ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียกรัมลบ อยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae พบอยู่ได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ สิ่งปฏิกูล คนและสัตว์ ชนิดที่ก่อโรคในคนจะมีลักษณะเป็นการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) ของผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ ซึ่งจะพบมากในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โลหิตเป็นพิษ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ การติดเชื้อในแผลน้ำร้อนรวกหรือไฟลวก หนองฝีต่างๆ ตาอักเสบ (Pollack, 1995) โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. aeruginosa* นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดและเจริญได้ในน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิดที่ใช้แช่เครื่องมือเครื่องใช้ของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยเกิดเป็นโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และพบบ่อยในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพติดต่อกันเป็นเวลานานหรือยาที่ใช้ในการกดภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย

P. aeruginosa มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคหรือ virulence factor อยู่หลายชนิด เช่น pili, exotoxin, pigment, mucoid exopolysaccharide (biofilm) เป็นต้น ซึ่ง biofilm เป็นสารที่ยึดให้แบคทีเรียเกาะติดกับผิวดิน น้ำ พืช ผัก และ epithelial cell ของสัตว์และคน และเป็นการช่วยให้เชื้อคงอยู่ในสภาพที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ โดยช่วยป้องกันแบคทีเรียจากการถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหลายอย่าง เช่น แอนติบอดี, macrophage, surfactant, ยาต้านจุลชีพ (antibiotic) เป็นต้น สารประเภท exopolysaccharide นี้มีประจุบวกซึ่งสามารถรวมตัวกับยาต้านจุลชีพและทำให้ยาต้านจุลชีพเข้าสู่แบคทีเรียได้น้อยลง ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาตามมา (De Klevit *et al.*, 2001) และยังมีรายงานว่าphage ของ *P. aeruginosa* สามารถลดปริมาณของ exopolysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ biofilm ได้ในระหว่างการติดเชื้อ (Hanlon, 2001)

จากปัญหาของการดื้อยาหลายชนิดของ *P. aeruginosa* ที่ส่งผลเป็นอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการนำยาต้านจุลชีพมาทำการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อด้วยแบคทีเรียดังกล่าว ทำให้ต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาหาความรู้หรือวิธีการอื่นๆที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัด ควบคุม หรือลดปริมาณของ *P. aeruginosa* ให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถก่อโรคได้ ซึ่งการใช้ phage ในการรักษาโรค หรือ phage therapy เป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย เนื่องจาก phage หรือ bacteriophage จัดเป็นไวรัสที่สามารถติดเชื้อและทำลายแบคทีเรียได้ เช่น lytic phage จะเข้าไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและทำลายแบคทีเรียโดยการทำให้เซลล์แตกและมีการปล่อยอนุภาคไวรัสใหม่ๆออกมาเพื่อไปติดเชื้อในเซลล์ใหม่ต่อไป และ phage ส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่อยู่ในระดับ species เดียวกันเท่านั้น และได้มีการค้นพบ phage หลายชนิดที่ก่อการติดเชื้อใน *P. aeruginosa*

ชนิดของ phage

Phage แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะการติดเชื้อในแบคทีเรียคือ (พิไลพันธ์, 2540)

1. Virulent phage หรือ lytic phage หมายถึง phage ที่มีการติดเชื้อแบบ lytic ได้เพียงแบบเดียว การติดเชื้อแบบนี้จะมีการเพิ่มจำนวน phage เกิดขึ้นภายในเซลล์และทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย phage ที่เข้าสู่ lytic infection เรียกว่า vegetative phage และเรียกวงจรชีวิตที่มีการเพิ่มจำนวนของ phage ว่า vegetative growth cycle

2. Temperate phage หรือ lysogenic phage หมายถึง phage ที่ก่อการติดเชื้อในแบคทีเรียแล้ว อาจเข้าสู่ vegetative growth cycle ทำให้เกิด lytic infection หรืออาจเข้าสู่ prophage cycle เกิด lysogenic infection โดยมีการแทรกยีโนมของ phage เข้าไปรวมกับยีโนมของแบคทีเรียโดยไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย การที่ phage จะอยู่ในสภาพ lytic infection หรือ lysogenic infection ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะของเซลล์แบคทีเรีย ส่วนใหญ่แล้ว temperate phage จะมียีโนมเป็น DNA สายคู่เสมอ และ phage มากกว่าร้อยละ 90 ที่มีการค้นพบจัดเป็น temperate phage

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้ phage (phage therapy)

การศึกษาทางด้าน phage therapy ได้เริ่มมาตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ.1900 เป็นต้นมา โดยได้มีการศึกษาและพบว่า phage นั้นสามารถนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อด้วยแบคทีเรียได้ (Alisky *et al.*, 1998: Barrow *et al.*, 1997) แต่ข้อมูลที่ถูกบันทึกไว้เป็นภาษาอังกฤษนับว่ามีน้อยมาก เนื่องจากการวิจัยส่วนใหญ่อยู่ในแถบกลุ่มประเทศรัสเซีย และเป็นช่วงเวลาที่การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นที่นิยมและการศึกษากันมากกว่าในแถบประเทศยุโรปและอเมริกา (Sulakvelidze *et al.*, 2001)

ในปี ค.ศ. 1980 ได้มีการเริ่มต้นศึกษาทางด้าน phage therapy เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในคน และสัตว์ ซึ่งมีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ไม่มีการทำลายแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่นของ host เนื่องจาก phage มีความจำเพาะสูงต่อการทำลายชนิดของแบคทีเรีย มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็วหลังจากเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นต้น นอกจากนี้ ปรากฏการณ์ที่แบคทีเรียหลายชนิดมีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะก็มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

Hagens *et al.* (2004) พบว่า phage สามารถลดจำนวนแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่ติดเชื้อในหนูทดลองได้ และสามารถลดปริมาณสารพิษ (toxin) ของแบคทีเรียและลดอาการอักเสบของหนูได้ ได้มีการศึกษาถึงความสามารถในการทำลายแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของ *E. coli* phage (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004) จากการใส่ *E. coli* phage โดยการฉีดโดยเข้าไปโดยตรงในปาก (*in vitro*) ของหนู

ทดลองหรือใช้ *E. coli* phage ละลายในน้ำดื่ม (*in vivo*) และพบว่า lytic phage สามารถทำลาย *E. coli* สายพันธุ์ ที่ใส่เข้าไปหนูทดลองแต่ไม่มีผลต่อ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ของหนูทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความมีเสถียรภาพ (stability) ของโครงสร้างอนุภาคของ phage ในน้ำดื่มที่ยังคงความสามารถในการติดเชื้อ (biological function) และความจำเพาะในการทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ นอกจากการใช้อนุภาคของ phage โดยตรงแล้ว Jado *et al.* (2003) ได้แสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ lysozyme และ amidase ที่ผลิตจาก phage ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์แล้วฉีดเข้าไปในหนูทดลอง สามารถป้องกันหนูจากการติดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ได้ โดยการทำลายโปรตีนของแบคทีเรีย Westwater *et al.* (2003) ยังได้แสดงให้เห็นว่ายีโนมของ phage สามารถทำหน้าที่เป็นพาหะในการนำยีนของสารพิษ (toxic gene) เข้าไปในเซลล์และทำลายแบคทีเรียได้ จากรายงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงว่า phage สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อได้ทั้งในสภาพที่เป็นอนุภาคของ phage โดยตรงหรือองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนหรือยีโนมของ phage

นอกจากการประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อในคนแล้ว การใช้ phage therapy เพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียของสัตว์น้ำนั้นก็มีผู้ที่ให้ความสนใจกันมาก เนื่องจากปัญหาของการสะสมของสารเคมีและยาต้านจุลชีพ ในสัตว์น้ำที่อาจส่งผลต่อผู้บริโภคและความพยายามในการลดปริมาณของสารเคมีที่มีราคาแพง จากรายงานของ Nakai และ Park (2002) ได้ทำการทดลองการรักษาโรคหางเหลืองในปลาที่ติดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *Lactococcus gravieae* หรือ *Pseudomonas plecoplossicida* พบว่าจากการฉีด phage แต่ละชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อเข้าไปทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของปลาที่ติดเชื้อโรค จะช่วยลดอัตราการตายของปลาได้ 50% และจากการใช้ phage 2 ชนิดร่วมกันทำให้สามารถเพิ่มการยับยั้งเชื้อได้ดีเพิ่มขึ้นเป็น 75%

การทำ plaque assay

การตรวจหาปริมาณ phage ที่มีอยู่ในสารละลายนิยมใช้วิธีที่เรียกว่า plaque assay ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถบอกจำนวนของ phage และลักษณะของ plaque ที่เกิดขึ้นก็สามารถบ่งชี้ถึงคุณสมบัติในการทำลายชนิดของโดยมีหลักการดังนี้ ถ้าทำการผสมแบคทีเรียจำนวน 10^8 เซลล์กับวุ้นอ่อน (soft agar) แล้วเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวุ้นแข็ง (agar plate) แบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนจนติดกันเป็นแผ่นสีขาวขุ่น (lawn of bacteria) และถ้าผสมสารละลายของ phage กับแบคทีเรียที่ไวต่อ phage นั้นแล้วปล่อยให้มีการเกาะติดระหว่าง phage กับแบคทีเรียระยะหนึ่ง จากนั้นผสมกับวุ้นอ่อนแล้วเทลงบน agar plate จะพบว่าแบคทีเรียที่มีการเจริญตามปกติจะเกิดเป็นแผ่นสีขาวขุ่น แต่เซลล์ที่ติดเชื้อด้วย phage จะมีการเพิ่มจำนวนของ phage ในเซลล์แบคทีเรียจนกระทั่งเซลล์แตก phage

progenies จะออกไปติดเชื้อข้างเคียงโดยรอบ เกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งต่อมากลุ่มเซลล์เหล่านี้จะแตกสลายจึงเห็นเป็นจุดกลมใสอยู่บนแผ่นแบคทีเรีย ซึ่งเรียกว่า plaque โดย 1 plaque จะเกิดจาก phage จำนวน 1 อนุภาค ดังนั้นจะสามารถคำนวณหาจำนวน phage ที่อยู่ในสารละลายนั้นได้เป็นหน่วยเป็น plaque forming unit ต่อสารละลาย 1 ml (PFU/ml) ซึ่งการอ่านค่าที่ยอมรับได้จะอ่านจากจานทดสอบที่มี plaque เป็นจำนวน 30-300 PFU/ml (http://www.blc.arizona.edu)

เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการแยก lytic phage 1 ชนิด (PA phage) จากตัวอย่างน้ำที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จึงต้องการนำ PA phage มาทดสอบด้วยวิธี plaque assay ถึงความสามารถในการทำลายแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่แยกจากผู้ป่วยติดเชื้อในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณวนัสนันทน์ ธัญญพาณิชย์) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำ PA phage ไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรค *P. aeruginosa* ต่อไปในอนาคต