บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณสมบัติ

P. pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่สร้างสปอร์ โคโลนีมีลักษณะขอบเรียบจะเริ่มย่นและแห้งเมื่อเพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 2-3 วัน สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลไม่ละลายน้ำ มีกลิ่นคล้ายสารประกอบอินทรีย์อะโรมาติก (aromatic compound) ถ้าเลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar จะสลายเม็ดเลือดแดงได้บางส่วน (partial hemolysis) เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย polar flagella ไม่สร้างแคปซูล มีค่าองค์ประกอบของผลรวมกวานีนและไซโตซีนเท่ากับ 70% (5)

แอนติเจนที่พบใน *P. pseudomallei* มี 4 ชนิด คือ envelope antigen (K) soluble antigen, flagellar antigen และ somatic antigen (17)

กลไกการก่อโรค

ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการก่อโรคของ *P. pseudomallei* เข้าใจว่าปัจจัยหลายอย่างมีบทบาทในการก่อโรค เช่น ปริมาณเชื้อที่ได้รับ ภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายและที่สำคัญคือ ธรรมชาติของตัวเชื้อตลอดจนสารพิษที่ตัวเชื้อสร้าง (18) Dannenberg และคณะ (19) ได้ศึกษาความรุนแรงของ *P. pseudomallei* ในการก่อโรคในสัตว์ทดลองโดยเหนี่ยวนำให้เกิด pulmonary melioidosis ใน mice และ hamster ในรายที่เกิด acute infection ผลปรากฏว่าจะตรวจไม่พบรอยโรค (lesion) แต่จะพบ nodules และภาวะเลือดออกในปอด ในรายที่เกิด chronic infection จะเกิดฝีหนอง (abscess) และ granulated tissue Dannenberg สันนิษฐานว่าสิ่งที่ทำให้เกิดรอยโรคและทำให้สัตว์ทดลองตายน่าจะเป็นสารพิษ exotoxin หรือ endotoxin Nigg และ Liu (10,20) ได้ตรวจสอบหาสารพิษในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) ของ *P. pseudomallei* พบว่าสิ่งที่ทำให้เกิด necrosis ที่ผิวหนังของหนูตะเภา คือ heat-labile toxin และ necrotoxin Heckly (8) ศึกษาคุณสมบัติของ lethal toxin และ proteolytic enzyme ที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. pseudomallei* พบว่าพิษของสารทั้งสองชนิดถูกทำลายด้วยความร้อน สารประเภทกรดและด่างและสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เมื่อตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาพบว่าสารทั้งสองแตกต่างกัน Rapaport และคณะ (21) ศึกษา endotoxin จาก *P. pseudomallei* พบว่าทำให้เกิดภาวะ haemorrhagic necrosis ในสัตว์ทดลองและเป็นสารที่ทนความร้อน Ashdown และคณะ (9) ทดสอบหาโปรตีนและเอนไซม์ที่คาดว่ามีบทบาทในการก่อโรคจาก *P. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 100 สายพันธุ์ พบ lecithinase และ hemolysin 97 สายพันธุ์ lipase 96 สายพันธุ์

และ protease 94 สายพันธุ์

Hemolysin

Hemolysin คือ extracellular protein ที่แบคทีเรียหลายชนิดสร้างขึ้นสามารถทำลายเม็ดเลือดแดงและ differentiated eucaryotic cells (12) Hemolysin ที่แบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างเป็น thiol-activated hemolysin มีคุณสมบัติเป็น lethal toxin และ cardiotoxin มีอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานใกล้เคียงกัน สามารถสลายเม็ดเลือดแดงของสัตว์หลายชนิด ตัวอย่างของ hemolysin ในกลุ่มนี้คือ streptolysin O, pneumolysin tetanolysin , perfringolysin , cereolysin และ listeriolysin (15) แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Haemophilus pleuropneumoniae* สามารถสร้าง heat-stable hemolysin (22) ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* สร้าง hemolysin 2 ชนิด คือ heat-stable glycolipid และ heat-labile hemolysin ทราบเป็นที่แน่ชัดแล้วว่า heat-labile hemolysin คือเอนไซม์ phospholipase C ซึ่งจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ alkaline phosphatase ย่อยสลาย phospholipid ที่เป็นองค์ประกอบของ eucaryotic cell ให้ได้ inorganic phosphate (23) *Proteus mirabilis* สร้าง hemolysin 2 ชนิด คือ Ca^{2+} -dependent hemolysin และ Ca^{2+}-independent hemolysin (24)

Hemolysin ของ *Pseudomonas pseudomallei*

Ashdown และคณะ (9) ศึกษา hemolysin จาก *P. pseudomallei* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่าเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ จะสร้าง hemolysin ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ heat-stable hemolysin สลายเม็ดเลือดแดงแบบ α - hemolysis แต่ให้ hemolytic activity ต่ำ สังเกตเห็นได้เฉพาะกรณีที่โคโลนีของ *P. pseudomallei* รวมอยู่เป็นกลุ่มหนาแน่นบน blood agar Hemolysin อีกชนิดหนึ่งคือ heat-labile hemolysin ให้ hemolytic activity สูงกว่า hemolysin ชนิดแรก สลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-hemolysis เช่นเดียวกับชนิดแรกแต่สามารถเห็นลักษณะการสลายเม็ดเลือดแดงได้ชัดเจนจากโคโลนีเดี่ยว ๆ เมื่อศึกษาคุณสมบัติของ heat-labile hemolysin พบว่าจะให้ activity สูงในภาวะกรด คือ pH 5.5 สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้หลายชนิดแต่สลายเม็ดเลือดแดงของคนได้ดีที่สุด ถูกยับยั้ง activity ด้วยสารเคมีพวก sterol และ cholesterol

ผลของประจุต่อ hemolysin

Hemolytic activity ของแบคทีเรีย เช่น *E. coli* (25) ขึ้นกับองค์ประกอบหลายอย่างโดยเฉพาะประจุบวก พบว่า Ca^{2+} ช่วยเพิ่ม hemolytic activity เช่นเดียวกับ Mg^{2+} และ divalent cation อื่น ๆ ได้แก่ Mn^{2+} Co^{2+} Ni^{2+} และ Zn^{2+} เข้าใจว่าประจุเหล่านี้เป็นตัวเร่งให้เกิดการสร้าง polymer ของ hemolysin ขณะทำลายเซลล์เป้าหมาย (26)

ปัจจัยที่มีผลต่อ activity ของ hemolysin

อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เกิด hemolysis อยู่ในช่วง 25 °ซ ถึง 37 °ซ เข้าใจว่าช่วงอุณหภูมิดังกล่าวจะช่วยรักษาเสถียรภาพของโมเลกุลและองค์ประกอบของ hemolysin แต่ถ้าลดอุณหภูมิลงถึงช่วง 5°ซ ถึง 15°ซ พบว่า hemolytic activity จะลดลง นอกจากอุณหภูมิแล้วความเป็นกรดด่างและความเข้มข้นของ hemolysin ก็มีผลต่อ hemolytic activity

Phospholipase A2 และ phospholipase C สามารถทำลายฤทธิ์ hemolysin ของ *E. coli* ได้อย่างรวดเร็ว (27) สำหรับ thiol-activated hemolysin จะถูกยับยั้งด้วย cholesterol และ sterol (15)

บทบาทของ hemolysin ในการก่อโรค

Hemolysin มีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรคมากมายหลายด้าน แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ส่วนใหญ่มี hemolytic activity ยกตัวอย่างเช่น *E. coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคนอกระบบทางเดินอาหาร และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดมี hemolytic activity มากกว่า 50% ขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็น normal flora มี hemolytic activity ต่ำกว่า 12% (13) *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะสร้าง hemolysin (14) เช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ คือ *Aeromonas hydrophila* (31) และ *Streptococcus faecalis* (32)

Hacker และคณะ (33) สามารถพิสูจน์ยืนยันได้ว่า hemolysin gene (hly gene) มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มระดับความเป็นพิษ (toxicity) ในหนูขาว (NMRI mice) โดยคัดเลือก *E. coli* mutant ที่มีความบกพร่องของ hemolysin gene แล้ว transform ด้วย recombinant plasmid ที่มี hemolysin gene เมื่อนำ transformed *E. coli* นั้นมาฉีดหนูทดลองพบว่าเปอร์เซนต์ของหนูที่ตายสูงขึ้นกว่าเมื่อฉีดด้วย *E. coli* mutant เดิม แสดงให้เห็นว่า hemolysin gene สามารถเพิ่มระดับความเป็นพิษให้ *E. coli* ทำให้เปอร์เซนต์ของหนูตายสูงขึ้น นอกจากนี้ hemolysin gene

ยังสามารถเพิ่มความรุนแรงของการก่อโรคให้กับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่มี hemolytic activity โดยเหนี่ยวนำให้สร้าง hemolysin และทำให้เปอร์เซนต์ของหนูตายเพิ่มขึ้น (14) ใน *Listeria monocytogenes* กลุ่มที่สร้าง hemolysin สามารถอาศัยใน macrophage หลบรอดจากการทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (16) เช่นเดียวกับในกรณีของ *Proteus mirabilis* ที่ได้ทำการพิสูจน์แล้วว่า hemolysin มีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการบุกรุกเซล (invasion) (35) นอกจากนี้ Kume และคณะ (36) ได้แยกเอา hemolysin จาก *H. pleuropneumoniae* มาศึกษาพบว่าสามารถทำลาย polymorphonuclear cell และยับยั้งความสามารถในการจับกินเซล (phagocytosis) ของ polymorphonuclear cell บทบาทของ hemolysin ในด้านอื่นเช่นกรณีของ *Proteus mirabilis* พบว่า hemolysin เป็นตัวช่วยเสริมให้ adhesin สามารถเกาะกับผิว urinary epithelial cell ได้ดีขึ้น (37)

<u>กลไกการทำลายเม็ดเลือดแดงของ hemolysin</u>

การทำลายเม็ดเลือดแดงของ hemolysin เกิดจาก hemolysin รวมตัวกับไขมันและน้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลเป้าหมายแล้วทำให้เกิดรูขนาด 5–20 nm กลายเป็น transmembrane pore หรือ membrane attack complex (MAC) ผังลงไปในเซลเม็ดเลือดแดงทำให้ภาวะสมดุลย์ของระบบ colloid-osmotic pressure เสียไปเซลเม็ดเลือดแดงจึงแตก ในกรณีของ *E. coli* พบว่าเกิด transmembrane pore ขนาด 3 nm (25,26) กลไกการทำลายเซลเม็ดเลือดแดงของ *Streptococcus* group D เกี่ยวข้องกับ O_2^- และ H_2O_2 โดย O_2^- และ H_2O_2 จะรวมตัวกับ hemoglobin ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง แล้วทำให้เกิด lytic agent เป็นผลให้เม็ดเลือดแดงแตกสลาย (38)

<u>การศึกษา hemolysin โดย recombinant DNA technique</u>

การศึกษา hemolysin โดยใช้ recombinant DNA technique เพื่อช่วยเตรียม hemolysin ที่บริสุทธิ์เป็นจำนวนมากในเวลาอันสั้นและเมื่อนำไปใช้ศึกษาโดยสัตว์ทดลอง (animal model) จะทำให้สามารถอธิบายบทบาทและหน้าที่ของ hemolysin ในการก่อโรคต่อไปในอนาคต ปัจจุบันได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มทำการศึกษา hemolysin โดยใช้ recombinant DNA techniques อย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษา hemolysin ของ *E. coli* , *A. hydrophila* และ *P. aeruginosa*

Hemolysin ของ *E. coli* (12,27,36,40,41,42,43,44)

Hemolysin gene (hly gene) ของ *E. coli* พบทั้งที่โครโมโซมและพลาสมิด (28) เมื่อศึกษา hemolysin ของ *E. coli* ที่ทำให้เกิดการดัดเชื้อทางเดินปัสสาวะโดยการโคลน (clone) hemolysin gene ที่คาดว่าอยู่บนโครโมโซมลงใน pACYC184 และสับโคลน (subclone) ลงในพลาสมิด จากนั้นนำไปหาแผนที่ของยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) พบว่า hly gene มีความยาว 8,217 bp แยกเป็น 4 citrons คือ hly C hly A hly B (hly Ba) hly D (hly Bb) ตามลำดับ (12,40,41,42) และอีกสองส่วน คือ promotor ของ hly C hly A hly B และ promotor ของ hly D

Wagner และคณะ (12,40,43) ศึกษาองค์ประกอบและหน้าที่ของ hemolysin gene พบว่า hly C และ hly A ทำหน้าที่สังเคราะห์และขนส่ง hemolysin ออกสู่เซลล์ เว้นบางครั้งอาจพบว่า *E. coli* บางสายพันธุ์ไม่มี hemolytic activity เนื่องจากมีความผิดปกติหรือขาดยีนบางส่วนที่ควบคุมการส่งผ่าน hemolysin ออกสู่ cytoplasmic membrane และ outer membrane; Precursor ของ hemolysin มีขนาด 106,000 daltons เมื่อผ่านขบวนการส่งผ่านจะมีขนาดเฉลี่ย คือ 30,000 ถึง 90,000 daltons และเมื่อออกนอกเซลล์จะมีขนาด 58,000 daltons

มีผู้รายงานว่าพบ hemolysin gene อยู่บนพลาสมิดด้วยแต่ hemolysin gene ที่พบบนพลาสมิดจะต่างจากที่พบบนโครโมโซม ตรงที่มี insertion sequence (IS) อยู่ทั้งสองข้างของ hemolysin gene ในขณะที่ไม่พบในโครโมโซมแต่อย่างไรก็ตาม hemolysin gene ทั้งสองชนิดมี homology สูงในด้านโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์ (44)

Aerolysin (hemolysin) ของ *Aeromonas hydrophila*

การศึกษา aerolysin จาก *A. hydrophila* ทำโดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ hemolytic activity จาก blood agar ทำการโคลนยีนและทำแผนที่ของยีน (genetic mapping) และทำให้กลายพันธุ์โดยอาศัย transposon (transposon mutagenesis) พบว่าประกอบด้วยยีน 3 cistrons คือ aer A aer B และ aer C สร้างโปรตีน aerolysin ขนาด 54,000 daltons เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Maxicell analysis และ Immunoblotting (27)

Lior และคณะ (45) นำเอาเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหา aerolysin gene จาก *Aeromonas spp.* ต่าง ๆ เพื่อแยก *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่ผลิต aerolysin ออกจาก hemolytic *A. sorbia*, non-hemolytic, *A. hydrophila* และ *A. caviae*

Hemolysin ของ *Proteus mirabilis*

UPhoff และคณะ (24) ทำการโคลน Ca^{2+}-independent hemolysin gene ของ *P. mirabilis* สายพันธุ์ 477-12 โดยใช้พลาสมิด pUC19 จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าประกอบด้วยเบส 7,191 เบส แบ่งเป็น 2 cistrons คือ hpm A และ hpm B สร้างสายโพลีเปปไทด์ขนาด 166,000 daltons และ 63,000 daltons ตามลำดับส่วนที่เป็น terminator sequence พบว่าเป็นชนิด rho-independent transcriptional terminator

Pneumolysin (hemolysin) ของ *Streptococcus pneumoniae*

Walker และคณะ(46) ศึกษา pneumolysin gene ของ *S. pneumoniae* ซีโรไทพ์ II (NCTC 7466) โดยการโคลนโครโมโซม ขนาด 4-6 kb ใน bacteriophage จากนั้นทำการโคลนและสับโคลน pneumolysin gene ลงในพลาสมิด pBR322 และ pUC18 แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าประกอบด้วยเบสทั้งหมด 1,650 เบส มียีนที่รับผิดชอบสร้างโพลีเปปไทด์ 2 ยีน ได้สายโพลีเปปไทด์ขนาด 56,000 daltons และ 53,000 daltons.

Hemolysin ของ *Pseudomonas aeruginosa*

Vasil และคณะ (23) ศึกษา hemolysin ของ *P. aeruginosa* PAO1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่สร้าง heat-labile hemolysin หรือ phospholipase C โดยโคลนชิ้นดีเอนเอจากโครโมโซมของ PAO1 ในพลาสมิด pBR322 คัดเลือก transformant ที่ให้ phospholipase activity จากนั้นนำยีนไปทำแผนที่ของเอ็นไซม์ (restriction map) และลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ พบว่า ประกอบด้วย 3,000 bp เมื่อวิเคราะห์โดย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าสร้างสายโพลีเปปไทด์ขนาด 78,000 daltons สำหรับกลไกการสังเคราะห์และการควบคุมการทำงานยังอยู่ในขั้นทดลองศึกษา