

การใช้ประโยชน์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อเบอร์โคลเดเรีย สโตมาเลีย

ดาราวรรณ รินชัย^{1,2*}, อรุณลักษณ์ อุดตานนท์², กาญจนา เลิศมิ่งมงคลชัย²

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) เป็นเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคmelioidosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่พบการแพร่ระบาดมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย การรักษาผู้ป่วยโรคmelioidosisที่ติดเชื้อในกระแสเลือดจำเป็นต้องอาศัยความรวดเร็วในการวินิจฉัย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคmelioidosis จากการศึกษาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มด้วยเทคนิค enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) พบว่าแอนติบอดีที่ศึกษาเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียอื่นในระดับต่ำ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถแยกได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. pseudomallei* นอกจากนี้พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยาได้กับตัวอย่างเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 24 isolates เมื่อประเมินความสามารถของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาแอนติเจนจากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนที่ปล่อยออกจากตัวเชื้อจำนวน 1.5×10^4 cfu/ml ได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบผลของแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจ (U937-derived macrophages) ของเชื้อ *B. pseudomallei* และพบว่าในสถานะที่มีแอนติบอดีนั้น ส่งผลให้เชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีแอนติบอดี อย่างไรก็ตามจากผลดังกล่าวยังต้องมีการศึกษาถึงกลไกที่แท้จริงต่อไป ผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* น่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการวินิจฉัยและการศึกษากลไกการก่อโรคต่อไป

คำสำคัญ : โพลีโคลนอลแอนติบอดี, *Burkholderia pseudomallei*, ELISA

บทนำ

โรคmelioidosis เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งมีพื้นที่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย การติดเชื้อในกระแสเลือดของโรคmelioidosis เป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเสียชีวิตของประชากร

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพบอัตราการเสียชีวิตที่สูงมาก (ร้อยละ 50 ในผู้ใหญ่และ ร้อยละ 35 ในเด็ก)⁽¹⁾ สาเหตุสำคัญที่ทำให้อัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อค่อนข้างสูงเป็นเพราะต้องใช้เวลานานในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วและถูกต้อง การวินิจฉัย

¹ นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Utility of polyclonal antibodies binding to specific epitopes of *Burkholderia pseudomallei*

Darawan Rinchai^{1,2*}, Aroonlug Lulitanond², Ganjana Lertmemongkolchai²

Abstract

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) is a major causative agent of melioidosis in endemic areas such as Southeast Asia and Northern Australia. Rapid diagnosis is required for appropriate treatments in septicemic melioidosis. In this study, we aimed to evaluate the specific polyclonal antibody (pAb) to *B. pseudomallei* for potentially use in the development of diagnostic assays and pathogenesis studies. In determination the cross reaction of the pAb to other bacteria by indirect ELISA, the pAb to *B. pseudomallei* has no cross-reactivity with other bacteria. In contrast, the pAb reacted with 24 clinical isolates of *B. pseudomallei*-extracted antigens. By ELISA, the pAb to *B. pseudomallei* could be used to detect secreted antigens in 3 hour culture supernatants of 1.5×10^4 cfu/ml *B. pseudomallei*. In addition, opsonization of the bacteria with the pAbs could enhance bacterial internalization by U937-derived macrophages when compared with bacterial culture alone. The mechanism of these observations, however, needs to be further investigated. In conclusion, we suggest that the pAbs to *B. pseudomallei* can be potentially used for development of diagnosis method and pathogenesis study.

Key words: Polyclonal antibody, *Burkholderia pseudomallei*, ELISA

ที่ได้ผลแน่นอน คือ การตรวจทางจุลชีววิทยา โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจแล้วพิสูจน์เชื้อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งต้องใช้เวลาในการทดสอบนานถึง 2-3 วัน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งอาจจะเป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีหรือแอนติเจน การตรวจหาแอนติบอดีในพื้นที่ระบาดนั้นใช้วิธี indirect haemagglutination assay (IHA) ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนรวมของเชื้อ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว

และความจำเพาะค่อนข้างต่ำ (ร้อยละ 56)⁽¹⁾ เนื่องจากประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดมักจะมีประวัติการเคยสัมผัสเชื้อ *B. pseudomallei* หรือเชื้อแบคทีเรียอื่นทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาแล้ว ทำให้มีระดับแอนติบอดีที่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ จึงเป็นปัญหาในการวินิจฉัยโรคmelioidosis⁽²⁾ การตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) จำเป็นต้องอาศัยแอนติเจนที่บริสุทธิ์และมีความ

¹Graduate School, Faculty of Associated Medical Sciences, ²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

* Corresponding author (e-mail: rawan112002@yahoo.com)

จำเพาะเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM หรือ IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามปัญหาในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG นั้น ไม่สามารถที่จะแยกผู้ป่วยว่าเป็นการติดเชื้อ ณ ปัจจุบันหรือเคยได้รับการติดเชื้อมาก่อน เนื่องจากผู้ที่เคยติดเชื้อมาก่อนก็จะมีแอนติบอดีต่อ *B. pseudomallei* ชนิด IgG อยู่ในกระแสเลือดโดยที่แอนติบอดีนี้อาจจะมีอายุอยู่ได้นานกว่า 5 ปี⁽³⁾ สำหรับปัญหาในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีควมไวในการตรวจต่ำมาก หลังจากผู้ป่วยเคยมีการติดเชื้อครั้งแรกที่ไม่แสดงอาการ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพัฒนาเพื่อที่จะหาแอนติบอดีที่เหมาะสมและมีความจำเพาะเพื่อที่จะใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้ออย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพยายามที่จะผลิตโมโนโคลนอลหรือโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงเพื่อที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาและผลิตชุดการตรวจวินิจฉัยที่มีความถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้นเพื่อนำมาใช้ทดแทนการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบัน เช่น การตรวจหา exotoxin ในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี ELISA, การตรวจหาโปรตีนที่ปล่อยออกมาจากตัวเชื้อ⁽⁴⁾ โดยการใช้โมโนโคลนอลต่อส่วนผนังเซลล์ของเชื้อ⁽⁵⁾ เช่น LPS⁽⁶⁾, 30 kDa protein⁽⁷⁾ และส่วนของ exopolysaccharide⁽⁸⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาแอนติบอดีเพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการรักษาโรคmelioidosis โดยวิธีใดก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดที่การศึกษาส่วนใหญ่ยังเป็นเพียงการใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีต่อส่วนประกอบภายนอกของแบคทีเรียหรือต่อส่วนที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาคูณลักษณะของแอนติบอดีนั้นๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาคูณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อศึกษาศักยภาพในการใช้ประโยชน์เพื่อการวินิจฉัยและการศึกษากลไกที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการก่อโรค เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาการวินิจฉัยและการรักษา หรือแม้แต่เพื่อการพัฒนาเป็นวัคซีนในการป้องกันโรคmelioidosis

วัสดุและวิธีการศึกษา

แอนติเจน

1. แอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* (extracted antigens) จำนวน 24 isolates ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น septicemic melioidosis

จากการเพาะเชื้อในหน่วยจุลชีววิทยาคลินิกโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น⁽⁹⁾

2. แอนติเจนของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดสำหรับใช้ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (whole killed cells) จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *B. pseudomallei* K96243 สำหรับใช้เป็นเชื้อควบคุม, *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobria* และ β -*Streptococcus spp* โดยทำการเพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วย 10% paraformaldehyde ปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.4)

3. แอนติเจนสกัดของเชื้อ *B. pseudomallei* (crude extracted antigens) ใช้วิธี veronal buffer extract⁽¹⁰⁾

แอนติบอดี

1. Mouse polyclonal anti-*B. pseudomallei* ซึ่งเตรียมมาจากการฉีดกระตุ้นหนู BALB/C ด้วย crude extracted antigens ของเชื้อ *B. pseudomallei*⁽¹⁰⁾

2. Rabbit polyclonal anti-*B. pseudomallei* ซึ่งเตรียมมาจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย crude extract antigen ของเชื้อ *B. pseudomallei* จากการศึกษาของอรุณรัฐ ร่มพฤกษ์ และคณะ⁽¹⁰⁾

การศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ polyclonal anti-*B. pseudomallei* antibody โดยวิธี Indirect ELISA

ใช้แอนติเจนชนิดทั้งตัวของเชื้อ *B. pseudomallei* หรือเชื้อแบคทีเรีย (whole killed cells) ที่แยกได้จากผู้ป่วยmelioidosis และเชื้อแบคทีเรียอื่นที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด ได้แก่ *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobria* และ β -*Streptococcus spp* ปรับเชื้อให้ได้ปริมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) เติมนลงในเพลท ELISA ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง หรือ 4 องศาเซลเซียส แช่เย็น จากนั้น block ด้วย 5% skimmed milk อบที่ อุณหภูมิห้อง 60 นาที แล้วทดสอบปฏิกิริยากับ mouse polyclonal anti-*B. pseudomallei* antibody ที่เจือจางใน PBS ที่มี 0.05% Tween20 โดยมี culture medium เป็น negative control อบที่ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที จากนั้นเติม alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse IgG เจือจาง 1: 4000 อบที่ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที เติม p-nitrophenyl phosphate เป็น substrate เป็น เวลา 45 นาที อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย เครื่อง ELISA reader (Sunrise, Tecan, Crailsheim, Germany)

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมส่วนใสสำหรับการตรวจวัด แอนติเจนของ เชื้อ *B. pseudomallei*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (LB broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดย เริ่มต้นความเข้มข้นของจำนวนเชื้อต่าง ๆ กัน อบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนเชื้อ แบคทีเรียด้วยเทคนิคการนับโคโลนี⁽¹¹⁾ พร้อมทั้งปั่นเก็บส่วน ใสของเชื้อเพื่อนำไปตรวจหาแอนติเจนด้วยเทคนิค Sandwich ELISA ต่อไป ซึ่งเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับ เชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีชีวิตจะถูกทำการทดลองภายในห้อง biosafety level 3 ทุกการทดลอง

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *B. pseudomallei* โดย วิธี Sandwich ELISA

ใช้ Rabbit polyclonal anti-*B. pseudomallei* antibody ที่ความเข้มข้น 1:1000 ใน 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) เติมนลงในเพลท ELISA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง หรือ 4 องศาเซลเซียส แช่เย็น จากนั้น block ด้วย 5% skimmed milk อบที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที แล้วทดสอบปฏิกิริยากับ crude extracted antigens ของ *B. pseudomallei* เพื่อเป็น positive control หรือส่วนใสของน้ำเลี้ยงเพาะเลี้ยงเชื้อที่ เจือจาง ใน PBS ที่มี 0.05% Tween20 โดยมี culture medium เป็น negative control อบที่ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที จากนั้นเติม 1:1000 ของ mouse polyclonal anti-*B. pseudomallei* antibody ที่เจือจางใน PBS ที่มี 0.05% Tween20 ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร อบที่ 37 องศา

เซลเซียส 90 นาที จากนั้นเติม alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse IgG เจือจาง 1: 4000 อบ ที่ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที เติม p-nitrophenyl phosphate เป็น substrate เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลที่ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Sunrise, Tecan, Crailsheim, Germany)

การเตรียมเซลล์แมคโครฟาจจาก U937 cell line

เตรียมเซลล์แมคโครฟาจโดยใช้ monocyte cell line (U937) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium ซึ่งมี 10% fetal bovine serum อยู่ จากนั้นกระตุ้น U937 ด้วย PMA ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ U937-derived macrophages⁽¹²⁾ จากนั้นล้าง PMA ออกเพื่อพักเซลล์เป็น เวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ให้ได้ จำนวน 4×10^5 เซลล์/หลุมของเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ ทิ้งไว้ให้เซลล์ เกาะเพลทอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อใช้สำหรับทำ Cell invasion assay ต่อไป

การศึกษาผลของแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์แมคโคร- ฟาจ ของเชื้อ *B. pseudomallei*

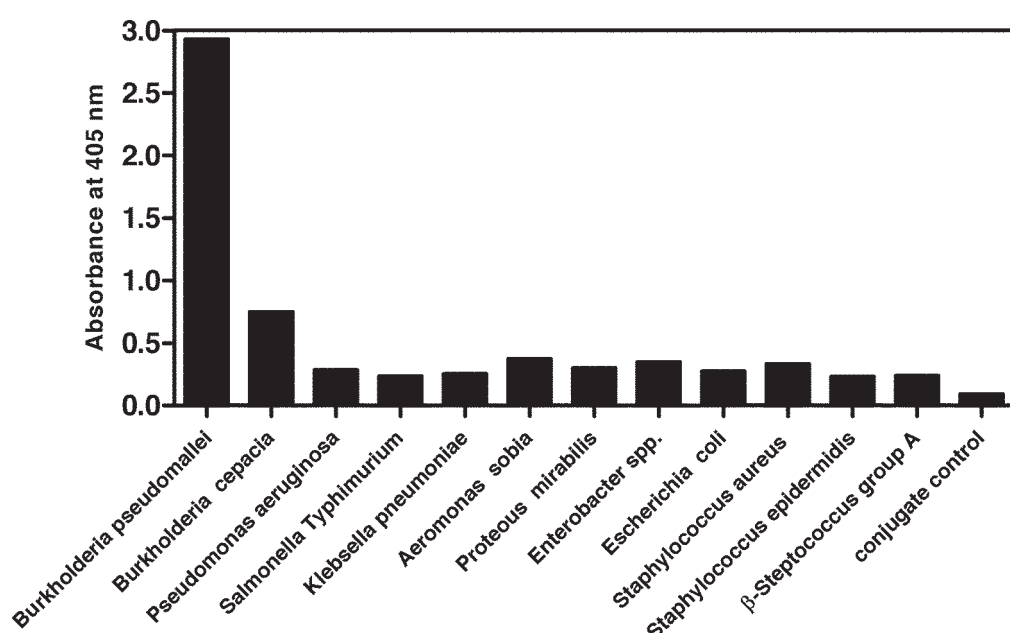
นำเชื้อ *B. pseudomallei* มาผสมกับโพลีโคลนอล แอนติบอดี (pAb) ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* (Bps), แอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* (Ec) ที่เจือจาง 1: 1000 และ สภาวะที่ไม่มีแอนติบอดี อบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นใช้ 500 ไมโครลิตร มาทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ แมคโครฟาจ (U937-derived macrophages) จำนวน 4×10^5 เซลล์/หลุมของเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยปรับจำนวน เชื้อ *B. pseudomallei* ให้ได้ Multiplicity of Infection (MOI) เท่ากับ 1, 3, 10 หรือ 30 อบที่ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง แบคทีเรียภายนอกเซลล์ออก 2 ครั้ง ด้วย PBS และฆ่าเชื้อ แบคทีเรียที่อยู่ภายนอกเซลล์ด้วยยา kanamycin (Gibco, Invitrogen corporation, USA) ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อบที่ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะทำการ ตรวจการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ (U937-derived macrophages) โดยการย้อมด้วยสี trypan blue และ ทำการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์โดยใช้ 1% triton X-100 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5

นาที่ เพื่อให้ผนังเซลล์แตก หลังจากนั้นหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB agar) ทำการนับแบคทีเรียที่อยู่ภายในเซลล์ด้วยเทคนิคการนับโคโลนี⁽¹¹⁾

ผลการศึกษา

จากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ *B. pseudomallei* กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งได้แก่ *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus*

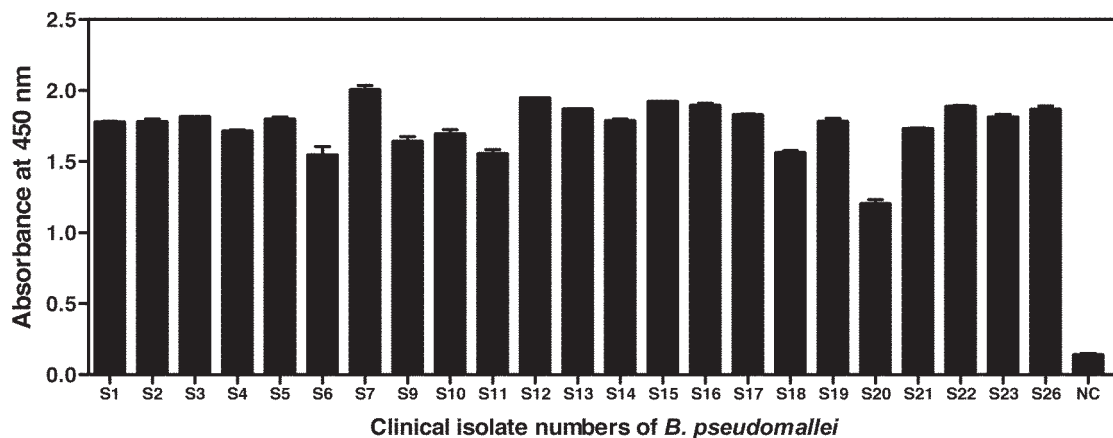
mirabilis, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobia* และ β -streptococcus spp นั้นไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาศึกษา ยกเว้นการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *Burkholderia cepacia* ในระดับต่ำๆ (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นสามารถแยกได้อย่างชัดเจนระหว่างปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับตัวเชื้อ *B. pseudomallei* กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น



รูปที่ 1 การศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ *B. pseudomallei* กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดด้วยวิธี indirect ELISA

จากการศึกษาความสามารถของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวัดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดจำนวน 24 isolates โดยวิธี indirect ELISA พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี

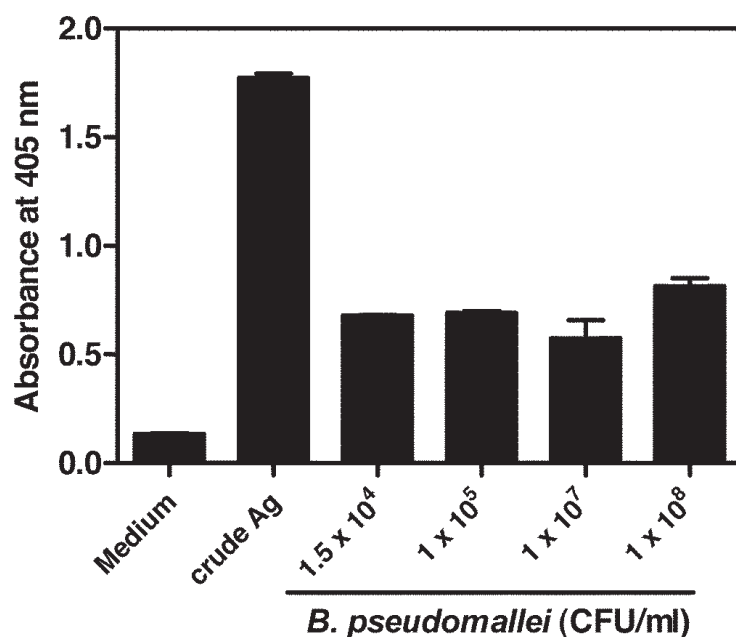
สามารถจับกับเชื้อได้ทุกตัวโดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีระดับที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในเชื้อหมายเลข S20 ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะต่ำกว่าในตัวอย่างอื่นๆ ดังแสดงใน รูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงความสามารถของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวัดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ติดเชื้ในกระแสเลือดจำนวน 24 isolates โดยวิธี indirect ELISA

จากการศึกษาความสามารถของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจนสำหรับการวินิจฉัย ซึ่งได้ทำการตรวจวัดในส่วนใสของน้ำ

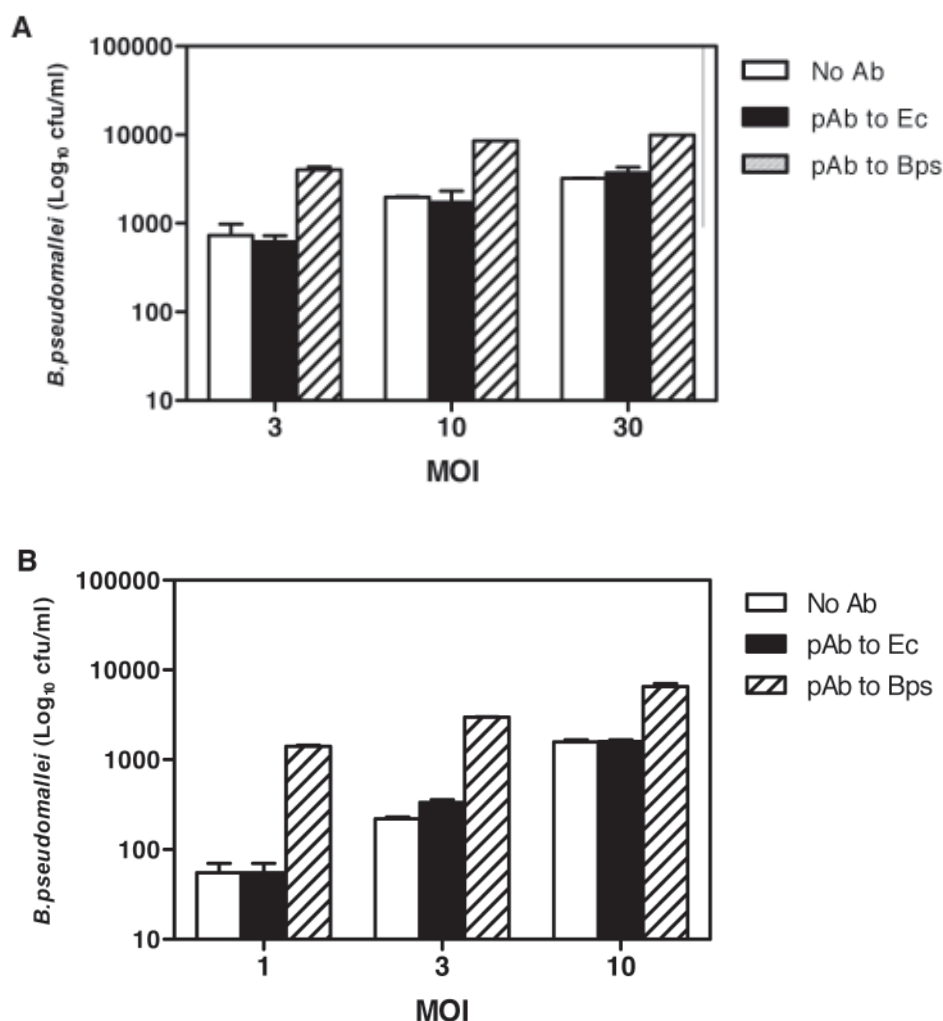
เลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถตรวจแอนติเจนที่ปล่อยออกมาจากตัวเชื้อน้อยที่สุดคือ 1.5×10^4 cfu/ml (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงความสามารถของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวัดแอนติเจนที่ถูกปล่อยออกมาจากตัวเชื้อ *B. pseudomallei* ในส่วนใสของน้ำเลี้ยงที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยวิธี Sandwich ELISA โดยมี 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตรของ crude extracted antigen of *B. pseudomallei* (crude Ag) ใช้เป็น positive control และ medium สำหรับ negative control

จากการศึกษาผลของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจ (U937-derived macrophages) ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเทคนิค Cell invasion assay พบว่าในสถานะที่มีโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* ภายในเซลล์แมโครฟาจในปริมาณที่

มากกว่าในสถานะที่ไม่มีแอนติบอดีหรือสถานะที่มีโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* และไม่พบความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียภายในเซลล์ระหว่างสถานะที่ไม่มีและมีแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* ดัง **รูปที่ 4**



รูปที่ 4 A: ผลการศึกษาผลของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจ (U937-derived macrophages) ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเทคนิค Cell invasion assay โดยนำเชื้อ *B. pseudomallei* มาผสมกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี (pAb) ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* (Bps), แอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* (Ec) ที่เจือจาง 1: 1000 และสถานะที่ไม่มีแอนติบอดี จากนั้นเพาะเลี้ยงร่วมกับแมโครฟาจ (U937-derived macrophages) ที่ MOI เท่ากับ 3, 10 และ 30 B: ผลการศึกษาผลของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจ (U937-derived macrophages) ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเทคนิค Cell invasion assay โดยนำเชื้อ *B. pseudomallei* มาผสมกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี (pAb) ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* (Bps), แอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* (Ec) ที่เจือจาง 1: 1000 และสถานะที่ไม่มีแอนติบอดี จากนั้นเพาะเลี้ยงร่วมกับแมโครฟาจ (U937-derived macrophages) ที่ MOI เท่ากับ 1, 3 และ 10

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาประโยชน์ของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ผลการศึกษาที่ได้ในการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี โดยการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด ได้แก่ *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobria* and β -*Streptococcus spp* ซึ่งไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ แต่พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในระดับต่ำกับเชื้อ *Burkholderia cepacia* ซึ่งเป็นเชื้อ species ที่มีความใกล้เคียงกันมากกับเชื้อ *B. pseudomallei* อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถแยกได้อย่างชัดเจนระหว่างปฏิกิริยากับตัวเชื้อ *B. pseudomallei* กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดได้ และนอกจากนี้ผลทำการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดจำนวน 24 isolates แสดงให้เห็นว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับเชื้อได้ทุกตัวอย่างโดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีระดับที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในเชื้อหมายเลข S20 ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะต่ำกว่าในตัวอย่างอื่นๆ (รูปที่ 2) ผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากความเสื่อมสภาพของเชื้อหมายเลข S20 จากการเก็บที่ไม่เหมาะสม เพื่อยืนยันสมมติฐานนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยวิธี western blotting assay พบว่า S20 มีการเสื่อมสภาพของโปรตีนเมื่อเทียบกับเชื้อตัวอย่างอื่นที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากัน ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถจับได้กับเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วยที่แตกต่างกันได้

การศึกษานี้ยังได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีสถานะเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเชื้อ (hemoculture) ซึ่งผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื่อนั้น พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถตรวจวัดแอนติเจนที่

ปล่อยออกมาจากตัวเชื้อในจำนวนน้อยที่สุดคือ 1.5×10^4 cfu/ml จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Anantagool และคณะ ในปี พ.ศ. 2543 ซึ่งได้ทำการตรวจวินิจฉัยแอนติเจนของเชื้อ จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ทำการปั่นแยกส่วนใสโดยวิธี latex agglutination โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนขนาด 200 kDa ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งสามารถตรวจจำนวนแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาคือ $1-2 \times 10^6$ cfu/ml⁽¹³⁾ การศึกษานี้ยังพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีผลทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจได้มากขึ้น ในขณะที่สถานะที่มีโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *E. coli* นั้นไม่มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของแอนติบอดีในการส่งเสริมเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ ดังรูปที่ 4 ซึ่งการศึกษานี้ให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Ho และคณะ ในปี พ.ศ. 2540 พบว่าในสถานะที่ทำการ opsonization เชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยซีรัมของผู้ป่วยเมลิออยโดสิสหรือสถานะที่มีโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นทำให้แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ polymorphonuclear leukocyte เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ในสถานะที่มีคอมพลีเมนต์นั้นพบว่าเซลล์ polymorphonuclear leukocyte มีความสามารถในการฆ่าแบคทีเรียได้เพิ่มมากยิ่งขึ้น⁽¹⁴⁾ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจจะส่งเสริมการฆ่าเชื้อโดยเซลล์ polymorphonuclear leukocyte ซึ่งในการศึกษานี้ได้แสดงเพียงผลของแอนติบอดีต่อการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *B. pseudomallei* อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษากลไกการเข้าสู่เซลล์และผลของแอนติบอดีต่อการฆ่าเชื้อหรือการนำไปสู่การส่งเสริมการเกิดพยาธิสภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Peacock SJ. Melioidosis. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 421-8.
2. Anuntagool N, Intachote P, Wuthiekanun V, White NJ, Sirisinha S. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* isolates is immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara- clinical isolates. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 225-9.
3. 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.
4. Mathew S, Perakath B, Mathew G, Sitaram V, Nair A, Lalitha MK, et al. Surgical presentation of melioidosis in India. *Natl Med J India* 1999; 12:59-61.
5. Wongratanacheewin S, Tattawasart U, Lulitanond V, Wongwajana S, Sermswan RW, Sookpranee M, et al. Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993; 24: 107-13.
6. Dharakul T, Songsivilai S, Smithikarn S, Thepthai C, Leelaporn A. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by latex agglutination using lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 658-62.
7. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30:536-55.
8. Steinmetz I, Reganzerowski A, Brenneke B, Haussler S, Simpson A, White NJ. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 225-8.
9. ผกากรอง โพธิ์วรรณ, พวงผกา สาดี, กาญจนา เลิศมีมงคลชัย. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* antigen by avidin-biotin modified double antibody sandwich ELISA and indirect immunofluorescent assay. *ภาคนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (คณะเทคนิคการแพทย์)*. 2536: 8-10.
10. อรุณรัตน์ ร่มพฤกษ์, ศรีวิไล วโรภาสตระกูล, ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์, กาญจนา เลิศมีมงคลชัย, วิภาวดี แมนมนตรี, สุนทร กัณหาสุระ. Experimental immunization of mice with crude extract antigens and whole organisms of *Pseudomonas pseudomallei*. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2533; 2: 36-41.
11. Ekchariyawat P, Pudla S, Limposuwan K, Arjcharoen S, Sirisinha S, Utaisinchaoen P. *Burkholderia pseudomallei*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 and cytokine-inducible src homology 2-containing protein in mouse macrophages: a possible mechanism for suppression of the response to gamma interferon stimulation. *Infect Immun* 2005; 73: 7332-9.
12. Lee TJ, Kim YH, Min do S, Park JW, Kwon TK. Se-methylselenocysteine enhances PMA-mediated CD11c expression via phospholipase D1 activation in U937 cells. *Immunobiology* 2006; 211: 369-76.
13. Anuntagool N, Naigowit P, Petkanchanapong V, Aramsri P, Panichakul T, Sirisinha S. Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia. *J Med Microbiol* 2000; 49: 1075-8.
14. Ho M, Schollaardt T, Smith MD, Perry MB, Brett PJ, Chaowagul W, et al. Specificity and functional activity of anti-*Burkholderia pseudomallei* polysaccharide antibodies. *Infect Immun* 1997; 65: 3648-53.