

การศึกษาหาความแตกต่างและวิวัฒนาการของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ชนิดที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ต่างกันโดยวิธี พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

สุมาลี ตั่งประดับกุล¹, พินน์นรา โรจนวิรัตน์², อัญชสา คณาบุรุษ² และ สูดา ตันพิบูลย์ศักดิ์¹

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

Abstract: Differentiation and Evolutionary Study Based on Lipopolysaccharide (LPS) Structure of *Burkholderia pseudomallei* Using PCR-RFLP Technique

Sumalee Tungpradabkul¹, Pinnara Rojwiratana², Anchasa Kananurak² and Suda Tunpiboonsak¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rajdhevee, Bangkok 10400, ²Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rajdhevee, Bangkok 10400

The project aimed to differentiate *B. pseudomallei* having different lipopolysaccharide (LPS) structures based on the PCR-RFLP technique. Recently, it was reported that different LPS structures had been found in *B. pseudomallei*. In particular, the major LPS structures found in *B. pseudomallei* isolated from Thailand were ladder patterns, the so called typical pattern. In contrast, the major LPS structures of *B. pseudomallei* isolated from Australia were smear patterns, the so called atypical pattern. Our study focused on a gene, the WaaF gene, which is involved in LPS biosynthesis. A pair of specific primers was designed based on the WaaF gene sequence. Polymerase chain reaction followed by restriction endonuclease (PCR-RFLP) analysis was performed. At least three restriction enzymes, *EcoRI*, *PstI*, *NotI*, were used to differentiate the different LPS structures among 141 isolates from different sources such as patients, animals, and the environment from Thailand, Australia, Laos and Hongkong. The results showed different PCR-RFLP patterns that could be divided into 4 patterns. In addition the comparative LPS pattern of all 141 isolates were detected in three profiles. Phylogenetic trees constructed under PCR-RFLP and PCR-RFLP+LPS were compared. The results show relationships of these 141 isolates with 6 characters or branches. Interestingly, the bacteria from soil isolates have distinct characters that isolated them from the others. However, the number of bacteria from soil isolates was too small. Thus, we should investigate a greater number of samples. The results from this study were shown to be related with the distribution of *B. pseudomallei* found in this region. Moreover, the different PCR-RFLP patterns and the phylogenetic tree in this study still could not explain the differences in virulent properties of the bacteria that needs more analysis of the data.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, WaaF gene, PCR-RFLP, lipopolysaccharide (LPS) pattern

บทนำ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคนานที่เรียกว่า โรคเมดิออยโตสิส โดยในระยะแรกๆ พบว่าแหล่งของเชื้อนี้พบมากในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะภาคอีสานของประเทศไทย (Suputtamongkol et al., 1994) และภาคเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Inglis et al., 1998) แต่ต่อมาเริ่มมีรายงานการพบเชื้อดังกล่าวมากขึ้น ทั้งในประเทศฮ่องกงและจีน (Dance, 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาเพื่อป้องกันความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อดังกล่าวได้มีการศึกษา เช่น การใช้ ribotyping (Trakulsomboon et al., 1997), การใช้ RFLP-Micropattern และ RFLP-Macropattern จากการแยกด้วย Pulse field gel electrophoresis (Pitt et al., 2000; Vadivelu et al., 1997) สามารถแยกความหลากหลายของสายพันธุ์แต่ยังไม่สามารถใช้เป็น marker ในระดับวิวัฒนาการของเชื้อได้ อีกทั้งยังไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของการก่อโรคนานที่รุนแรง

เมื่อไม่นานมานี้ ศ. สกิต สิริสิงห และคณะ ได้ศึกษาแบบแผนของ lipopolysaccharide (LPS) ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ในประเทศไทย และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย โดยพบว่าแบบแผนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเป็น 2 ลักษณะ คือ ชนิดที่ให้แบบแผนเป็นขั้นบันได (ladder) หรือเรียกว่า typical pattern ซึ่งพบมากในสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย กับชนิดที่ไม่มีแบบแผนเป็นขั้น (smear) หรือเรียกว่า atypical pattern ซึ่งพบมากในสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลีย (Anuntagool et al., 2000) โดยที่ข้อมูลในการติดเชื้อและการก่อโรคมักจะพบความรุนแรงในกลุ่มประชากรไทยมากกว่าในกลุ่มประชากรออสเตรเลีย ซึ่งจะเห็นได้ว่าข้อมูลดังกล่าวนี้ น่าจะมีความสัมพันธ์ในชนิดของเชื้อที่มี LPS ที่แตกต่างต่อการกระจายหรือแหล่งที่พบ นอกจากนี้ LPS ยังเป็นหนึ่งใน virulent factor ที่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า LPS เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการก่อโรค แต่เนื่องจากแบบแผนของ LPS ที่ได้ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบหรือวิเคราะห์เพื่อการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ ในขณะที่ข้อมูลของยีนหรือความแตกต่างของยีนจะสามารถนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการวิวัฒนาการและสามารถวิเคราะห์การกระจายของแหล่งของเชื้อได้

โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะนำประโยชน์ทาง molecular marker ที่มีความชัดเจนหรือมีความสัมพันธ์กับการก่อโรค มาใช้หาความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญในเชิงวิวัฒนาการ การกระจายตัว และอาจนำไปสู่ความสัมพันธ์ของการก่อความรุนแรงของโรค โดย molecular marker ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้เลือก WaaF gene ซึ่งได้มีการศึกษาแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ lipopolysaccharide (LPS) ที่เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการก่อความรุนแรงของโรคเมดิออยโดสิส (Burntuck and Woods, 1999) ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการวิจัย ดังนี้

1. พัฒนาการใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีความแตกต่างของ lipopolysaccharide structure โดยใช้ WaaF เป็นยีนเป้าหมาย และการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ประมาณ 3 ชนิด ในการแยกความแตกต่าง
2. วิเคราะห์ผลของ PCR-RFLP และการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ในการสร้าง phylogenetic tree เพื่อการอธิบายในเชิงการวิวัฒนาการและการกระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* ในพื้นที่ต่างๆ

วิธีการ

1. แบคทีเรียตัวอย่างที่ทำการศึกษา เป็นแบคทีเรียชนิด *B. pseudomallei* ที่แยกจากผู้ป่วย และจากแหล่งดิน น้ำ ในถิ่นต่างๆ ที่มีการระบาดของโรคเมดิออยโดสิส โดยเก็บตัวอย่างในประเทศไทย ออสเตรเลีย ลาว และฮ่องกง โดยใช้จำนวนเชื้อมากกว่า 141 isolates โดยให้มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ที่เป็นชนิด typical LPS ต่อชนิด atypical LPS เป็น 50% ต่อ 50% แต่เนื่องจากเชื้อที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด typical LPS ดังนั้นหากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาไม่สามารถได้ตามสัดส่วนตามที่ระบุไว้อาจปรับเปลี่ยนให้มีความเป็นไปได้มากที่สุดคือ เป็นชนิด typical LPS : atypical LPS เป็น 70% : 30% ซึ่งจากการศึกษานี้ได้สัดส่วนเป็น 77% : 23% และทำการสืบหาข้อมูลสำหรับเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยว่ามีความรุนแรงมากน้อยเพียงใด มี ribotype แบบใด หรือ source of infection and arabinose assimilation รวมทั้งเปรียบเทียบแบบแผนของ LPS ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำมาวิเคราะห์ต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ นำแบคทีเรียตัวอย่างที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มขยายยีนเป้าหมายโดยวิธีพีซีอาร์ ขณะเดียวกันจะทำการพัฒนาการเพิ่มขยายยีนเป้าหมายโดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียโดยตรง เพื่อให้การศึกษาจำนวนแบคทีเรียได้ครั้งละหลายๆ

3. การพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยพีซีอาร์ ในการวิจัยนี้จะเลือกการใช้ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ LPS นั่นคือยีน WaaF โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะของยีน ทำการเพิ่มจำนวนยีนจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียในข้อ 2 และวิเคราะห์โดยวัฏจักรอิเล็กโตรโฟรีซิส

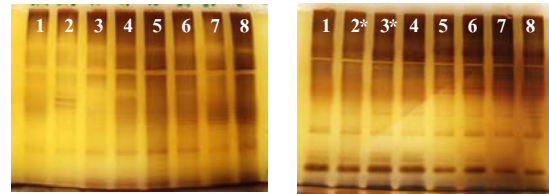
4. การหาแบบแผนของ PCR-RFLP เมื่อได้ผลผลิตของพีซีอาร์แล้ว จะนำมาทดสอบโดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างน้อย 3 เอนไซม์ เนื่องจากได้มีการทดสอบในเบื้องต้นแล้วว่ายีนเป้าหมาย WaaF มีลำดับเบสที่มี polymorphism ซึ่งสามารถติดตามด้วยเอนไซม์ อย่างน้อย 3 เอนไซม์ คือ *EcoRI*, *NotI* และ *PstI* การที่ยีนเป้าหมาย มีลำดับเบสที่มี polymorphism จึงทำให้สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการติดตามวิวัฒนาการและสร้าง phylogenetic tree ได้ นอกจากนี้อาจต้องใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นเพื่อระบุความแตกต่างได้ละเอียดขึ้น กรณีนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการทดลองต่อไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้าง Phylogenetic tree นำข้อมูลจากการทำ PCR-RFLP มาวิเคราะห์ และสร้างผังในการแยกสายพันธุ์การวิวัฒนาการโดยอาศัยคอมพิวเตอร์

ผลการวิจัย

1. แบคทีเรียตัวอย่างที่ทำการศึกษา ชื่อ *B. pseudomallei* ที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย (รหัส NF มาจาก NIH กระทรวงสาธารณสุข, รหัส Bp มาจาก ศ.สถิต สิริสิงห ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล) จำนวน 67 ตัวอย่าง รหัสที่เป็นตัวเลขจากผู้ป่วย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากแหล่งดินในประเทศไทย (รหัส E) จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากประเทศลาว (รหัส L) จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากประเทศฮ่องกง (รหัส HK) จำนวน 10 ตัวอย่าง (จาก Welcome Unit คณะเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) และตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย จำนวน 41 ตัวอย่าง (ยังไม่ระบุแหล่งของเชื้อ เป็นการทำให้ blind Test) รวมทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

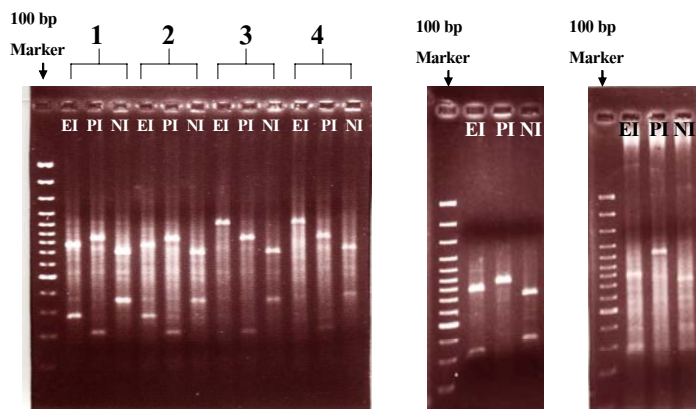
2. ผลการทดสอบ LPS และการศึกษา PCR-RFLP แบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 141 ตัวอย่างได้ถูกนำมาทดสอบแบบแผน LPS และการศึกษา PCR-RFLP โดยผลการเปรียบเทียบแบบแผน LPS และผลการศึกษา PCR-RFLP แสดงในภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



lane 1 Typical ladder
lane 2 Atypical ladder
lane 3 Smear pattern
lane 4-8 Typical ladder

lane 1 Typical ladder
lane 2,3 Typical ladder*
lane 4 Typical ladder
lane 5-8 Atypical ladder

ภาพที่ 1. แสดงแบบแผนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* จากแหล่งต่างๆ ที่ให้แบบแผนแตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ typical ladder, atypical ladder และ smear pattern



E I หมายถึง เชื้อ *B. pseudomallei* ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*
P I หมายถึง เชื้อ *B. pseudomallei* ตัดด้วยเอนไซม์ *PstI*
N I หมายถึง เชื้อ *B. pseudomallei* ตัดด้วยเอนไซม์ *NotI*

ภาพที่ 2. แสดงตัวอย่างแบบแผนที่ได้จากแบคทีเรียแหล่งต่างๆ ที่ให้ PCR-RFLP ที่แตกต่างกัน ทั้งที่ถูกตัดได้ด้วย *EcoRI* และไม่ถูกตัด, ทั้งที่ถูกตัดด้วย *NotI* และไม่ถูกตัด, ทั้งที่ถูกตัดด้วย *PstI* และไม่ถูกตัด และถูกตัดมากกว่า 1 ตำแหน่ง

ตารางที่ 1. สรุปจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา และการแสดงแบบแผนของ LPS และ PCR-RFLP

No.	Source	Code	Isolated type	LPS pattern			Restriction Enzyme		
				Typical	Atypical	Smear	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>NotI</i>
1	Outgroup								
2	THAI	BpNF10/38	Human	√			+	+	+
3	THAI	BpNF47/38	Human	√			+	+	+
4	THAI	BpNF105/37	Human	√			+	+	+
5	THAI	BpNF154/37	Human	√			+	+	+
6	THAI	E008	Environment	√			+	++	+
7	THAI	E025	Environment	√			+	++	+
8	THAI	E203	Environment	√			+	++	+
9	THAI	230a	Human	√			+	+	+
10	THAI	241a	Human	√			+	+	+
11	THAI	244a	Human	√			+	-	+
12	THAI	932a	Human	√			+	+	+
13	THAI	#1	Human	√			-	+	+
14	THAI	#2	Human		√		-	+	+
15	THAI	#3	Human		√		-	+	+
16	THAI	#4	Human		√		-	+	+
17	THAI	#5	Human		√		-	+	+
18	THAI	#6	Human		√		+	+	+
19	THAI	#7	Human		√		+	+	+
20	THAI	#8	Human		√		+	+	+
21	THAI	#9	Human		√		+	+	+
22	THAI	#10	Human	√			+	+	+
23	THAI	#11	Human	√			+	+	+
24	THAI	#12	Human		√		-	+	+
25	THAI	#13	Human			√	+	+	+
26	THAI	#14	Human			√	+	+	+
27	THAI	#15	Human			√	+	+	+
28	THAI	#16	Human		√		+	+	+
29	THAI	#17	Human		√		+	+	+
30	THAI	#18	Human	√			+	+	+
31	THAI	#19	Human			√	+	+	+
32	THAI	#20	Human		√		-	+	+
33	THAI	#21	Human		√		-	+	+
34	THAI	#22	Human	√			+	+	+
35	THAI	#23	Human		√		+	+	+
36	THAI	#24	Human		√		+	+	+
37	THAI	#25	Human		√		+	+	+
38	THAI	#26	Human		√		-	+	+
39	THAI	#27	Human			√	+	+	+
40	THAI	#28	Human			√	+	+	+
41	THAI	#29	Human	√			+	+	+
42	THAI	#30	Human	√			+	+	+
43	THAI	#31	Human	√			+	+	+
44	THAI	#32	Human	√			+	+	+
45	THAI	A	Human	√			+	+	+
46	THAI	B	Human	√			-	+	+
47	THAI	C	Human	√			+	+	+
48	THAI	D	Human	√			+	+	+
49	THAI	G	Human	√			+	+	+
50	THAI	I	Human	√			+	+	+
51	THAI	J	Human	√			+	+	+
52	THAI	P	Human	√			+	+	+
53	THAI	Q	Human	√			+	+	+
54	THAI	U	Human	√			+	+	+
55	THAI	R	Human	√			-	+	+
56	THAI	Y 1	Human	√			+	+	+
57	THAI	Z 2	Human	√			+	+	+

ตารางที่ 1. (ต่อ)

No.	Source	Code	Isolated type	LPS pattern			Restriction Enzyme		
				Typical	Atypical	Smear	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>NotI</i>
58	THAI	1889a	Human	√			+	+	+
59	THAI	1895a	Human	√			+	+	+
60	THAI	1909a	Human			√	+	+	+
61	THAI	1923a	Human	√			+	+	+
62	THAI	2037a	Human	√			+	+	+
63	THAI	2095a	Human	√			+	+	+
64	THAI	2096a	Human	√			+	+	+
65	THAI	2102a	Human	√			+	+	+
66	THAI	2104a	Human	√			+	+	+
67	THAI	2106a	Human			√	+	+	+
68	THAI	2110a	Human	√			+	+	+
69	THAI	2111a	Human	√			+	+	+
70	THAI	2112a	Human	√			+	+	+
71	THAI	2113a	Human	√			+	+	+
72	THAI	1960	Human	√			+	+	+
73	THAI	2115a	Human	√			+	+	+
74	THAI	2116a	Human	√			+	+	+
75	THAI	2120a	Human	√			+	+	+
76	THAI	2121a	Human	√			+	+	+
77	THAI	2123a	Human	√			+	+	+
78	THAI	2124a	Human	√			+	+	+
79	AUSTRALIA	1A BA	Human	√			+	+	+
80	AUSTRALIA	1B BA	Human	√			+	+	+
81	AUSTRALIA	2A BA	Animal	√			-	+	-
82	AUSTRALIA	2B BA	Animal	√			-	+	-
83	AUSTRALIA	3 BA	Animal	√			-	+	+
84	AUSTRALIA	4A BA	Animal	√			-	+	+
85	AUSTRALIA	4B BA	Animal	√			-	+	+
86	AUSTRALIA	6A BA	Soil	√			-	+	-
87	AUSTRALIA	6B BA	Soil	√			-	+	-
88	AUSTRALIA	7A BA	Soil		√		-	+	+
89	AUSTRALIA	7B BA	Soil		√		-	+	+
90	AUSTRALIA	8A BA	Animal	√			-	+	-
91	AUSTRALIA	8B BA	Animal	√			-	+	+
92	AUSTRALIA	9A BA	Human	√			-	+	+
93	AUSTRALIA	9B BA	Human	√			-	+	+
94	AUSTRALIA	10 BA	Human	√			-	+	+
95	AUSTRALIA	11 BA	Human	√			-	+	+
96	AUSTRALIA	12 BA	Human	√			-	+	+
97	AUSTRALIA	13 BA	Human	√			-	+	+
98	AUSTRALIA	14 BA	Soil	√			-	+	+
99	AUSTRALIA	16A BA	Human	√			-	+	-
100	AUSTRALIA	16B BA	Human	√			-	+	-
101	AUSTRALIA	17A BA	Human	√			-	+	+
102	AUSTRALIA	17B BA	Human	√			-	++	+
103	AUSTRALIA	18A BA	Human		√		-	++	+
104	AUSTRALIA	18B BA	Human		√		-	++	+
105	AUSTRALIA	19 BA	Animal	√			-	+	+
106	AUSTRALIA	20 BA	Human	√			-	+	+
107	AUSTRALIA	21 BA	Human	√			-	-	+
108	AUSTRALIA	22A BA	Human	√			-	+	+
109	AUSTRALIA	22B BA	Human	√			-	+	+
110	AUSTRALIA	23A BA	Human		√		-	+	+
111	AUSTRALIA	23B BA	Human		√		-	+	+
112	AUSTRALIA	24ABA	Human	√			-	+	+
113	AUSTRALIA	24B BA	Human	√			-	+	+
114	AUSTRALIA	25 BA	Animal	√			-	+	+

ตารางที่ 1. (ต่อ)

No.	Source	Code	Isolated type	LPS pattern			Restriction Enzyme		
				Typical	Atypical	Smear	EcoRI	PstI	NotI
115	AUSTRALIA	26 BA	Animal	√			-	+	+
116	AUSTRALIA	27 BA	Animal	√			-	+	+
117	AUSTRALIA	28 BA	Animal	√			-	+	+
118	AUSTRALIA	29 BA	Human	√			-	+	-
119	AUSTRALIA	30 BA	Animal	√			-	+	-
120	LAO	L03	Human	√			-	+	+
121	LAO	L04	Human	√			+	+	+
122	LAO	L05	Human	√			+	+	+
123	LAO	L06	Human	√			-	+	+
124	LAO	L07	Human	√			-	+	+
125	LAO	L08	Human	√			+	+	+
126	LAO	L09	Human	√			+	+	+
127	LAO	L10	Human	√			+	+	+
128	LAO	L13	Human	√			-	+	+
129	LAO	L18	Human	√			-	+	+
130	HONGKONG	HK1	Animal	√			+	+	+
131	HONGKONG	HK2	Animal	√			+	+	+
132	HONGKONG	HK3	Animal	√			+	+	+
133	HONGKONG	HK4	Aerosol	√			+	+	+
134	HONGKONG	HK5	Animal	√			+	+	+
135	HONGKONG	HK7	Animal	√			+	+	+
136	HONGKONG	HK8	Animal	√			+	+	+
137	HONGKONG	HK9	Animal	√			+	+	+
138	HONGKONG	HK10	Animal	√			+	+	+
139	HONGKONG	HK11	Animal	√			+	+	+
140	HONGKONG	108A	Soil	√			+	+	+
141	HONGKONG	108B	Soil	√			+	+	+

√ หมายถึง แบบแผน LPS ที่พบ

+ หมายถึง ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วย Restriction enzyme

++ หมายถึง ตัดได้มากกว่า 1 ตำแหน่งด้วย Restriction enzyme

- หมายถึง ตัดไม่ได้ ด้วย Restriction enzyme

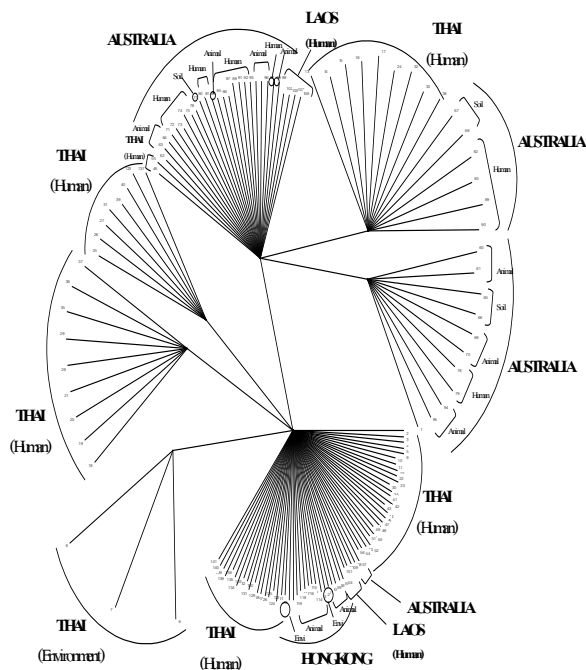
3. ผลการสร้าง Phylogenetic tree การวิเคราะห์ผลจากข้อมูล PCR-RFLP และ PCR-RFLP+LPS ได้ถูกนำมาหา phylogenetic tree ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

บทสรุป

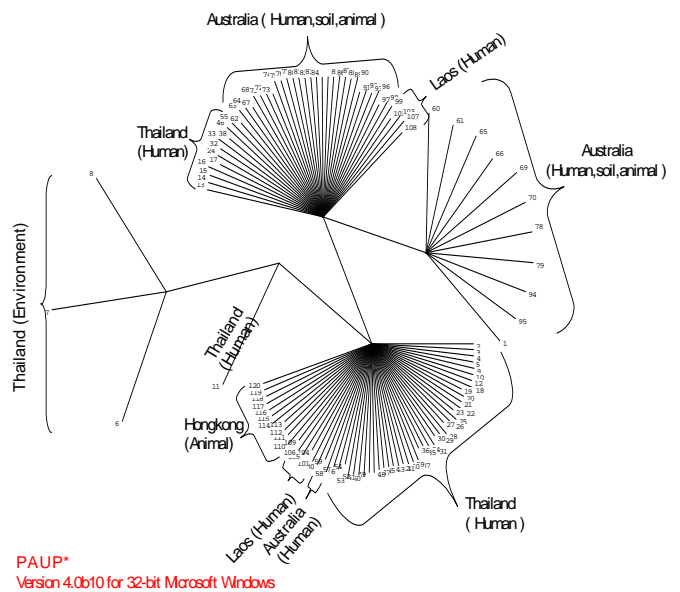
ในการวิเคราะห์แบบแผน LPS ของเชื้อที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 141 สายพันธุ์ ซึ่ง 80 ตัวอย่างมาจากประเทศไทย โดย 77 ตัวอย่างมาจากผู้ป่วย และ 3 ตัวอย่างมาจากแหล่งดิน ส่วนอีก 10 ตัวอย่างมาจากประเทศลาว 10 ตัวอย่างมาจากประเทศฮ่องกง ซึ่งส่วนมากได้จากการติดเชื้อของสัตว์ และอีก 41 ตัวอย่างมาจากประเทศออสเตรเลีย โดยพบแบบแผนที่เป็น typical เป็นส่วนใหญ่ 108/141 (%), พบแบบแผนที่เป็น atypical 24/141 (%), และแบบแผนที่เป็น smear 8/141 (%), ซึ่งเป็นไปตามการคาดหมายที่จะพบเชื้อที่มี LPS เป็นแบบ typical มากกว่า atypical โดยตั้งเป้าไว้ที่ 70 : 30 ซึ่งที่พบในการศึกษานี้เป็นสัดส่วน 77 : 23 และจากผลการศึกษาแบบแผน LPS พบว่าเชื้อที่มาจากออสเตรเลียส่วนใหญ่ให้ typical ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลแรกที่เชื่อว่าในออสเตรเลียเป็น atypical และพบแบบแผนที่เป็น smear เฉพาะผู้ป่วยในประเทศไทยเท่านั้น

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ WaaF โดยวิธี PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด สามารถแบ่งแบบแผนที่ได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีทั้งสิ้น 81/141 (57.4%)



ภาพที่ 3. Phylogenetic tree ที่สร้างจากการใช้แบบแผน PCR-RFLP



ภาพที่ 4. Phylogenetic tree ที่สร้างจากการใช้ข้อมูล LPS และ PCR-RFLP

2. กลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (*PstI* และ *NotI*) มีทั้งสิ้น 46/141 (32.6%)
3. กลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ด้วยเอนไซม์ 1 ชนิด (*PstI*) มีทั้งสิ้น 9/141 (6.3%)
4. กลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (*EcoRI* และ *NotI*) และตัดได้มากกว่า 1 ตำแหน่งด้วย *PstI* มีทั้งสิ้น 4/141 (3.7%)

ที่น่าสนใจคือ เชื้อที่ได้จากแหล่งดินในประเทศไทยทั้งหมด ให้แบบแผนในกลุ่มที่ 4 เท่านั้น ซึ่งต่างจากเชื้อที่อื่นๆ แม้จะมาจากแหล่งดิน นอกจากนั้นจุดที่น่าสนใจอีกกรณี คือ เชื้อที่ได้จากประเทศออสเตรเลียทั้งหมดจะมีแบบแผนในกลุ่มที่ 2 และ 3 หรือกล่าวอย่างชัดเจนคือไม่สามารถตัดได้ด้วย *EcoRI* และจะพบในเชื้อที่มาจากประเทศลาวบ้าง

จากผลการศึกษาแบบแผน PCR-RFLP นี้พบการเกิดลักษณะจำเพาะที่มีนัยสำคัญ และเมื่อทำการสร้าง phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์จะทำให้มองเห็นภาพที่ชัดเจนขึ้น โดยการใช้ข้อมูล PCR-RFLP อย่างเดียวสามารถแบ่งได้เป็น 7 แขนง โดยมีกลุ่มที่เป็นแขนงใหญ่ๆ 2 แขนง คือ แบบแผนที่ 1 และ 2 ที่มีความสัมพันธ์กัน จากนั้นในกลุ่มที่ 1 จะแตกแขนงออกไปเป็น 3 กลุ่มย่อย ที่ชัดเจนคือสายของเชื้อในประเทศไทย ซึ่งมีเชื้อจากแหล่งดินที่แยกออกมาอย่างชัดเจน สำหรับกลุ่มใหญ่ที่ 2 ก็มีแขนงย่อยอีก 2 แขนง โดยส่วนใหญ่ของแขนงย่อยทั้ง 2 นี้เป็นเชื้อจากออสเตรเลียและลาว มีเชื้อจากผู้ป่วยของไทยที่พบในกลุ่มนี้บ้าง สำหรับเชื้อที่มาจากฮ่องกงทั้ง 10 ตัวอย่าง ทั้งจากแหล่งดิน สัตว์ หรือคน จะพบการกระจายตัวเป็นแบบแผนกลุ่มเดียวกับกลุ่มใหญ่แบบที่ 1 ผลที่เห็นจากการสร้าง phylogenetic tree นี้ ทำให้สามารถคาดเดาว่า เชื้อที่เกิดในประเทศฮ่องกงน่าจะมาจากประเทศไทย ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าการเกิดระบาดของเชื้อจะเกิดหลังการเกิดพายุไต้ฝุ่น ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการกระจายจากส่วนแผ่นดิน (ทวีป) ไปสู่เกาะฮ่องกง ส่วนเชื้อที่มาจากออสเตรเลียจะมีความจำเพาะมาก โดยเฉพาะการที่ไม่สามารถตัดได้ด้วย *EcoRI* ซึ่งแบบแผนของเชื้อไม่ว่าจะมาจากแหล่งดิน สัตว์ หรือคน ก็จะมีลักษณะคล้ายกันมาก เช่นนี้อาจคาดเดาได้ว่าเชื้ออยู่ในทวีปที่แยกตัว การเปลี่ยนแปลงจึงเกิดได้น้อยกว่า

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้สร้าง phylogenetic tree ที่อาศัยข้อมูลจากทั้ง PCR-RFLP ร่วมกับ LPS เพื่อให้ข้อมูล phylogenetic tree มีค่ามากขึ้น เพื่อเปรียบเทียบแนวโน้มในการหาความสัมพันธ์ทั้งระดับ genotype และ phenotype ประกอบกัน ผลที่ได้กลับพบว่ากลุ่มความสัมพันธ์ลดลงเป็น 4 กลุ่ม แต่ให้ความชัดเจนกว่าในกรณีข้างต้น กล่าวคือ จะมีกลุ่มพื้นฐานใหญ่ 2 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 ที่เป็นจำนวนมากที่สุดที่พบเชื้อจากไทย ลาว ฮองกง และออสเตรเลีย และกลุ่มนี้แตกแขนงโดยมีเชื้อจากแหล่งดินในไทยแยกออกมาชัดเจน ส่วนในกลุ่มที่ 2 พบลักษณะเชื้อจากไทย ลาว และออสเตรเลีย และมีการแตกแขนงสายของเชื้อจากออสเตรเลียอย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ผลก็จะให้แนวโน้มเช่นเดียวกับข้างต้น

อย่างไรก็ตาม การศึกษาในโครงการนี้สามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์คาดการณ์การกระจายของเชื้อจากแหล่งต่างๆ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ต่อความเข้าใจในการจัดการโดยเฉพาะการระบาดของเชื้อ เช่น กรณีฮองกงเป็นต้นซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงแหล่งของเชื้อในการแพร่กระจาย อีกทั้งในส่วนของเชื้อจากแหล่งดินในประเทศไทยมีข้อที่น่าสนใจที่ลักษณะแยกออกจากเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาน้อยเกินไป คณะผู้วิจัยคาดว่าจะศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_247001

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สถิตย์ สิริสิงห และคุณนริศรา จันทราทิพย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำการศึกษา LPS pattern และการให้เชื้อหลักจากประเทศออสเตรเลีย ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวรรณภาพ วุฒิเอกอนันต์ จาก Welcome Unit ที่กรุณาให้เชื้อจากผู้ป่วยในประเทศ และเป็นผู้ประสานการให้เชื้อจากประเทศลาวและฮองกง โดยขอขอบคุณ Director Suzanne Gendron, Division of Zoological Operation and Education, Ocean Park Corporation, Hongkong ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เชื้อที่ได้จากฮองกง นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ คุณสุดา ตันพิบูลย์ศักดิ์ ที่ให้คำแนะนำการทำ PCR-RFLP และคุณอุบล ตั้งวานิช และคุณอัญชลี ฐานวิสัย ที่แนะนำการใช้โปรแกรม Phylogenetic tree

เอกสารอ้างอิง

- Anuntagool, N., P. Aramsri, T. Panichakul, V. Wuthiekanun, R. Kinoshita, N.J. White and S. Sirisinha. 2000. Antigenic heterogeneity of lipopolysaccharide among *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health* 31: 146-152.
- Burntack, M.N. and D.E. Woods. 1999. Isolation of polymyxin B-susceptible mutants of *Burkholderia pseudomallei* and molecular characterization of genetic loci involved in polymyxin B resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2648-2656.
- Dance, D.A.B. 2000. Melioidosis as an emerging global problem. *Acta Tropica* 74: 115-119.
- Inglis, T.J.J., S.C. Garrow, C. Adams, M. Henderson and M. Mayo. 1998. Dry season outbreak of melioidosis in Western Australia. *Lancet* 352: 1600.
- Pitt, T.L., S. Trakulsomboon and D.A.B. Dance. 2000. Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Tropica* 74: 181-185.
- Suputtamongkol, Y., A.J. Hall, D.A. Dance, W. Chaowagul, A. Rajchanuvong, M.D. Smith and N.J. White. 1994. The epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, northeast Thailand. *Int. J. Epidemiol.* 23: 1082-1090.
- Trakulsomboon, S., D.A.B. Dance, M.D. Smith, N.J. White and T.L. Pitt. 1997. Ribotype differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Med. Microbiol.* 46: 565-570.
- Vadivelu, J., S.D. Puthuchery, A. Mifsud, B.S. Drasar, D.A.B. Dance and T.L. Pitt. 1997. Ribotyping and DNA macrorestriction analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from cases of melioidosis in Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91: 358-360.