BIODIVERSITY RESEARCH AND TRAINING PROGRAM

(PHASE II)

# รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

# การศึกษาหาความแตกต่างและการวิวัฒนาการของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ชนิดที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่แตกกัน โดยใช้วิธี พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

# Differentiation and evolutionary study based on lipopolysaccharide (LPS) structure of *Burkholderia pseudomallei* using PCR-RFLP technique.

โดย

รศ. ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

31 มกราคม 2548

BIODIVERSITY RESEARCH AND TRAINING PROGRAM
(PHASE II)

# รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

# การศึกษาหาความแตกต่างและการวิวัฒนาการของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ชนิดที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่แตกกัน โดยใช้วิธี พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

**Differentiation and evolutionary study based on lipopolysaccharide (LPS) structure of *Burkholderia pseudomallei* using PCR-RFLP technique.**

โดย

รศ. ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

31 มกราคม 2548

รหัสโครงการ BRT R_247001

# รายงานฉบับสมบูรณ์

## โครงการ

## การศึกษาหาความแตกต่างและการวิวัฒนาการของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ชนิดที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่แตกกัน โดยใช้วิธี พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

**Differentiation and evolutionary study based on lipopolysaccharide (LPS) structure of *Burkholderia pseudomallei* using PCR-RFLP technique.**

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. สุมาลี ตั้งประดับกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นางสาวพินน์นรา โรจน์วิรัตน์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. นางสาวอัญชสา คณานุรักษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_247001

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สถิตย์ สิริสิงห และ คุณ นริศรา จันทราทิตย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำการศึกษา LPS pattern และ การให้เชื้อหลักจากประเทศออสเตรเลีย ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวรรณาพร วุฒิเอกอนันต์ จาก Welcome Unit ที่กรุณาให้เชื้อจากผู้ป่วยในประเทศ และเป็นผู้ประสานการให้เชื้อจากประเทศลาว และฮ่องกง โดยขอขอบคุณ Director Suzanne Gendron, Division of Zoological Operation and Education, Ocean Park Corporation, Hongkong ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เชื้อที่ได้จากฮ่องกง นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ คุณสุดา ตันพิบูลย์ศักดิ์ ที่ให้คำแนะนำการทำ PCR-RFLP และคุณคุบล ตังควานิช และคุณอัญชลี ฐานวิสัย ที่แนะนำการใช้โปรแกรม Phylogenetic tree

# บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี เพื่อการแยกความแตกต่างของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (แอลพีเอส)ที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีรายงานการศึกษาโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* จากแหล่งต่างๆทั้งในประเทศไทยเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งพบว่าเชื้อที่แยกได้จากประเทศไทยส่วนมากจะมีโครงสร้างของแอลพีเอส เป็นชนิดที่เป็นขั้นบันได เรียกว่า Typical ส่วนเชื้อทีแยกได้ในประเทศออสเตรเลียส่วนใหญ่จะให้โครงสร้างของแอลพีเอส เป็นชนิดไม่มีขั้นบันได เรียกว่าเป็น Atypical จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เกิดข้อสมมุติฐานว่ายีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอลพีเอสน่าจะมีความแตกต่าง รวมทั้งความแตกต่างที่พบนี้น่าจะนำไปสู่ความเข้าใจในเรื่องของการวิวัฒนาการของการกระจายของเชื้อดังกล่าวได้

การวิจัยนี้จึงได้นำข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอลพีเอส คือ WaaF gene ที่ได้มีศึกษาว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในขบวนการสังเคราะห์แอลพีเอส โดยนำมาเป็นยีนเป้าหมายเพื่อศึกษาความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ วิธีการหนึ่งที่มีความไวสูงและจำเพาะในการศึกษาคือ การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยศึกษาหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะสามารถแยกความต่างได้อย่างน้อย 3 เอนไซม์ คือ *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I จากการศึกษาเชื้อตัวอย่างในแหล่งต่างๆทั้งที่ได้จากผู้ป่วย สัตว์และแหล่งดินในประเทศไทย ออสเตรเลีย ลาว และฮ่องกง จำนวน 141 ตัวอย่าง พบแบบแผนของ พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ (1) แบบแผนของพีซีอาร์ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอ็นไซม์ทั้ง 3 เอ็นไซม์ (2) แบบแผนของพีซีอาร์ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอ็นไซม์ 2 เอ็นไซม์ คือ*Pst*I, *Not*I (3) แบบแผนของพีซีอาร์ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอ็นไซม์ 1 เอ็นไซม์ คือ*Pst*I และ (4) แบบแผนของพีซีอาร์ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอ็นไซม์ 2 เอ็นไซม์ คือ *Eco*RI, *Not*I และตัดได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง คือ *Pst*I, เมื่อเปรียบเทียบกับแบบแผนของ LPS ซึ่งมี 3 แบบ คือ (1) แบบขั้นบันได Typical (2) แบบไม่เป็นขั้นบันได (Atypical) และ (3) แบบไม่มีแบบ (Smear) หลังจากนำข้อมูลแบบแผนพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี มาวิเคราะห์สร้าง Phylogenic tree เปรียบเทียบกับการสร้าง Phylogenic tree ที่นำข้อมูลจากพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีรวมกับ LPS สามารถหาความสัมพันธ์ในการกระจายของเชื้อเป็น 6 แบบ ที่น่าสนใจคือ เชื้อที่มาจากแหล่งดินจะมีแบบแผนที่แตกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากมีจำนวนน้อยจึงน่าจะทำเพิ่ม ส่วนการหาความสัมพันธ์กับการก่อความรุนแรงของการก่อโรคยังไม่ได้วิเคราะห์ซึ่งจะเพิ่มเติมในภายหลัง

**Abstract**

The project is aim to differentiate *B. pseudomallei* having different lipopolysaccharide (LPS) structure based on PCR-RFLP technique. Recently, it has been reported the different LPS structure found in *B. pseudomallei*. Particularly, the major LPS structures found in *B. pseudomallei* isolated from Thailand are ladder patterns, so called typical pattern. In contrast, the major LPS structures of *B. pseudomallei* isolated from Australia are smear patterns, so called atypical pattern. We therefore hypothesize that gene(s) involved in the LPS biosynthesis might be difference and might be related with evolutionary or distribution of the bacteria.

Our study is focused on a gene, WaaF gene, which 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, *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I, were used to differentiate the different LPS structure among 141 isolates from different sources such as patient, animals, environment from Thailand, Australia Lao and Hongkong. The results show the different PCR-RFLP pattern dividing into 4 patterns. (1) PCR products were digested at single size with 3 restriction enzymes, *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I. (2) PCR products were digested at single size with 2 enzymes, *Pst*I, *Not*I. (3) PCR products were digested at single size with 1 enzyme, *Pst*I. (4) PCR were digested at single size with 2 enzymes *Eco*RI, *Not*I, and were digested at multiple sizes with *Pst*I. In addition the comparative LPS pattern of all 141 isolates were detected in three profiles that are (1) ladder pattern or typical (2) non-ladder or atypical and (3) smear pattern. Construction of phylogenic trees under PCR-RFLP and PCR-RFLP+LPS were compared. The results show relationship of these 141 isolates with 6 characters or branches. Interestingly, the bacteria from soil isolates have distinct character that isolated from the other. However, the number of bacteria from soil isolate is too small. Thus we should investigate more number of samples.The results from this study show to be related with distribution of *B. pseudomallei* found in this region. Moreover, the different PCR-RFLP patterns and the phylogenic tree in this study still could not explaine to the differences in virulent property of the bacteria that needs more analysis of the data.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| ปก | i |
| กิตติกรรมประกาศ | ii |
| บทคัดย่อ | iii |
| สารบัญ | v |
| สารบัญตาราง | vi |
| สารบัญภาพ | vii |
| บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 2 |
| ระเบียบการวิจัย | 3 |
| ผลการวิจัย | 4 |
| สรุปและวิจารณ์การวิจัย | 14 |
| เอกสารอ้างอิง | 16 |
| ภาคผนวก | 17 |
| รายงานการเงิน | 18 |

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สรุปจำนวนเชื้อและการแสดงผลแบบแผนของ LPS และ PCR-RFLP 9

# สารบัญภาพ


| | หน้า |
|---|---|
| รูปที่ 1 แสดงแบบแผนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อจากแหล่งต่างๆ | 4 |
| รูปที่ 2 แสดงแบบแผนของดีเอ็นเอที่สกัดก่อนเพื่อใช้เป็นยีนเป้าหมาย (ก) | 5 |
| แสดงแบบแผนพีซีอาร์จากยีนเป้าหมายในรูปที่ 2 ก (ข) | 5 |
| รูปที่ 3 แสดงแบบแผนพีซีอาร์จากยีนเป้าหมายที่ได้จากแบคทีเรียโดยตรง | 6 |
| รูปที่ 4 แสดงแบบแผนผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด | 7 |
| รูปที่ 5 แสดงตัวอย่างแบบแผนที่ได้จากแบคทีเรียแหล่งต่างๆที่ให้ PCR-RFLP ที่ต่างกัน | 8 |
| รูปที่ 6ก แสดง Phylogenetic tree ที่สร้างจากการใช้แบบแผน PCR-RFLP | 12 |
| รูปที่ 6ข แสดง Phylogenetic tree ที่สร้างจากการใช้แบบแผน PCR-RFLP และ LPS | 13 |

## บทนำ

เนื่องจากเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนที่เรียกว่า โรคเมลิออยโดสิส โดยในระยะแรกๆพบว่า แหล่งของเชื้อนี้พบมากในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะภาคอีสานของประเทศไทย และภาคเหนือของประเทศออสเตรเลีย แต่ต่อมาเริ่มมีรายงานการพบเชื้อดังกล่าวมากขึ้น ทั้งในประเทศฮ่องกง จีน เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาเพื่อบ่งชี้ความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวได้มีการศึกษา เช่น การศึกษาการใช้ ribotyping, การใช้ RFLP-Micropattern และ RFLP-Macropattern จากการแยกด้วย Pulse field gel electrophoresis สามารถแยกความหลากหลายของสายพันธุ์ แต่ยังไม่สามารถใช้เป็น marker ในระดับการวิวัฒนาการของเชื้อได้ อีกทั้งยังไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของการก่อโรคที่รุนแรง

เมื่อไม่นานมานี้ สิริสิงห, ส. และคณะได้ศึกษาการดูแบบแผนของ Lipopolysaccharide (LPS) ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ในแหล่งต่างๆในประเทศไทย และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ในแหล่งต่างๆจากประเทศออสเตรเลีย โดยพบว่าแบบแผนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเป็น 2 ลักษณะ คือ ชนิดที่ให้แบบแผนเป็นขั้นบันได (ladder) หรือเรียกว่า Typical pattern ซึ่งพบมากในสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย กับชนิดที่ไม่มีแบบแผนเป็นขั้น (smear) หรือเรียกว่า Atypical pattern ซึ่งพบมากในสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลีย โดยที่ข้อมูลในการติดเชื้อและการก่อโรคมักจะพบความรุนแรงในกลุ่มประชากรไทย มากกว่าในกลุ่มประชากรออสเตรเลีย ซึ่งจะเห็นได้ว่าข้อมูลดังกล่าวนี้ น่าจะมีความสัมพันธ์ในชนิดของเชื้อที่มี LPS ที่แตกต่างต่อการกระจายหรือแหล่งที่พบ นอกจากนี้ LPS ยังเป็นหนึ่งใน Virulent factor ที่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า LPS เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการก่อโรค แต่เนื่องจากแบบแผนของ LPS ที่ได้ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบหรือวิเคราะห์เพื่อการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้ ในขณะที่ข้อมูลของยีนหรือความแตกต่างของยีนจะสามารถนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการวิวัฒนาการ และสามารถวิเคราะห์การกระจายของแหล่งของเชื้อได้

โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะนำประโยชน์ทาง molecular marker ที่มีความชัดเจนหรือมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคมาใช้ เพื่อหาความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญในเชิงวิวัฒนาการ การกระจายตัวและอาจนำไปสู่ความสัมพันธ์ของการก่อความรุนแรงของโรค Molecular marker ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้เลือก WaaF gene ซึ่งได้มีการศึกษาแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Lipopolysaccharide (LPS) ที่เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการก่อความรุนแรงของโรคเมลิออยโดสิส ดังนั้นถ้าการพัฒนาวิธีการ PCR-RFLP ของยีนดังกล่าวโดยศึกษาหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะสามารถแยกความต่างได้อย่างน้อย 3 เอนไซม์ คือ *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I และให้แบบแผนที่สามารถแยกความแตกต่างได้ก็น่าจะสามารถเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในการ

วิวัฒนาการ การกระจายของเชื้อ รวมทั้งน่าจะมีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงของการก่อโรค ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อความเข้าใจการระบาดและการควบคุมการระบาดของโรค

ด้วยเหตุนี้การเลือกศึกษาในโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ในด้านความเข้าใจการระบาดและการควบคุมการระบาดของเชื้อก่อโรคนี้ ยังสามารถเข้าใจแหล่งการกระจายหรือระบาด รวมทั้งการวิวัฒนาการของเชื้อ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคาดการณ์ของการวิวัฒนาการการระบาดของเชื้อดังกล่าวได้ โดยที่ความรู้ทางการวิวัฒนาการของเชื้อเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในด้านองค์ความรู้ต่อการจัดการความหลากหลายของเชื้อในด้านการสาธารณสุขและการแพทย์

## วัตถุประสงค์โครงการ

1. การพัฒนาการใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีความแตกต่างของ Lipopolysaccharide structure โดยใช้ WaaF เป็นยีนเป้าหมาย และการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ประมาณ 3 ชนิด ในการแยกความแตกต่าง
2. วิเคราะห์ผลของ PCR-RFLP และการใช้การวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ในการสร้าง Phylogenetic Tree เพื่อการอธิบายในเชิงการวิวัฒนาการและการกระจายของเชื้อ *B. pseudomallei* ในพื้นที่ต่างๆ

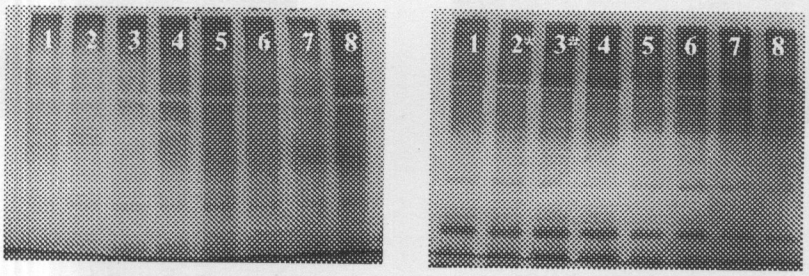
## ระเบียบการวิจัย

1. ***แบคทีเรียตัวอย่างที่ทำการศึกษา*** เป็นแบคทีเรียชนิด *B. pseudomallei* ที่แยกจากผู้ป่วย และจากแหล่งดิน น้ำ ในถิ่นต่างๆ ที่มีการระบาดของโรคเมลิออยโดสิส โดยการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่จะมาจากถิ่นในประเทศไทย ประเทศออสเตรเลีย ประเทศเวียตนาม ประเทศฮ่องกง เป็นต้น โดยจะใช้จำนวนเชื้อมากกว่า 200 isolates โดยให้มีสัดส่วนของเชื้อที่ใช้ที่เป็นชนิด typical LPS ต่อ ชนิด atypical LPS เป็น 50% ต่อ 50% แต่เนื่องจากเชื้อที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด typical LPS ดังนั้นหากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาไม่สามารถได้ตามสัดส่วนตามที่ระบุไว้อาจปรับเปลี่ยนให้มีความเป็นไปได้มากที่สุดคือ เป็นชนิด typical LPS : atypical LPS เป็น 70% : 30% และทำการสืบหาข้อมูลสำหรับเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยว่ามีความรุนแรงมากน้อยเพียงใด มี ribotype แบบใด หรือ source of infection and arbinose assimilation รวมทั้งเปรียบเทียบแบบแผนของ LPS ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะได้รับมาวิเคราะห์ต่อไป
2. ***การสกัดดีเอ็นเอ*** นำแบคทีเรียตัวอย่างที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มขยายยีนเป้าหมายโดยวิธีพีซีอาร์ ขณะเดียวกันจะทำการพัฒนาการเพิ่มขยายยีนเป้าหมายโดยการใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียโดยตรง เพื่อให้การศึกษาจำนวนแบคทีเรียได้ครั้งละมากๆ
3. ***การพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยพีซีอาร์*** โดยในการวิจัยนี้จะเลือกการใช้ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ LPS นั่นคือยีน WaaF โดยจะออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะของยีน ทำการเพิ่มจำนวนยีนจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียในข้อ 4.2 และวิเคราะห์โดยวุ้นอิเลคโตรโซรีสิส
4. ***การหาแบบแผนของ PCR-RFLP*** เมื่อได้ผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้ จะนำมาทดสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างน้อย 3 เอนไซม์ เนื่องจากได้มีการทดสอบในเบื้องต้นแล้วว่ายีนเป้าหมาย WaaF มีลำดับเบสที่มี polymorphism ซึ่งสามารถติดตามด้วยเอนไซม์ อย่างน้อย 3 เอนไซม์ คือ EcoRI NotI และ PstI การที่ยีนเป้าหมายมีลำดับเบสที่มี polymorphism จึงทำให้สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการติดตามวิวัฒนาการ และสร้าง Phylogenetic tree ได้ นอกจากนี้อาจต้องใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นเพื่อระบุความแตกต่างได้ระเอียดขึ้น กรณีนี้ขึ้นกับความเหมาะสมของการทดลองต่อไป
5. ***การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้าง Phylogenetic tree*** นำข้อมูลจากการทำ PCR-RFLP มาวิเคราะห์และสร้างผังในการแยกสายพันธุ์ การวิวัฒนาการ โดยอาศัย คอมพิวเตอร์

## ผลการวิจัย

1. ***แบคทีเรียตัวอย่างที่ทำการศึกษา*** ในรายงานนี้แบคทีเรียเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ใช้มาจากผู้ป่วยในประเทศไทย (รหัส NF มาจาก NIH กระทรวงสาธารณสุข, รหัส Bp มาจาก ศ.สถิต สิริสิงห ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล) จำนวน 67 ตัวอย่าง รหัสที่เป็นตัวเลขจากผู้ป่วย 10 ตัวอย่าง และเชื้อจากแหล่งดินในประเทศไทย เป็นรหัส Eจำนวน 3 ตัวอย่าง และจากประเทศลาว เป็นรหัส L จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งจากประเทศฮ่องกง เป็นรหัส HKจำนวน 10 ตัวอย่าง (จาก Welcome Unit คณะเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) และเชื้อจากประเทศออสเตรเลีย 41 ตัวอย่าง (ซึ่งยังไม่ระบุแหล่งของเชื้อ เป็นการทำ Blind Test) รวมทั้งสิ้น 141 ตัวอย่างซึ่งแสดงในตารางที่ 1

2. ***ผลการทดสอบ LPS*** แบคทีเรียตัวอย่างทั้ง 141 ตัวอย่างได้ถูกนำมาทดสอบแบบแผน LPS ซึ่งจะได้ระบุไว้ในตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบแบบแผน LPS ดังแสดงในรูปที่ 1

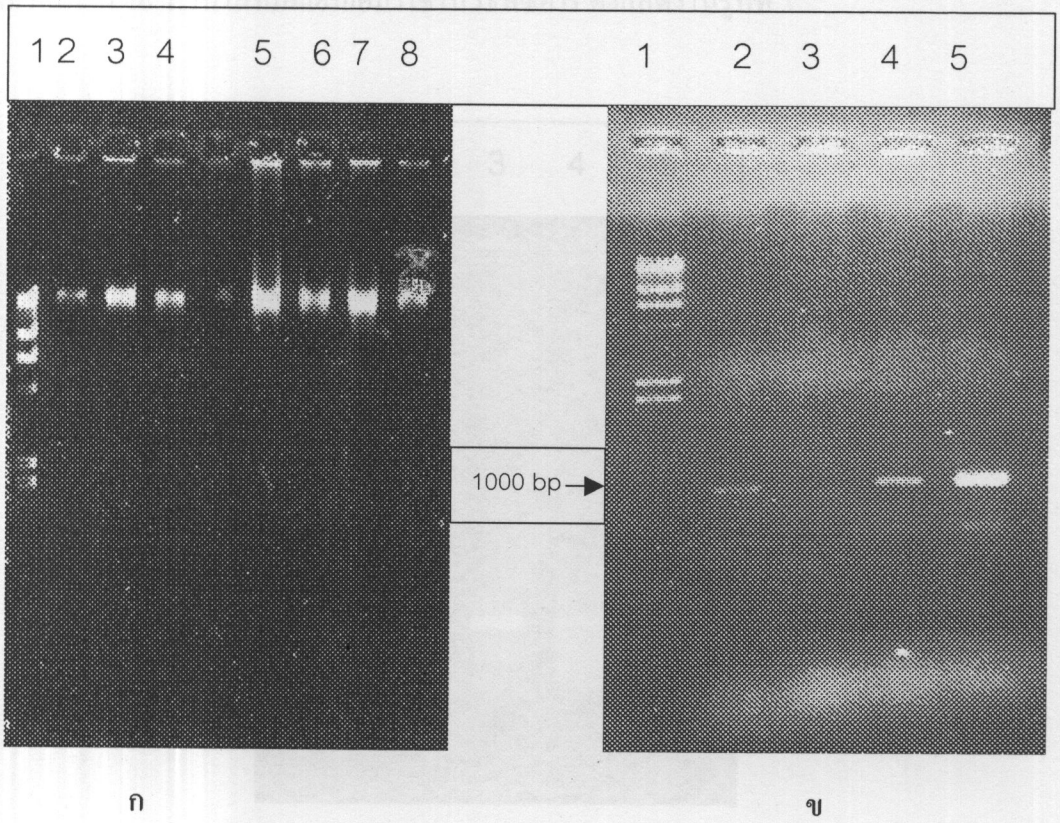



**lane 1 Typical ladder**
**lane 2 Atypical ladder**
**lane 3 Smear pattern**
**lane 4-8 Typical ladder**

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

***<u>รูปที่ 1</u>*** แสดงแบบแผนของ LPS ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* จากแหล่งต่างๆที่ให้แบบแผนแตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ Typical ladder, Atypical ladder และ Smear pattern

3. ***การสกัดดีเอ็นเอ*** นำแบคทีเรียตัวอย่างที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มขยายยีนเป้าหมายโดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งแสดงในรูปที่ 2

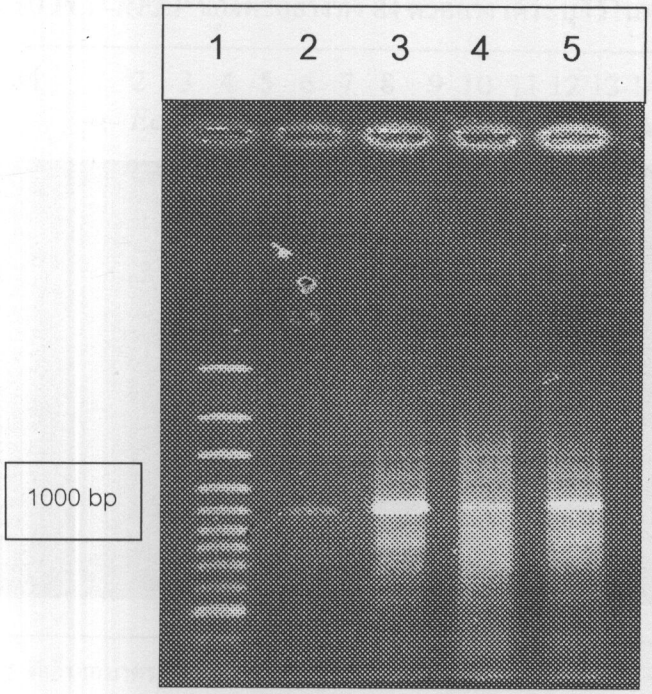



***รูปที่ 2*** ก. แสดงแบบแผนของดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย ก่อนนำมาเป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในการทำพีซีอาร์
ข. แสดงแบบแผนของผลผลิตพีซีอาร์จากยีนเป้าหมาย WaaF โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก ก.

ก. แถวที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII ($\lambda$ HindIII)
แถวที่ 2, 3, 4 เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย NF10/38 ที่ใช้ความเข้มข้นต่างกัน
แถวที่ 5, 6, 7, 8 เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรีย NF47/38 ที่ใช้ความเข้มข้นต่างกัน

ข. แถวที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII ($\lambda$ HindIII)
แถวที่ 2 และ 3 เป็นผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ดีเอ็นเอจาก NF10/38 เป็นแม่แบบ โดยใช้ปริมาณแตกต่างกัน
แถวที่ 4 และ 5 เป็นผลผลิตพีซีอาร์ที่ใช้ดีเอ็นเอจาก NF10/38 เป็นแม่แบบ โดยใช้ปริมาณแตกต่างกัน

4. ***การพัฒนาการใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียโดยตรง*** ได้มีการพัฒนาการใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายจากเซลล์โดยตรง โดยการนำแบคทีเรียที่เติบโตในอาหารเลี้ยงที่มีขนาดโคโลนีพอเหมาะมาแตกกระจายในน้ำกลั่น 500 µl จากนั้นนำไปต้มที่ 100 องศา 10 นาที ปั่นแยกเซลล์ที่ตกตะกอน นำเอาส่วนใสที่มีดีเอ็นเอมาใช้ในวิธีพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 3




*<u>รูปที่ 3</u>* แสดงแบบแผนของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้แบคทีเรียโดยตรง โดยไม่ต้องสกัดก่อน

แถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

แถวที่ 2, 3, 4 และ 5 ผลผลิตพีซีอาร์ ที่ใช้แบคทีเรียปริมาณต่างกัน

5. ***การพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายโดยพีซีอาร์*** โดยในการวิจัยนี้จะเลือกการใช้ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ LPS นั่นคือยีน WaaF โดยจะออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะคือของยีนโดยพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมดังนี้

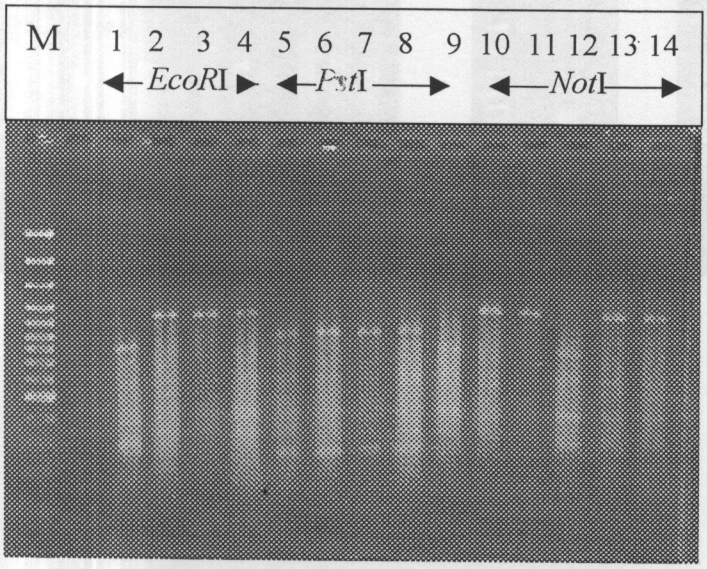
**FwaaF 5' AAC GAC CTG ATG CGT CGC G 3'**

**RwaaF 5' ACA TCA GCG CTG TCC GAC G 3'**

**ทำการเพิ่มจำนวนยีนจากดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3**

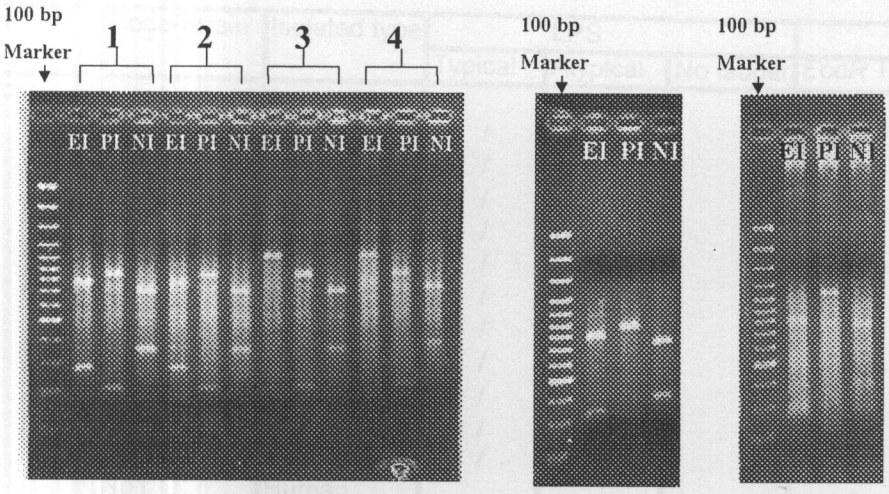
6. ***การหาแบบแผนของ PCR-RFLP*** เมื่อได้ผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้ ถูกนำมาทดสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างน้อย 3 เอนไซม์ เนื่องจากได้มีการทดสอบในเบื้องต้นแล้วว่ายีนเป้าหมาย WaaF มีลำดับเบสที่มี polymorphism ซึ่งสามารถติดตามด้วยเอนไซม์ อย่างน้อย 3 เอนไซม์ คือ EcoRI NotI และ PstI แบบแผนที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ดังแสดงไว้เป็นตัวอย่างในรูปที่ 4 และ 5

7. ***ผลการศึกษา PCR-RFLP*** ของตัวอย่างทั้ง 84 ตัวอย่างได้ระบุไว้ในตารางที่ 1




แถวที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder
แถวที่ 1, 2, 3, 4 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตัดด้วย EcoRI, โดยแถวที่ 1 ตัดได้ 1 ที่ ส่วน 2, 3, 4 ตัดไม่ได้
แถวที่ 5, 6, 7, 8, 9 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตัดด้วย PstI โดยแถวที่ 5,6,7,8 ตัดได้ 1 ที่ ส่วน 9 ตัดได้หลายที่
แถวที่ 10,11,12,13,14 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตัดด้วย NotI โดยแถวที่ 12 ตัดได้ 1 ที่ ส่วน 10,11,13,14 ตัดไม่ได้

***<u>รูปที่ 4</u>*** แสดงแบบแผนของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด




E I หมายถึง เชื้อ *B.pseudomallei* ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I

P I หมายถึง เชื้อ *B.pseudomallei* ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst* I

N I หมายถึง เชื้อ *B.pseudomallei* ตัดด้วยเอนไซม์ *Not* I

***รูปที่ 5*** แสดงตัวอย่างแบบแผนที่ได้จากแบคทีเรียแหล่งต่างๆที่ให้ PCR-RFLP ที่แตกต่างกัน ทั้งที่ถูกตัดได้ด้วย EcoRI และไม่ถูกตัด, ทั้งที่ถูกตัดด้วย NotI และไม่ถูกตัด, ทั้งที่ถูกตัดด้วย PstI และไม่ถูกตัด และถูกตัดมากกว่า 1 ตำแหน่ง

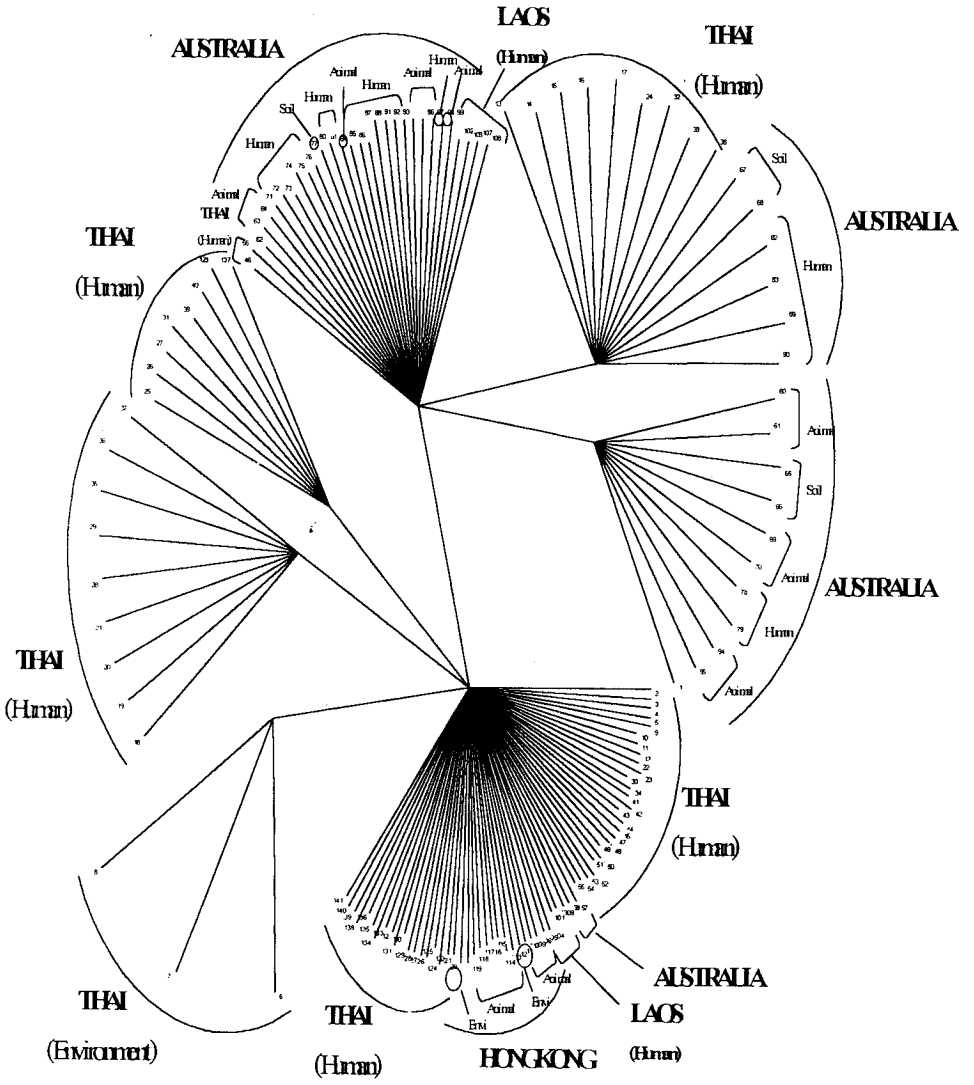
ตารางที่ 1 สรุปจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ และการแสดงแบบแผนของ LPS และ PCR-RFLP

| No. | Source | Code/Strain | Isolated type | LPS | | | Restriction Enzyme | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Typical | Atypical | No ladder | *EcoR* I | *Pst* I | *Not* I |
| 1 | Outgroup | | | | | | | | |
| 2 | THAI | BpNF10/38 | Human | / | | | / | / | / |
| 3 | | BpNF47/38 | Human | / | | | / | / | / |
| 4 | | BpNF105/37 | Human | / | | | / | / | / |
| 5 | | BpNF154/37 | Human | / | | | / | / | / |
| 6 | | E008 | Environment | / | | | / | / | / |
| 7 | | E025 | Environment | / | | | / | (//) | / |
| 8 | | E203 | Environment | / | | | / | (//) | / |
| 9 | | 230a | Human | / | | | / | (//) | / |
| 10 | | 241a | Human | / | | | / | / | / |
| 11 | | 244a | Human | / | | | / | / | / |
| 12 | | 932a | Human | / | | | / | * | / |
| 13 | THAI | No1 | Human | | / | | * | / | / |
| 14 | | No2 | Human | | / | | * | / | / |
| 15 | | No3 | Human | | / | | * | / | / |
| 16 | | No4 | Human | | / | | * | / | / |
| 17 | | No5 | Human | | / | | * | / | / |
| 18 | | No6 | Human | | / | | / | / | / |
| 19 | | No7 | Human | | / | | / | / | / |
| 20 | | No8 | Human | | / | | / | / | / |
| 21 | | No9 | Human | | / | | / | / | / |
| 22 | | No10 | Human | / | | | / | / | / |
| 23 | | No11 | Human | / | | | / | / | / |
| 24 | | No12 | Human | | / | | * | / | / |
| 25 | | No13 | Human | | | / | / | / | / |
| 26 | | No14 | Human | | | / | / | / | / |
| 27 | | No15 | Human | | | / | / | / | / |
| 28 | | No16 | Human | | / | | / | / | / |
| 29 | | No17 | Human | | / | | / | / | / |
| 30 | | No18 | Human | / | | | / | / | / |
| 31 | | No19 | Human | | | / | / | / | / |
| 32 | | No20 | Human | | / | | * | / | / |
| 33 | | No21 | Human | | / | | * | / | / |
| 34 | | No22 | Human | / | | | / | / | / |
| 35 | | No23 | Human | | / | | / | / | / |
| 36 | | No24 | Human | | / | | / | / | / |
| 37 | | No25 | Human | | / | | / | / | / |
| 38 | | No26 | Human | | / | | * | / | / |
| 39 | | No27 | Human | | | / | / | / | / |
| 40 | | No28 | Human | | | / | / | / | / |
| 41 | | No29 | Human | / | | | / | / | / |
| 42 | | No30 | Human | / | | | / | / | / |
| 43 | | No31 | Human | / | | | / | / | / |
| 44 | | No32 | Human | / | | | / | / | / |
| 45 | THAI | A | Human | / | | | / | / | / |
| 46 | | B | Human | / | | | * | / | / |
| 47 | | C | Human | / | | | / | / | / |
| 48 | | D | Human | / | | | / | / | / |

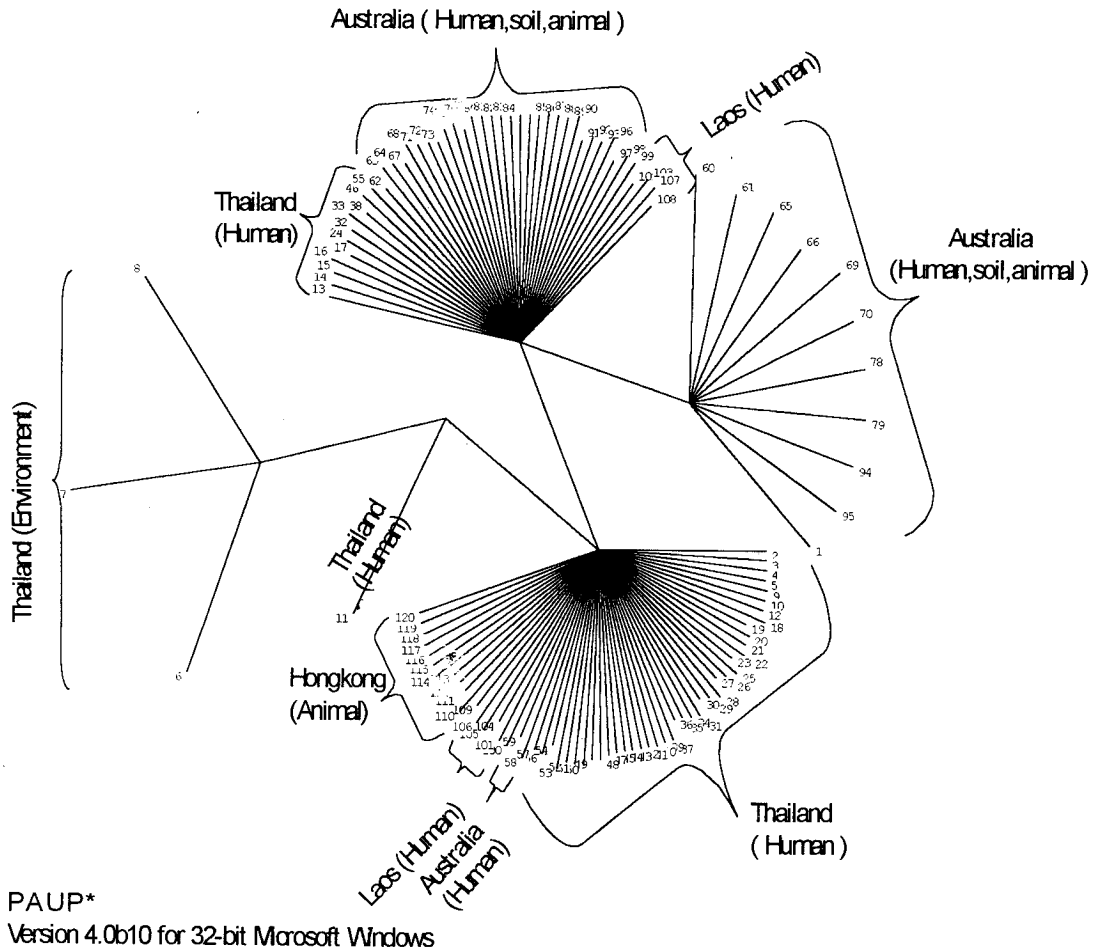
| No. | Source | Code/Strain | Isolated type | LPS | | | Restriction Enzyme | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Typical | Atypical | No ladder | *EcoR* I | *Pst* I | *Not* I |
| 49 | | G | Human | / | | | / | / | / |
| 50 | THAI | I | Human | / | | | / | / | / |
| 51 | | J | Human | / | | | / | / | / |
| 52 | | P | Human | / | | | / | / | / |
| 53 | | Q | Human | / | | | / | / | / |
| 54 | | U | Human | / | | | / | / | / |
| 55 | | R | Human | / | | | * | / | / |
| 56 | | Y 1 | Human | / | | | / | / | / |
| 57 | | Z 2 | Human | / | | | / | / | / |
| 58 | AUSTRALIA | 1A BA | Human | / | | | / | / | / |
| 59 | | 1B BA | Human | / | | | / | / | / |
| 60 | | 2A BA | Animal | / | | | * | / | * |
| 61 | | 2B BA | Animal | / | | | * | / | * |
| 62 | | 3 BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 63 | | 4A BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 64 | | 4B BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 65 | | 6A BA | Soil | / | | | * | / | * |
| 66 | | 6B BA | Soil | / | | | * | / | * |
| 67 | | 7A BA | Soil | | / | | * | / | / |
| 68 | | 7B BA | Soil | | / | | * | / | / |
| 69 | | 8A BA | Animal | / | | | * | / | * |
| 70 | | 8B BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 71 | | 9A BA | Human | / | | | * | / | / |
| 72 | | 9B BA | Human | / | | | * | / | / |
| 73 | | 10 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 74 | | 11 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 75 | | 12 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 76 | | 13 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 77 | | 14 BA | Soil | / | | | * | / | / |
| 78 | | 16A BA | Human | / | | | * | / | * |
| 79 | | 16B BA | Human | / | | | * | / | * |
| 80 | | 17A BA | Human | / | | | * | / | / |
| 81 | | 17B BA | Human | / | | | * | / | / |
| 82 | | 18A BA | Human | | / | | * | / | / |
| 83 | | 18B BA | Human | | / | | * | / | / |
| 84 | | 19 BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 85 | | 20 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 86 | | 21 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 87 | | 22A BA | Human | / | | | * | / | / |
| 88 | | 22B BA | Human | / | | | * | / | / |
| 89 | | 23A BA | Human | | / | | * | / | / |
| 90 | | 23B BA | Human | | / | | * | / | / |
| 91 | | 24A BA | Human | / | | | * | / | / |
| 92 | | 24B BA | Human | / | | | * | / | / |
| 93 | | 25 BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 94 | | 26 BA | Animal | / | | | * | / | * |
| 95 | | 27 BA | Animal | / | | | * | / | * |

| No. | Source | Code/Strain | Isolated type | LPS | | | Restriction Enzyme | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Typical | Atypical | No ladder | *EcoR* I | *Pst* I | *Not* I |
| 96 | | 28 BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 97 | | 29 BA | Human | / | | | * | / | / |
| 98 | AUSTRALIA | 30 BA | Animal | / | | | * | / | / |
| 99 | LAO | L03 | | / | | | * | / | / |
| 100 | | L04 | | / | | | / | / | / |
| 101 | | L05 | | / | | | / | / | / |
| 102 | | L06 | | / | | | * | / | / |
| 103 | | L07 | | / | | | * | / | / |
| 104 | | L08 | | / | | | / | / | / |
| 105 | | L09 | | / | | | / | / | / |
| 106 | | L10 | | / | | | / | / | / |
| 107 | | L13 | | / | | | * | / | / |
| 108 | | L18 | | / | | | * | / | / |
| 109 | HONGKONG | HK1 | Animal | / | | | / | / | / |
| 110 | | HK2 | Animal | / | | | / | / | / |
| 111 | | HK3 | Animal | / | | | / | / | / |
| 112 | | HK4 | Aerosol | / | | | / | / | / |
| 113 | | HK5 | Animal | / | | | / | / | / |
| 114 | | HK7 | Animal | / | | | / | / | / |
| 115 | | HK8 | Animal | / | | | / | / | / |
| 116 | | HK9 | Animal | / | | | / | / | / |
| 117 | | HK10 | Animal | / | | | / | / | / |
| 118 | | HK11 | Animal | / | | | / | / | / |
| 119 | | 108A | Soil | / | | | / | / | / |
| 120 | | 108B | Soil | / | | | / | / | / |
| 121 | THAI | 1889a | Human | / | | | / | / | / |
| 123 | | 1895a | Human | / | | | / | / | / |
| 123 | | 1909a | Human | | | / | / | / | / |
| 124 | | 1923a | Human | / | | | / | / | / |
| 125 | | 2037a | Human | / | | | / | / | / |
| 126 | | 2095a | Human | / | | | / | / | / |
| 127 | | 2096a | Human | / | | | / | / | / |
| 128 | | 2102a | Human | / | | | / | / | / |
| 129 | | 2104a | Human | / | | | / | / | / |
| 130 | | 2106a | Human | / | | | / | / | / |
| 131 | | 2110a | Human | / | | | / | / | / |
| 132 | | 2111a | Human | / | | | / | / | / |
| 133 | | 2112a | Human | / | | | / | / | / |
| 134 | | 2113a | Human | / | | | / | / | / |
| 135 | | 1960 | Human | / | | | / | / | / |
| 136 | | 2115a | Human | / | | | / | / | / |
| 137 | | 2116a | Human | | | / | / | / | / |
| 138 | | 2120a | Human | / | | | / | / | / |
| 139 | | 2121a | Human | / | | | / | / | / |
| 140 | | 2123a | Human | / | | | / | / | / |
| 141 | | 2124a | Human | / | | | / | / | / |

รูปที่ 6 ก Phylogenetic tree ที่สร้างจากการใช้แบบแผน PCR-RFLP



**รูปที่ 6 ข** Phylogenetic tree ที่สร้างจากการใช้ข้อมูล LPS และ PCR-RFLP



## สรุปและวิจารณ์การทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในการวิเคราะห์แบบแผน LPS ของเชื้อที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 141 สายพันธุ์ ซึ่ง 80 ตัวอย่างมาจากประเทศไทย โดย 77 ตัวอย่างมาจากผู้ป่วย และ 3 ตัวอย่างมาจากแหล่งดิน ส่วน อีก 10 ตัวอย่างมาจากประเทศลาว 10 ตัวอย่างมาจากประเทศฮ่องกง ซึ่งส่วนมากได้จากการติดเชื้อของสัตว์ และอีก 41 ตัวอย่างมาจากประเทศออสเตรเลีย โดยพบแบบแผนที่เป็น Typical เป็นส่วนใหญ่ 108/141 (76%), พบแบบแผนที่เป็น Atypical 24/141 (18.4%), และแบบแผนที่เป็น Smear 8/141 (5.6%), ซึ่งเป็นไปตามการคาดหมายที่จะพบเชื้อที่ให้ LPS ที่เป็น Typical มากกว่า Atypical โดยตั้งเป้าไว้ที่ 70:30 ถือว่าอยู่ในส่วนค่าที่ใกล้เคียงที่ได้เสนอไว้ และจากผลการศึกษาแบบแผน LPS พบว่าเชื้อที่มาจากออสเตรเลียส่วนใหญ่ให้ Typical ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลแรกที่คาดว่าเชื้อในออสเตรเลียเป็น Atypical และพบแบบแผนที่เป็น Smear เฉพาะผู้ป่วยในไทยเท่านั้น

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

1. PCR-RFLP ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ของทั้ง 3 เอนไซม์ มีทั้งสิ้น 81/141 (57.4%)
2. PCR-RFLP ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอนไซม์ 2 เอนไซม์ (*PstI* และ *NotI*) มี 46/141(32.6%)
3. PCR-RFLP ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว *PstI* มี 9/141(6.3%)
4. PCR-RFLP ที่ตัดได้ 1 ตำแหน่งด้วยเอนไซม์ 2 เอนไซม์ (*EcoRI* และ *NotI*) และตัดมากกว่า 1 ตำแหน่งด้วย *PstI* มี 4/141(3.7%)

ที่น่าสนใจคือ เชื้อที่ได้จากแหล่งดินในประเทศไทยทั้งหมดให้แบบแผนที่เป็นชนิดที่ 4 เท่านั้น ซึ่งต่างจากเชื้อที่อื่นๆแม้จะมาจากแหล่งดิน นอกจากนี้จุดที่น่าสนใจอีกกรณีคือ เชื้อที่ได้จากประเทศออสเตรเลียทั้งหมดจะมีแบบแผนเป็นแบบที่ 2 และ 3 หรือกล่าวอย่างชัดเจนคือ PCR-RFLP ไม่สามารถตัดได้ด้วย *EcoRI* และจะพบกับเชื้อที่มาจากประเทศลาวบ้าง

จากผลที่ได้ศึกษาแบบแผน PCR-RFLP นี้พบการเกิดลักษณะจำเพาะแต่ไม่จำเพาะอย่างสิ้นเชิงแต่มีนัยสำคัญที่น่าสนใจดังที่กล่าวแล้ว ดังนั้นการจัดกลุ่ม Phylogenetic tree เพื่อหากลุ่มความสัมพันธ์จะทำให้มองเห็นภาพที่ชัดเจนขึ้น จากการสร้าง Phylogenetic tree โดยการใช้ข้อมูลการตัดผลผลิต PCR-RFLP สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 7 กลุ่ม โดยมีกลุ่มพื้นฐานใหญ่ๆ 2 กลุ่ม คือแบบแผนที่ 1 และ ที่ 2 ที่มีความสัมพันธ์กัน จากนั้นในกลุ่มที่ 1 จะแตกเป็น 3 กลุ่มย่อย ที่ชัดเจนคือเป็นสายของเชื้อในประเทศไทย ซึ่งเป็นแหล่งดินที่แยกออกมาชัดเจน 1 กลุ่ม สำหรับกลุ่มใหญ่ที่ 2 ก็มีกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม โดยส่วนใหญ่ของ 2 กลุ่มย่อยนี้มาจากออสเตรเลีย และลาว มีเชื้อจากผู้ป่วยไทยกระจายอยู่ในกลุ่มย่อยนี้บ้าง สำหรับเชื้อที่ได้จากฮ่องกงทั้ง 10 ตัวอย่างไม่ว่าจะมาจากดิน หรือ คนและสัตว์ พบว่ามีแบบแผนเป็นกลุ่มเดียวกับกลุ่มใหญ่แบบที่1 ผลที่เห็นจากการสร้างความสัมพันธ์ Phylogenetic tree นี้ ทำให้สามารถคาดเดาว่า เชื้อที่เกิดขึ้นในประเทศฮ่องกงน่าจะมาจากประเทศไทย ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าการเกิดการระบาดของเชื้อจะเกิดหลังการเกิดพายุใต้ฝุ่น ซึ่งมีความ

เป็นไปได้ที่จะเกิดจากการกระจายจากส่วนแผ่นดินไปสู่เกาะฮ่องกง ส่วนลักษณะของเชื้อในประเทศออสเตรเลียมีลักษณะที่จำเพาะมากโดยเฉพาะการที่ไม่สามารถจดจำได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งแบบแผนของเชื้อจากออสเตรเลียไม่ว่าจะมาจากดินหรือสัตว์ คน ก็จะมีลักษณะกลุ่มคล้ายกันมาก เช่นนี้อาจทำให้คาดเดาว่าเชื้ออยู่ในทวีปที่แยกตัว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจึงเกิดได้น้อยกว่า

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้สร้าง Phylogenetic tree ที่อาศัยข้อมูลทั้ง PCR-RFLP ร่วมกับ LPS เพื่อให้ข้อมูลการสร้าง Phylogenetic tree มีค่าที่มากขึ้น เพื่อเปรียบเทียบแนวโน้มในการหาความสัมพันธ์ทั้งระดับ Genotype และ Phynotype ประกอบกัน ผลที่ได้จะเกิดกลุ่มความสัมพันธ์ลดลงเพียง 4 กลุ่มเท่านั้น โดยมีกลุ่มพื้นฐานใหญ่ๆ 2 กลุ่ม ซึ่งในกลุ่มที่ 1 ที่เป็นจำนวนมากที่สุดนี้พบเชื้อทั้ง ไทย ลาว ฮ่องกง และ ออสเตรเลียร่วมอยู่ และมีการแตกสายสัมพันธ์เป็นเชื้อในแหล่งดินของไทยแยกจำเพาะออกมา ส่วนในกลุ่มพื้นฐานที่ 2 พบลักษณะเชื้อที่มาจากไทย ลาว และส่วนใหญ่ออสเตรเลีย และมีการแตกสายสัมพันธ์เป็นเชื้อจากออสเตรเลียอย่างเด่นชัด ผลที่ได้นี้หากนำมาวิเคราะห์ก็จะมีแนวโนม้การคาดเดาเช่นเดียวกับข้อมูล Phylogenetic tree ที่มาจาก PCR-RFLP กล่าวคือ เชื้อที่เกิดขึ้นในประเทศฮ่องกงน่าจะมาจากประเทศไทย ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าการเกิดการระบาดของเชื้อจะเกิดหลังการเกิดพายุใต้ฝุ่น ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการกระจายจากส่วนแผ่นดินไปสู่เกาะฮ่องกง ส่วนลักษณะของเชื้อในประเทศออสเตรเลียมีลักษณะที่จำเพาะมากโดยเฉพาะการที่ไม่สามารถจดจำได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งแบบแผนของเชื้อจากออสเตรเลียไม่ว่าจะมาจากดินหรือสัตว์ คน ก็จะมีลักษณะกลุ่มคล้ายกันมาก เช่นนี้อาจทำให้คาดเดาว่าเชื้ออยู่ในทวีปที่แยกตัว ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจึงเกิดได้น้อยกว่าเช่นกัน

สำหรับการเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อกับกลุ่มความสัมพันธ์ที่ศึกษาในการวิจัยนี้กำลังอยู่ระหว่างการขอข้อมูลจากแหล่งต่างๆ เนื่องจากเชื้อที่ได้รับการศึกษานี้ต้องมีการขออนุมัติจากประเทศเจ้าของก่อนจึงทำให้การได้ข้อมูลต่างๆมาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความรุนแรงได้ เป็นที่น่าสนใจว่าจากการศึกษา Genome ของเชื้อนี้ได้เสร็จสิ้นและมีรายงานเมื่อไม่นานมานี้ ในการศึกษาความรุนแรงของเชื้อดังกล่าวน่าจะมาจากการที่เชื้อสามารถรับถ่ายยีนจากสิ่งภายนอกได้ง่ายและรวดเร็ว เนื่องจากพบว่าใน Genome มี Genomic Island (GI) ค่อนข้างสูง 16 GI โดยในสายพันธ์ที่แตกต่างกันก็จะพบจำนวน GI ต่างกัน ซึ่งเชื่อว่าเป็นสิ่งที่บ่งบอกความรุนแรงของเชื้อนี้

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในโครงการวิจัยดังกล่าวสมารถนำข้อมูลและการวิเคราะห์ที่พบความสัมพันธ์และการกระจายของเชื้อที่มีนัยสำคัญ รวมทั้งสร้างองค์ความรู้ต่อความเข้าใจในการจัดการโดยเฉพาะการระบาดของเชื้อในกรณีของฮ่องกงซึ่งสามารถบ่งชี้แหล่งของเชื้อในการแพร่ระบาดนั้นได้ อีกทั้งในส่วนของเชื้อจากแหล่งดินในประเทศไทยมีข้อน่าสนใจแต่เนื่องจากศึกษาในจำนวนน้อยเกินไป คณะผู้วิจัยคาดว่าจะศึกษาในกลุ่มนี้เพิ่มเติม และจะทำให้มีข้อมูลที่ชัดเจนพร้อมที่จะนำส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติต่อไป

## เอกสารอ้างอิง


1. Anuntagool, N., Aramsri, P., Panichakul, T., Wuthiekanun, V., Kinoshita, R., White, N.J. and Sirisinha, S. (2000) Antigenic heterogeneity of lipopolysaccharide among *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 31, 146-152.
2. Burtnick, M.N., Woods, D.E. (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.
3. Dance, D.A.B. (2000) Melioidosis as an emerging global problem. Acta Tropica 74, 115-119.
4. Inglis, T.J.J., Garrow, S.C., Adams, C., Henderson, M., Mayo, M. (1998) Dry season outbreak of melioidosis in Western Australia. Lancet 352, 1600.
5. Pitt, T.L., Trakulsomboon, S., Dance, D.A.B. (2000) Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*. Acta Tropica 74, 181-185.
6. Suputtamongkol, Y., Hall, A.J., Dance, D.A., Chaowagul, W., Rajchanuvong, A., Smith, M.D., White, N.J. (1994) The epidemiology of melioidosis in Ubon Rachatani, northeast Thailand. Int. J. Epidemiol. 23, 1082-1090.
7. Trakulsomboon, S., Dance, D.A.B., Smith, M.D., White, N.J., Pitt, T.L. (1997) Ribotype differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. J. Med. Microbiol. 46, 565-570.
8. Vadivelu, J., Puthucheary, S.D., Mifsud, A., Drasar, B.S., Dance, D.A.B., Pitt, T.L. (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.
9. Matthew, T.G., Holden et al., (2004) Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. PNAS. 101, 14240-14245.

## ภาคผนวก

โครงการศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน โดยเฉพาะคนไทยในภาคอีสาน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชาวนาที่จะได้รับการติดเชื้อดังกล่าว การนำความรู้และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและการใช้ Molecular marker ในการศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อก่อโรคนี้ ถึงแม้จะไม่ได้นำไปสู่การพัฒนาการจัดการชีวภาพของเชื้อ ในการค้าเชิงพานิชย์ แต่ก็สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาใช้พัฒนาการจัดการชีวภาพของเชื้อในเชิงวิวัฒนาการและเชิงระบาดวิทยาที่จะสนับสนุนการจัดการทางสาธารณสุขได้ และเนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาในระดับนำร่องซึ่งข้อมูลที่ได้ยังไม่สามารถนำไปจัดการในเชิงระบาดวิทยาที่จะสนับสนุนการจัดการทางสาธารณสุขได้ก็ตาม แต่การวิจัยนี้ได้เป็นส่วนหนึ่งของการสร้างนักวิจัยในระดับปริญญาตรีถึง 2 คน ซึ่งเป็นนักศึกษาในระดับชั้นปีที่ 3 และ 4 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งนับว่าเป็นสิ่งสำคัญในการสร้างและพัฒนาทรัพยากรบุคคลที่สามารถจะนำความรู้พื้นฐานนี้ไปพัฒนาต่อไป

นอกจากนี้ผลการศึกษาวิจัยที่ได้นี้มีโอกาสได้นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 9 ของ BRT ที่จัดที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี และการประชุมของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30 (วทท.30) โดยนักศึกษาทั้ง 2 ท่านได้มีโอกาส และส่วนร่วมในการประชุมด้วย

สำหรับการเผยแพร่ผลงานกำลังอยู่ระหว่างการรอข้อมูลของแหล่งที่มาของเชื้อในแง่ความรุนแรง และจะต้องเพิ่มเติมในส่วนของตัวอย่างแหล่งดินในประเทศไทย แล้วจะรวบรวมตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติต่อไป

ในส่วนการขยายงานเพิ่มเติม หาก BRT เห็นควรให้การสนับสนุนเพื่อให้ผลงานมีความชัดเจนและเป็นประโยชน์ ซึ่งคณะผู้วิจัยตั้งใจจะทำเพิ่มในส่วนของตัวอย่างแหล่งดินในประเทศไทย และเพิ่มในส่วนของตัวอย่างจากประเทศเวียตนาม ซึ่งได้ทำการติดต่อข้ออนุมัติในการศึกษาและได้รับการตอบอนุมัติแล้ว หากได้รับการสนับสนุนต่ออีก 1 ปี ก็จะสามารถตีพิมพ์ผลงานได้อย่างสมบูรณ์