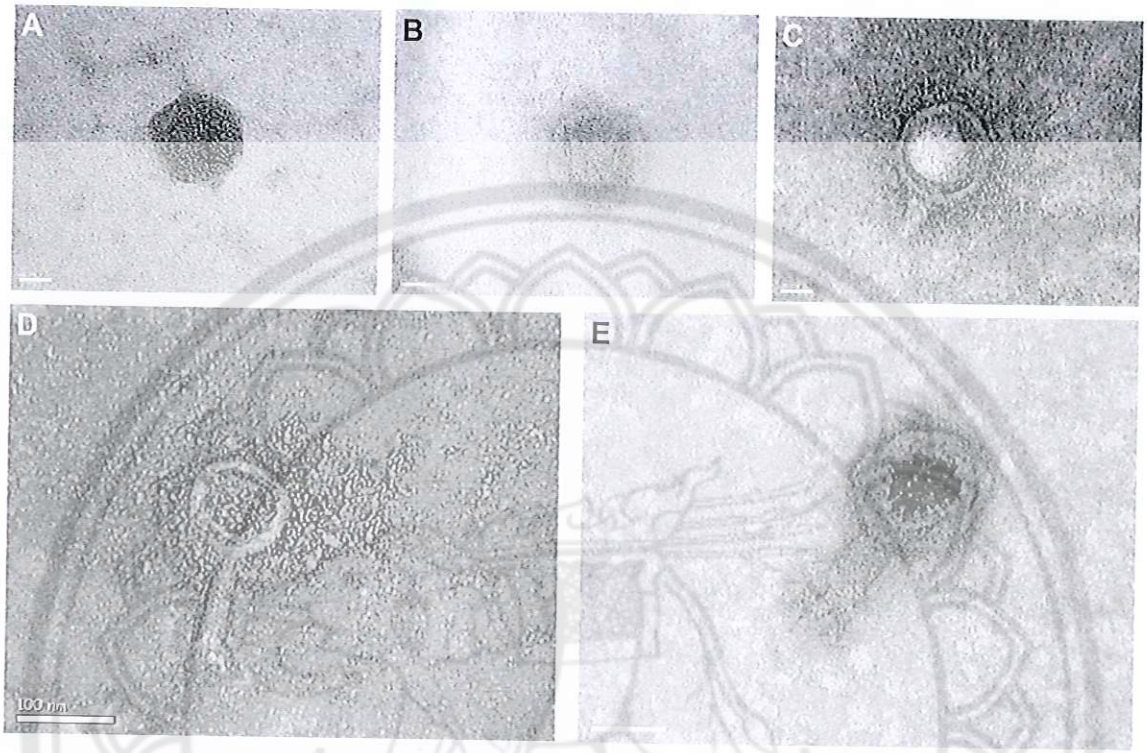


Fig. 1: Electron micrographs of bacteriophages; ØABP-19(A), ØABP-29(B) andØABP-39(C) belonging to the Podoviridae family. ØABP-02 (D) and ØABP- 44(E) belonging to the Myoviridae family.

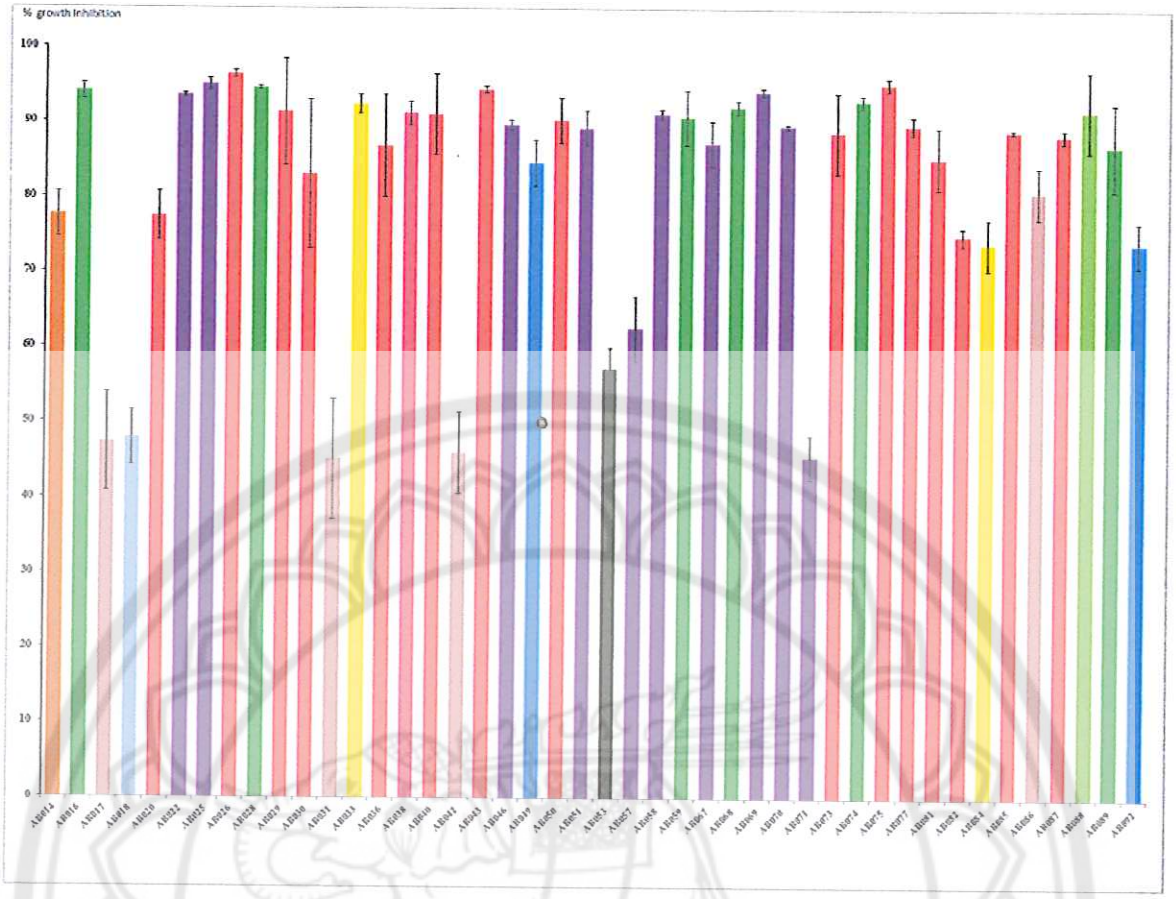


Fig. 2 Effects of the bacteriophage cocktail among 44 different *A. baumannii*. Each bar represents the % growth inhibition against *A. baumannii* strains. The color of the bar represents the bacteriophage susceptibility group; Group B; light blue, Group C; brown Group D; orange, Group E; pink, Group F; yellow Group G; black Group H; violet Group I; dark blue, Group J; light green Group K; dark green Group L; red