

## การพิสูจน์โปรตีนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เพื่อใช้เป็นแอนติเจน สำหรับการวินิจฉัยโรคmelioidosis

ภาสกร แพงมา<sup>1,2</sup> ศรีวิไล วรรณตระกูล<sup>2</sup> ธนกร ประวิทยา<sup>2,3</sup> ธันนา บุญญรัตน์<sup>4</sup> ปรีชา หอมจำปา<sup>2,3,\*</sup>

### บทคัดย่อ

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosisทางห้องปฏิบัติการอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2-3 วัน สำหรับการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยายังไม่มีวิธีที่มีประสิทธิภาพเพียงพอเนื่องจากขาดแอนติเจนที่ดี จึงมีความต้องการแอนติเจนที่มีความจำเพาะสำหรับการวินิจฉัยโรค การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารโปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนที่ดีจากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosisทางห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มจากการทำ partial *Sau3A* library โดยใช้ pUC18 เป็นเวกเตอร์และใช้เชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  เป็นโฮสต์ จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ผลิตโปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยโรคmelioidosisที่ผ่านการดูดซับเอาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* ออกไปแล้วจากการศึกษาพบว่าโคลน PHE191 สร้างโปรตีนขนาดประมาณ 40 kDa มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่อยู่ใน zinc-binding dehydrogenase family ผลการประเมินโดยวิธี Western blot เพื่อดูความสามารถของโปรตีนที่เตรียมให้บริสุทธิ์แล้วในการใช้วินิจฉัยโรค โดยใช้ซีรัมผู้ป่วยโรคmelioidosis ซีรัมผู้ป่วยโรคอื่นๆ และซีรัมคนปกติ ทั้งในและนอกพื้นที่ระบาด รวม 107 ราย พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความไวร้อยละ 78.9 และความจำเพาะร้อยละ 72.5 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IHA ซึ่งมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 86.8 และ 66.7 ตามลำดับ ถือว่าโปรตีนชนิดนี้มีความจำเพาะในการวินิจฉัยโรคโดยวิธี Western blot ดีกว่าวิธี IHA แม้ว่าความไวจะต่ำกว่า ดังนั้นควรศึกษาต่อไปเพื่อดูว่าหากใช้โปรตีนชนิดนี้ในรูปโครงสร้างธรรมชาติ จะมีศักยภาพในด้านวินิจฉัยโรคที่ดีกว่านี้หรือไม่

**คำสำคัญ :** โรคmelioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, diagnosis, immunodominant proteins

### บทนำ

โรคmelioidosis (Meliodosis) เป็นโรคติดเชื้อจาก *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เป็นโรคเฉพาะถิ่นในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตอนเหนือของประเทศ

ออสเตรเลีย<sup>(1)</sup> เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญเนื่องจากมีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง<sup>(2)</sup> การติดเชื้อพบในกลุ่มประชากรที่มีอาชีพเกษตรกรรมและอาชีพที่ต้องสัมผัสดินและน้ำเป็นประจำ การติดต่อของเชื้อคือทางผิวหนังที่มีบาดแผล และการหายใจ ลักษณะ

<sup>1</sup> นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

<sup>2</sup> ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

<sup>3</sup> ศูนย์วิจัยโรคmelioidosis คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

<sup>4</sup> งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\* ผู้รับผิดชอบบทความ

## Identification of *Burkholderia pseudomallei* protein as antigen for diagnosis of melioidosis

Passakorn Pangma<sup>1,2</sup>, Srivilai Waropastrakul<sup>2</sup>, Tanakorn Proungvitaya<sup>2,3</sup>, Thanwa Boonyaratana<sup>4</sup>, Preecha Homchampa<sup>2,3</sup> \*

### ABSTRACT

The gold standard method for laboratory diagnosis of melioidosis is bacteriological culture. However, this method is time-consuming. Currently, a serological method with high sensitivity and specificity for diagnosis of melioidosis has not been available. Specific antigens for serological diagnosis are highly needed. The aim of this study was to identify immunodominant proteins from *B. pseudomallei* as antigen for laboratory diagnosis of melioidosis. In this study, a partial Sau3A library of *B. pseudomallei* genomic DNA was constructed in pUC18 vector. The *E. coli* clones expressing immunogenic protein of *B. pseudomallei* were selected by a colony blot assay using pre-absorbed pooled melioidosis sera as the probe. One clone, PHE191, expressing a 40 kDa recombinant protein with high homology to zinc-binding dehydrogenase family protein was chosen for further study. The recombinant protein was purified and evaluated by Western blot analysis for its diagnostic utility using a total of 107 serum samples from culture-proven melioidosis patients, patients with other related diseases and healthy individuals from endemic and non-endemic areas. The results showed that this protein had sensitivity and specificity of 78.9 % and 72.5 %, respectively, whereas indirect hemagglutination assay (IHA) gave sensitivity and specificity of 86.8 % and 66.7 %, respectively. This protein had higher specificity but low sensitivity than IHA. With a higher specificity, this protein is warranted for further study to determine whether its native conformation would provide better diagnostic potential for laboratory diagnosis of melioidosis.

**Key words:** Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, diagnosis, immunodominant proteins

อาการทางคลินิกของโรคมะเร็งหลายแบบคือ แบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน เรื้อรัง และไม่มีอาการ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถอาศัยอยู่ภายใน phagocytic cell และสร้าง

glycocalyx มาห่อหุ้มตัว ซึ่งสามารถป้องกันไม่ให้ยาต้านจุลชีพเข้าถึงตัวได้ ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด และมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้อีก<sup>(3)</sup>

<sup>1</sup> M.Sc. student in Medical Science Program, Graduate School

<sup>2</sup> Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences,

<sup>3</sup> Melioidosis Research Center and <sup>4</sup>Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

\* Corresponding author (e-mail:preecha@kku.ac.th)

การวินิจฉัยโดยอาศัยอาการทางคลินิกของผู้ป่วยทำได้ยาก เนื่องจากมีอาการคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้ออื่นๆ<sup>(4)</sup> จึงต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งทำได้โดยการเพาะเชื้อ ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องรออย่างน้อย 2-3 วันจึงจะทราบผล อาจทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาอย่างทันเวลาที่ การตรวจทางอณูชีววิทยา เช่น polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกนำมาศึกษาพบว่ามีความไวสูง แต่มีความจำเพาะต่ำ และยังไม่ได้มีการศึกษาในตัวอย่างจริง<sup>(5)</sup> นอกจากนี้ยังเป็นวิธีมีความยุ่งยากและใช้งบประมาณมาก ไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลขนาดเล็ก ดังนั้นการตรวจทางน้ำเหลืองซึ่งสามารถให้ผลการตรวจได้รวดเร็วจึงมีประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยโรค แต่ปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่ทั้งความไวและความจำเพาะที่ดีพอ วิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ indirect hemagglutination assay (IHA)<sup>(5)</sup> แต่ผลการตรวจยังไม่มี ความจำเพาะเพียงพอ ซึ่งปัญหาหลักของการตรวจหาแอนติบอดี คือ ยังไม่มีแอนติเจนที่จำเพาะสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ อีกทั้งคนที่อยู่ในพื้นที่ระบาด ส่วนใหญ่จะมีแอนติบอดีต่อเชื้อ ทำให้เป็นปัญหาในการแยกระหว่างผู้ที่มีภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติกับผู้ป่วย ดังนั้นหากมีแอนติเจนที่จำเพาะและมีประสิทธิภาพจะสามารถแก้ปัญหาได้

ปัจจุบันได้มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ได้พยายามหาแอนติเจนรูปแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยตัวอย่างเช่น affinity purified lipopolysaccharide<sup>(6)</sup>, 36 kDa exotoxin<sup>(7)</sup>, 19.5 kDa protein<sup>(8)</sup>, 40 kDa purified protein, 200 kDa surface antigen, 30 kDa crude culture filtrate<sup>(5)</sup> และ Bps-1 recombinant protein<sup>(4)</sup> จากการศึกษาพบว่า recombinant protein เป็นแอนติเจนที่มีความไวและความจำเพาะสูง มีความปลอดภัยในการเตรียม และสามารถผลิตได้ตามปริมาณที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานวิจัยต่อเนื่องที่แสดงให้เห็นถึงการนำแอนติเจนดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอาจจะยังมีปัญหาในทางปฏิบัติอย่างหนึ่งอย่างใดเกี่ยวกับแอนติเจนดังกล่าว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสาร

โปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนที่ดีจากเชื้อ *β. pseudomallei* ในรูปแบบ recombinant protein เพื่อจะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสทางห้องปฏิบัติการ การตรวจหาสารโปรตีนดังกล่าวจะทำโดยการสร้างห้องสมุดจีโนม (genomic library) ของเชื้อ แล้วตรวจหาโคลนที่สร้างโปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนที่ดีด้วยซีรัมของผู้ป่วยเมลิออยโดสิส

## วัสดุและวิธีการศึกษา

### แบคทีเรียและซีรัมผู้ป่วย

ใช้เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยสมบูรณ์และเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยในจังหวัดขอนแก่น สำหรับซีรัมที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ซีรัมผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสที่สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 38 ราย โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิสและหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซีรัมผู้ที่สงสัยโรคเมลิออยโดสิสแต่ผลเพาะเชื้อพบแบคทีเรียอื่นๆ จำนวน 23 ราย ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* 5 ราย, *Acinetobacter lwoffii* 1 ราย, *Burkholderia cepacia* 1 ราย, Coagulase positive *Staphylococcus* 2 ราย, *Escherichia coli* 2 ราย, *Enterobacter* spp. 2 ราย, *Flavobacterium* spp. 1 ราย, *Klebsiella pneumoniae* 2 ราย, *Mycobacterium tuberculosis* 2 ราย, *Mycobacterium* spp. 1 ราย, *Pseudomonas aeruginosa* 1 ราย, *Pseudomonas shigelloides* 1 ราย, *Pseudomonas* spp. 1 ราย และ *Salmonella* group D 1 ราย ได้รับจากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ซีรัมคนปกติในพื้นที่ระบาดจำนวน 34 ราย ได้รับจากผู้มีสุขภาพดีในจังหวัดขอนแก่น นครราชสีมาและชัยภูมิ ซีรัมคนปกตินอกพื้นที่ระบาดจำนวน 12 รายได้รับจากผู้บริจาคโลหิตในกรุงเทพมหานครซีรัมทั้งหมดจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

### การสร้างห้องสมุดจีโนมของเชื้อ *B. pseudomallei*

การสร้างห้องสมุดจีโนมของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ทำได้โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau3AI (Promega, USA) และ เชื่อมต่อดีเอ็นเอขนาด 3-5 kb เข้ากับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI (Promega, USA) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA) จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี electroporation และแยกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar (Criterion, USA) ที่เติมสาร X-gal (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) และยาต้านจุลชีพแอมพิซิลลิน (200  $\mu$ g/ $\mu$ l) เชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้และมีลักษณะโคโลนีสีขาวจะถูกคัดแยกเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

### การตรวจกรองหาแบคทีเรียโคลนที่สร้าง immunogenic protein

การตรวจกรองหาเชื้อ *E. coli* โคลนที่สร้าง immunogenic protein ทดสอบโดยเทคนิค colony blot<sup>(9)</sup> โดยใช้ซีรัมผู้ป่วยจำนวน 5 รายที่มี IHA titer  $\geq$  5120 ซึ่งนำมาผสมรวมกัน (pooled sera) และผ่านการดูดซับเอาแอนติบอดีต่อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pUC18 ออกก่อนแล้ว โคลนที่ให้ผลบวกจะถูกนำไปวิเคราะห์ยืนยันด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)<sup>(10)</sup> โดยใช้ 12 % separating gel และ 5 % stacking gel เพื่อหาขนาดของโปรตีนและใช้เทคนิค Western blot<sup>(10)</sup> เพื่อประเมินความสามารถในการทำปฏิกิริยากับซีรัมผสมโคลนที่พบโปรตีนและให้ผลบวกกับซีรัมผสม นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อวิเคราะห์หาขนาดและตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

### การวิเคราะห์หา Open reading frame (ORF) ที่สร้างโปรตีน

พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนที่ให้ผลบวกจะถูกส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นนำมา

วิเคราะห์หาตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Gen Bank และวิเคราะห์หา ORF ที่ผลิตโปรตีนขนาดที่พบโดยใช้โปรแกรม Gene tool lite 1.0 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) เพื่อหาจีโนมที่สร้างโปรตีน

### การผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein)

ภายหลังการวิเคราะห์และทราบ ORF ที่สร้างโปรตีนแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5'ATTTCGGATCCATGCGCACG CGTGCGGCACG 3' (forward primer) และ 5'TGCCAAGCTTTCAGATCGACAGGCAGATCTTGCC 3' (reverse primer) ซึ่งถูกออกแบบให้ปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองข้างสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI (Promega, USA) และ HindIII (Promega, USA) เพื่อสามารถเชื่อมต่อเข้ากับ expression vector pQE30 (Qiagen, Germany) อย่างตรงเฟรมการถอดรหัส จากนั้นนำเอาดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี electroporation<sup>(11)</sup> และคัดเลือกโคลนที่รับพลาสมิดลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงใน LB agar ที่มียาต้านจุลชีพแอมพิซิลลิน ทำการสกัดพลาสมิดจากเชื้อที่เจริญได้เพื่อวิเคราะห์พลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII โคลนที่ถูกต้องนำไปทดสอบการสร้างโปรตีน โดยหลังจากที่เลี้ยงเชื้อข้ามคืนนำเชื้อไปถ่ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ในสัดส่วน 1:100 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง กระตุ้นให้สร้างโปรตีนด้วยการเติม 1mM Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG, Sigma chemical Co., USA) แล้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดการสร้างโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE โคลนที่สร้างโปรตีนที่มีขนาดถูกต้อง นำไปเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยา Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen, Germany) และตรวจวัดความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

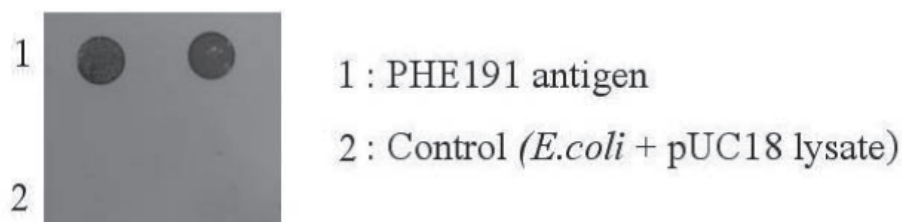
### การประเมินศักยภาพการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

โปรตีนลูกผสมที่ผ่านการเตรียมให้บริสุทธิ์ถูกนำมาประเมินศักยภาพในการวินิจฉัยโรคโดยเทคนิค Western blot เปรียบเทียบกับวิธี IHA<sup>(12)</sup> การวิเคราะห์โดยวิธี Western blot มีขั้นตอนอย่างคร่าวๆ ดังนี้ นำโปรตีนลูกผสมไปแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลไปยังแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF, Pall Corporation, USA) ด้วยวิธี semi-dry transfer (Semi-dry electroblotters, Apollo, Sweden)<sup>(13)</sup> นำแผ่น PVDF มา block ด้วย 3% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., USA) ใน Phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน จากนั้นทำปฏิกิริยากับซีรัมทดสอบที่ระดับการเจือจาง 1:400 ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง และย้อมด้วย peroxidase-labelled anti-human immunoglobulin conjugate (Sigma Chemical Co., USA) ที่เจือจาง 1:2000 ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที ภายหลังการล้าง จะเติมสับสเตรท chloronaphthol (Sigma Chemical Co., USA) ทำให้เกิดสีที่แถบโปรตีนในกรณีที่ให้ผลบวก ผล

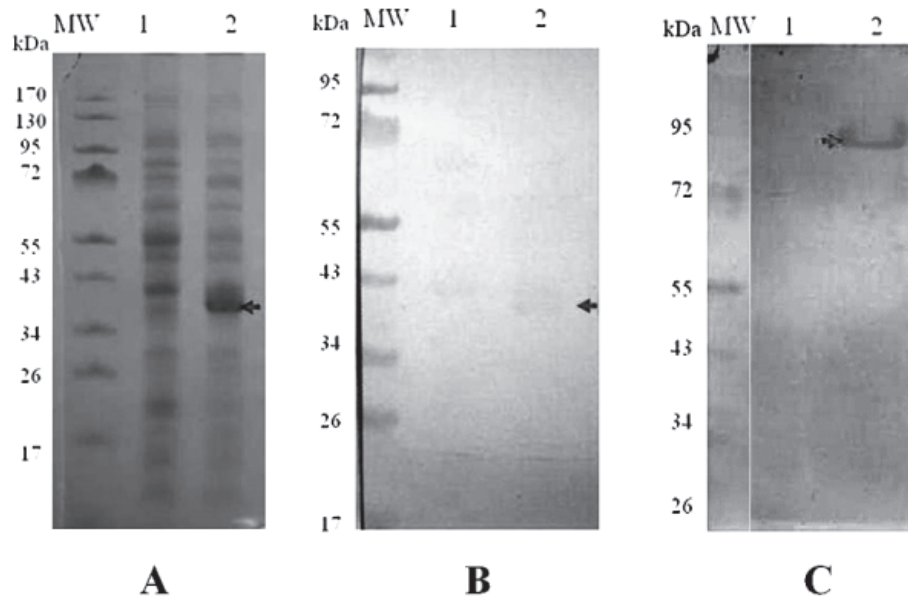
การทดลองที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value, NPV)

### ผลการศึกษา

จากการตรวจกรอง transformant clones จำนวน 1,580 โคลน โดยเทคนิค colony blot ด้วยซีรัมของผู้ป่วยที่ผ่านการดูดซับเอาแอนติบอดีต่อ *E. coli* DH5 $\alpha$ /pUC18 ออกไปก่อนแล้ว พบว่าให้ผลบวกจำนวน 34 โคลน โดยมีระดับความแรงของปฏิกิริยาต่างๆ กัน เมื่อนำโคลนที่ให้ผลบวกมาวิเคราะห์หาขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามี 1 โคลน คือ PHE191 ที่สามารถสร้างโปรตีนขนาด 40 kDa ได้ดี ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค Dot blot และ Western blot เพื่อประเมินความสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วย พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีโดยเฉพาะในสภาวะ non-denaturing (รูปที่ 1 และ 2)



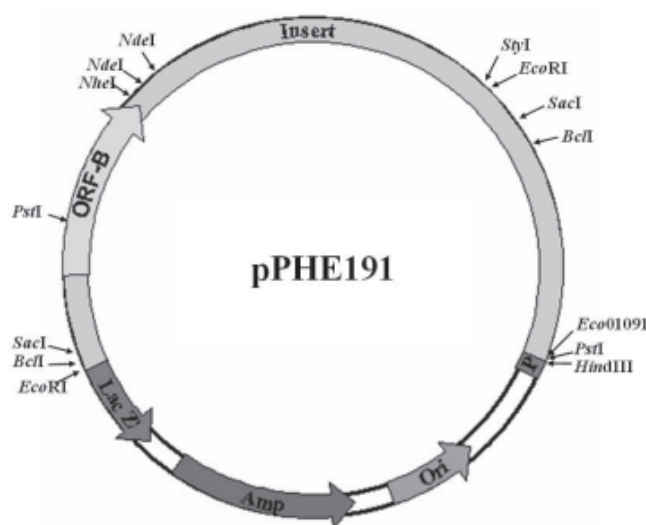
รูปที่ 1 ผลการตรวจ Dot blot ด้วย absorbed pooled patient serum (เจือจาง 1:500) ของโคลน PHE191



**รูปที่ 2** ผลการทดสอบ SDS-PAGE (A), Western blot denaturing gel (B) และ Western blot non-denaturing gel (C) ที่ถูกตรวจวัดด้วย absorbed pooled patient serum (เจือจาง 1:500) ของเชื้อควบคุม *E. coli* + pUC18 (lane 1) และโคลน PHE191 (lane 2) ลูกศรชี้แสดงแถบโปรตีนขนาด 40 kDa (A) และแถบโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยได้ดี (B และ C)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blastn, Blastp, Gene tool lite และ protein molecular weight calculator ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อหา gene ที่สร้างโปรตีน พบว่าโคลน PHE191 (รูป

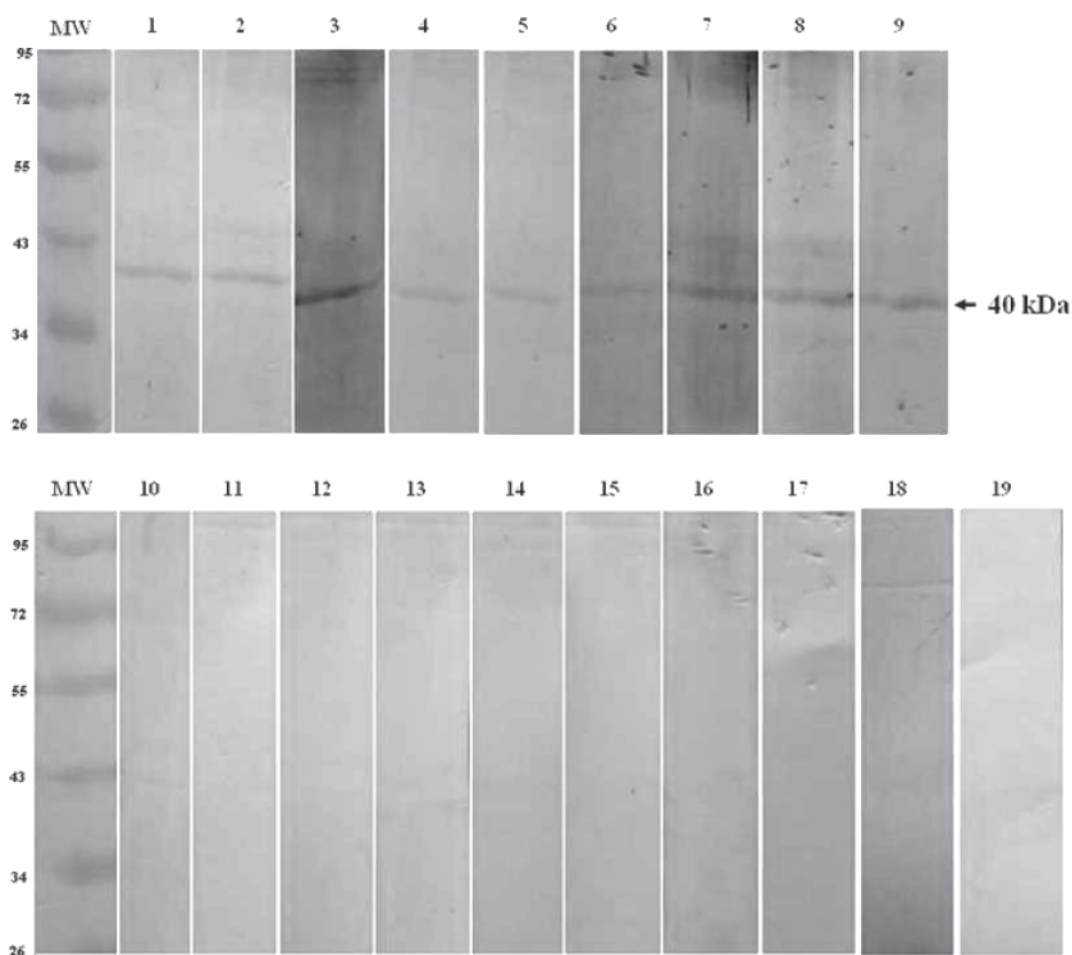
ที่ 3) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (insert) ขนาด 5.4 kb และมี ORF-B ขนาด 1,134 bp กำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 40.02 kDa ซึ่งโปรตีนนี้มีความเหมือนกับโปรตีนในวงศ์ zinc-binding dehydrogenase



**รูปที่ 3** แผนที่จีโนมของ recombinant plasmid โคลน PHE191

จากนั้น ORF-B ถูกเพิ่มจำนวนด้วย เทคนิค PCR และทำการโคลนเข้าไปใน pQE30 พบว่าโคลนที่มีพลาสมิดถูกผสมถูกต้องสามารถถูกชักนำให้สร้างโปรตีนที่มีขนาดตามที่คาดการณ์ไว้ล่วงหน้าได้อย่างถูกต้อง เมื่อเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์และนำไปประเมินศักยภาพในการวินิจฉัยโรคกับซีรัมกลุ่มต่างๆ รวมทั้งหมด 107 ราย โดยวิธี Western blot ดังแสดงตัวอย่างของผลการทดสอบใน **รูปที่ 4** และสรุปผลทั้งหมดได้ดัง **ตารางที่ 1** จากผลการศึกษาพบว่า โปรตีนจาก ORF-B ของโคลน PHE191 มีความไวร้อยละ 78.9 และมีความจำเพาะ

ร้อยละ 72.5 ในขณะทำการตรวจด้วยวิธี IHA มีความไวร้อยละ 86.8 ความจำเพาะร้อยละ 66.7 โปรตีนชนิดนี้ให้ผลบวกข้ามกลุ่ม (ร้อยละ 43.5) น้อยกว่าวิธี IHA (ร้อยละ 65.2) โดยให้ผลบวกกับโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium* spp. จำนวน 1 ราย *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 1 ใน 2 ราย *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* และ Coagulase positive *Staphylococcus* จำนวน 2 ใน 2 ราย



**รูปที่ 4** ตัวอย่างผลการทดสอบ Western blot กับซีรัมของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส (lane 1 - 9) ซีรัมของคนปกติ (lane 10 - 17) และซีรัมของผู้ป่วยโรคแบคทีเรียอื่นๆ (lane 18 - 19) ลูกศรชี้แสดงการเกิดแถบสีที่แถบโปรตีนขนาด 40 kDa

ตารางที่ 1 ผลการประเมินโปรตีน 191 ด้วยวิธี Western blot ด้วยซีรัมกลุ่มต่างๆ

| กลุ่มตัวอย่าง                                    | จำนวน<br>ตัวอย่าง | จำนวนที่ให้ผลบวกกับ<br>โปรตีน 191 (ร้อยละ) | จำนวนที่ให้ผลบวกกับ<br>IHA (ร้อยละ) |
|--------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| ซีรัมผู้ป่วยโรคmelioidosis                       | 38                | 30 (78.9)                                  | 33 (86.8)                           |
| ซีรัมผู้ป่วยโรคติดเชื้อจาก<br>แบคทีเรียชนิดอื่นๆ | 23                | 10 (43.5)                                  | 15 (65.2)                           |
| ซีรัมคนปกติในพื้นที่ระบาด                        | 34                | 9 (26.5)                                   | 5 (14.7)                            |
| ซีรัมคนปกตินอกพื้นที่ระบาด                       | 12                | 1 (8.3)                                    | 3 (25.0)                            |

### วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ปัญหาสำคัญของการวินิจฉัยโรคmelioidosis โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อคือการขาดแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงซึ่งสามารถตรวจแยกผู้ป่วยออกจากคนปกติที่อยู่ในพื้นที่ระบาดได้ ซึ่งคนเหล่านี้จะมีระดับแอนติบอดีอยู่ในร่างกายในระดับแตกต่างกันออกไป จากการศึกษาของ Sirisinha และคณะ<sup>(5)</sup> ได้ศึกษาหาแอนติเจนชนิดต่างๆ เช่น crude antigen และ purified antigen โดยใช้ซีรัมชุดเดียวกันพบว่ายังไม่มีแอนติเจนใดที่ให้ความไวและความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 90 และในการศึกษาของ Dharakol และคณะ<sup>(14)</sup> ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Wongprompitak และคณะ<sup>(4)</sup> ซึ่งพบว่า recombinant protein ที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* มีความจำเพาะในการวินิจฉัยมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อประเมินด้วยเทคนิค Western blot จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการใช้ recombinant protein ในการวินิจฉัยโรค ทำให้มีความจำเพาะสูง แต่ไม่ทราบถึงสาเหตุที่ไม่มีการวิจัยต่อเนื่องเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคสำเร็จรูปซึ่งถือเป็นความต้องการอย่างมากในปัจจุบัน การศึกษานี้ได้ใช้แนวทางที่ง่ายโดยเตรียมห้องสมุดจีนในพลาสมิดแทนการใช้ฟาจ (phage)<sup>(4)</sup> ซึ่งมีความยุ่งยากกว่า ในการตรวจหาโปรตีนจากเชื้อที่สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย จากผลการ

ศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่สร้างจาก ORF-B ของโคลน PHE191 มีศักยภาพในการวินิจฉัยโรคได้ดีโดยมีความไวที่ต่ำกว่าการตรวจด้วยวิธี IHA ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจกรองโรคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากวิธี IHA ใช้ melioidin เป็นแอนติเจนที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่ชัด (crude antigen) จึงทำให้เกิดผลบวกปลอมในกลุ่มผู้ป่วยโรคแบคทีเรียแกรมลบอื่นได้ ดังจะเห็นได้จากค่าความจำเพาะที่ต่ำกว่าการใช้โปรตีนจากโคลน PHE191 อย่างไรก็ตามโปรตีนจากโคลนนี้ก็ไม่ได้มีความจำเพาะสำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* เท่านั้น ดังจะเห็นได้จากปฏิกิริยาข้ามซึ่งพบว่าอยู่ในระดับค่อนข้างสูงเช่นกัน นอกจากนี้ ผลการทดสอบกับซีรัมคู่ 5 ราย (ไม่ได้แสดงผล) พบว่า recombinant protein จากโคลน PHE 191 ให้ผลบวกทั้งสองซีรัมจำนวน 3 ราย โดยอีกสองราย ให้ผลบวกกับเฉพาะ convalescence serum ในขณะที่ IHA ให้ผลบวกทั้งสองซีรัมทั้ง 5 ราย ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากสาร melioidin ซึ่งเป็น soluble polysaccharide<sup>(15)</sup> มีคุณสมบัติเป็น T-independent antigen จึงสามารถกระตุ้น B cells ได้โดยตรง ไม่ต้องอาศัยความช่วยเหลือจาก T helper cells ทำให้มีการสร้างแอนติบอดีชนิด IgM ได้เร็วในขณะที่แอนติเจนที่เป็นโปรตีน ต้องอาศัยทั้ง antigen presenting cell และต้องอาศัยความช่วยเหลือจาก T helper cell จึงจะสามารถกระตุ้น B cell ให้สร้าง

แอนติบอดีได้<sup>(16)</sup> จึงอาจจะใช้เวลานานกว่าที่จะตรวจพบแอนติบอดีโดยเฉพาะในกรณีที่เป็นการติดเชื้อครั้งแรก อย่างไรก็ตามถ้าเป็นการติดเชื้อในครั้งที่สอง การตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นโปรตีนก็จะเกิดขึ้นได้เร็วเพราะเป็นการกระตุ้น memory cells ที่เกิดในครั้งแรก จึงสามารถที่จะตรวจพบแอนติบอดีได้เร็วตั้งแต่ในระยะแรกของ acute phase สาเหตุที่ recombinant protein จากโคลน PHE 191 ให้ความไวในการตรวจที่ต่ำอาจเกิดจากเทคนิค Western blot ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำให้โปรตีนอยู่ในสภาวะที่สูญเสียโครงสร้างธรรมชาติ ซึ่งจะสามารถตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ linear epitopes เท่านั้น ไม่สามารถตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ conformational epitopes ซึ่งจะเป็นแอนติบอดีที่พบในสัดส่วนที่มากกว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ linear epitopes ในการตอบสนองต่อโปรตีนในโครงสร้างธรรมชาติ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เตรียม recombinant protein ให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคที่ใช้โปรตีนในโครงสร้างธรรมชาติเป็นแอนติเจน แต่ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่ายังมีปัญหาใน ระดับความบริสุทธิ์ของโปรตีน เนื่องจากมีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนของ *E. coli* ทำให้มีปัญหาในการตรวจวัด จึงอาจเป็นไปได้ถ้าสามารถเตรียมโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์สูง และนำมาศึกษาโดยวิธีที่ใช้แอนติเจนในโครงสร้างธรรมชาติ เช่น latex agglutination หรือ immunochromatography ผลการศึกษาอาจมีความแตกต่างจากการศึกษานี้ เพราะผล Western blot พบว่าในสภาวะ non-denaturing gel จะพบความแรงในการทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยได้ดีกว่าในสภาวะ denaturing gel เนื่องจากผลการศึกษาในเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าโปรตีนจากโคลน PHE 191 ให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะสูงกว่าวิธี IHA จึงน่าจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูว่าโปรตีนนี้มีศักยภาพที่จะนำไปปรับปรุงและพัฒนาเป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคmelioidosis ได้ในอนาคตหรือไม่

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอพระคุณผู้ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ โดยได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จากศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และงานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูงตร โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## เอกสารอ้างอิง

1. Dance DA. Melioidosis: the tip of the iceberg?. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 52-60.
2. Dance DA, King C, Aucken H, Knott C.D, West P.G. An outbreak of melioidosis in imported primates in Britain. Vet Rec 1992; 130: 525-9.
3. Desmarcheleir PM, Dance DA, Chawagul W, Suputtamongkol Y, White NJ, Pitt TL. Relationships among *Pseudomonas pseudomallei* isolates from patients with recurrent melioidosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 1592-6.
4. Wongprompitak P, Thepthai C, Songsivilai S, Dharakul T. *Burkholderia pseudomallei*-specific recombinant protein and its potential in the diagnosis of melioidosis. Asian Pac J Allergy Immunol 2001; 19: 37-41.
5. Sirisinha S, Anuntagool N, Dharakul T, Ekpo P, Wongratanacheewin S, Naigowit P, et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. Acta Trop 2000; 74: 235-45.
6. Petkanjanapong V, Naigowit P, Kondo E, Kanai K. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (melioidosis). Asian Pac J Allergy Immunol 1992; 10: 145-50.

7. Ismail G, Embi MN, Omar O, Allen JC, Smith CL. A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. J Clin Microbiol 1987; 23: 353-7.
8. Anuntagool N, Rugdech P, Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 1232-6.
9. Sambrook J, Russell DW. Screening Expression Libraries. Molecular Cloning 2001; 3: 14.1 - 50.
10. Jongruamklang P. Evaluation of the diagnostic utility of the recombinant LipL32 protein for leptospirosis. M.Sc. Thesis, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University. 2004: 31-5.
11. Promsiripaiboon Y. Construction of a panC mutant of *Burkholderia pseudomallei* and its potential as a vaccine candidate in a mouse model. M.Sc. Thesis, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University. 2006: 43-4.
12. อมร อุ่นเจริญ. คู่มือปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา. หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2542: 13-4.
13. Gravel P, Golaz O. Protein Blotting by the Semidry Method. Springer protocols 1996; 1: 249-60.
14. Dharakul T, Songsivilai S, Anuntagool N, Chaowagul W, Wongbunnate S, Intachote P, et al. Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 418-23.
15. Rugdech P. Identification of specific antigen of *Pseudomonas pseudomallei* and monoclonal antibody production for the diagnosis of melioidosis. M.Sc. Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University. 1993: 11.
16. Janeway CA, Travers P, Walport M. Immunity Mediated by B cells and antibodies. The immune system 2005; 2: 181-225.