การศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันจากเชื้อแบคทีเรียซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย โดยใช้โมเดลหนูทดลอง

Study of acute gastroenteritis pathogenesis from clinical-isolated *Salmonella enterica* Typhimurium strains in a mouse model

พินิจพงศ์ สริชัย[1] ทรงพล พุทธศิริ[2] บรรยง คันธวะ[3]
ทัตตวรรณ แก้วสาคร[4] ปารเมศ เทียนนิมิตร[5]

บทคัดย่อ

เชื้อซาลโมเนลลา เอนเทอริกา เซโรวา ไทฟิมูเรียม (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันในทางเดินอาหาร ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาใช้หนูทดลองในการศึกษาเพื่อดูความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาพยาธิกำเนิดของเชื้อซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (STMC) ในประเทศไทย งานวิจัยนี้ใช้ซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวนสามสายพันธุ์ในโมเดลหนูทดลอง (mouse colitis model) และทำการเก็บตัวอย่างลำไส้ใหญ่และม้ามของหนูทดลองเพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อและดูการแสดงออกของยีนสื่ออักเสบและยีนที่แสดงออกถึงความแข็งแรงของชั้นเยื่อบุทางเดินอาหาร พบว่าเชื้อซาลโมเนลลาสายพันธุ์ STMC นั้นทำให้เกิดพยาธิสภาพในหนูทดลองได้น้อยกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน (IR715) พบปริมาณของเชื้อภายในทางเดินอาหาร (colon colonization) ในม้าม (systemic dissemination) และการแสดงออกของยีนสื่ออักเสบ *Kc* ภายในทางเดินอาหารที่มีน้อยกว่าหนูทดลองที่ติดเชื้อซาลโมเนลลาสายพันธุ์มาตรฐาน ดังนั้นการใช้โมเดลหนูทดลองกับ STMC สามารถทำได้ แต่ต้องคำนึงว่าสายพันธุ์ STMC จากไทยนั้นก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่น้อยกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน

คำสำคัญ: ซัลโมเนลโลซิส, ซัลโมเนลลา เอนเทอริกา เซโรวา ไทฟิมูเรียม, ความสามารถในการกำเนิดพยาธิของซัลโมเนลลา, โมเดลหนูทดลองลำไส้อักเสบ

[1] นักศึกษา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อีเมล์ phinitphong.s@gmail.com

[2] นักศึกษา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อีเมล์ song.auan@gmail.com

[3] หัวหน้างานปฏิบัติการกลางและชันสูตรโรค โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อีเมล์ banyongkhantawa@gmail.com

[4] อาจารย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อีเมล์ thattawan@gmail.com

[5] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อีเมล์ parameth@gmail.com

Abstract

Salmonella enterica serovar Typhimurium (STM) is a gram-negative bacterium and causes acute gastroenteritis. Several studies using a mouse model for *Salmonella* Typhimurium pathogenicity. However, every study using the laboratory strain not from clinical-isolated in Thailand. In this study three *Salmonella* clinical-isolated (STMC) strains have been randomly selected from enteritis patients. The animal study used a streptomycin-pretreated mouse colitis model. Mouse colon and spleen were collected for enumerated bacterial numbers and gene expression *e.g.* inflammatory signal and gut integrity. The tested STMC strains showed less pathogenicity compared to the STM IR715 in a mouse colitis model. The Bacterial colonization in colon and systemic dissemination to spleen showed less than compared to the STM IR715, it also showed the same way in gene expression of *Kc* in colon of a mouse. Mouse colitis model could be used as pathogenicity model for STMC strains in Thailand but needs to concern the less pathogenicity of STMC compared to IR715

Keywords: non-typhoidal salmonellosis, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella* pathogenicity, mouse colitis model

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ซัลโมเนลลา เอนเทอริกา เซโรวา ไทฟิมูเรียม (*S.* Typhimurium) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถก่อโรคซัลโมเนลโลซิสชนิดไม่ใช่ไทฟอยด์ โดยเชื้อนี้สามารถพบการระบาดและก่อโรคได้ในหลายพื้นที่ทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทยซึ่งเป็นปัญหาในภาคอุตสาหกรรมและสาธารณสุข (Kiratisin, Apisarnthanarak, Laesripa, & Saifon, 2008; Whistler et al., 2018) เชื้อซาลโมเนลลาสามารถทำให้เกิดการอักเสบอย่างเฉียบพลันในลำไส้ใหญ่ และส่งผลให้เกิดอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีไข้สูง หรือที่เรียกว่าอาหารเป็นพิษ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติจะสามารถหายได้เองจากการรักษาแบบประคับประคอง แต่หากเป็นผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วย Human immunodeficiency virus (HIV) ผู้ป่วยโรคเรื้อรังต่าง ๆ เป็นต้น การติดเชื้ออาจรุนแรงถึงขั้นติดเชื้อในกระแสเลือดและอาจส่งผลถึงชีวิต (Gordon et al., 2002; Thamlikitkul, Dhiraputra, Paisarnsinsup, & Chareandee, 1996) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการติดเชื้อในผู้ป่วยแต่ละกลุ่มจะมีความรุนแรงที่แตกต่างกันออกไป

กลไกทางพยาธิกำเนิดของเชื้อ *S.* Typhimurium จะก่อโรคโดยการรุกรานเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และจะถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (Macrophage) และนิวโทรฟิล (Neutrophil) ในบริเวณลำไส้ใหญ่ ซึ่งเชื้อมีความสามารถในการหลบหนีการกำจัดเชื้อในเซลล์แมคโครฟาจส่งผลให้เชื้อหลบซ่อนอยู่ในเม็ดเลือดขาวและรุกรานเข้าสู่อวัยวะที่สำคัญได้เช่น ตับ และ ม้าม เป็นต้น (Barthel et al., 2003; Everest, Roberts, & Dougan, 1998) ซึ่งการรุกรานของเชื้อเข้าสู่บริเวณของลำไส้ใหญ่และก็รุกรานไปถึงเนื้อเยื่อภายในจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนยึดเหนี่ยว (tight junction protein) ที่บริเวณลำไส้ ยกตัวอย่างเช่นการแสดงออกของยีน C-X-C motif ligand 1 (*CXCL-1*) ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำนิวโทรฟิล (chemoattractant) จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและ ยีน Zonula occludens-1 (*Zo-1*) ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกของโปรตีนไทต์จังก์ชัน (tight junction protein) จะมีการแสดงออกที่ลดลง (Hapfelmeier et al., 2005; Whistler et al., 2018)

การศึกษาพยาธิกำเนิดของซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมได้มีการศึกษามาอย่างแพร่หลายเป็นจำนวนมากทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในหนูทดลอง (*in vivo*) อย่างไรก็ตามการศึกษาซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมจะเป็นการนำเชื้อที่เป็นตัวมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ อย่างเช่น SL1344 LT2 IR715 มาทดสอบ (Barthel et al., 2003; Deriu et al., 2013; García-Quintanilla & Casadesús, 2011; Sassone-Corsi et al., 2016) ซึ่งไม่ใช่ซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการจะทดสอบความสามารถของเชื้อซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยในรพ.มหาราชนครเชียงใหม่ว่ามีความสามารถก่อพยาธิกำเนิดได้มากน้อยเพียงใด โดยการใช้โมเดลหนูทดลองลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (Barthel et al., 2003; Tsolis, Xavier, Santos, & Bäumler, 2011) และจะทำการเปรียบเทียบกับความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดของเชื้อซาลโมเนลลาสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ IR715 โดยจะทำการศึกษาการรุกรานของเชื้อสู่ลำไส้ใหญ่และการรุกรานไปยังอวัยวะอื่นได้แก่ ม้าม รวมถึงดูการแสดงออกของยีน Keratinocyte chemoattractant (*Kc)* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกของโปรตีนเรียกเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil chemoattractant) มายังบริเวณที่มีการอักเสบในหนูทดลองเช่นเดียวกับ *CXCL-1* (Whistler et al., 2018) และดูการแสดงออกของยีน Zonula occludens-1 (*Zo-1*) ที่เป็น tight junction protein (Hapfelmeier et al., 2005)

ซึ่งการนำตัวอย่างเชื้อซาลโมเนลลาไทฟิมูเรียมที่คัดแยกจากผู้ป่วยมาทดสอบความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดในโมเดลหนูทดลองไม่เคยมีการศึกษามาก่อนและสามารถนำมาต่อยอดการศึกษาวิจัยเชื้อซาลโมเนลลาในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทำการศึกษาความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดของเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม ที่แยกได้จากผู้ป่วยในรพ.มหาราชนครเชียงใหม่ช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 มาทดสอบในหนูทดลองโมเดลลำไส้อักเสบเฉียบพลันเปรียบเทียบกับเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม สายพันธุ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการ IR715

วิธีดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ (Bacterial strains)

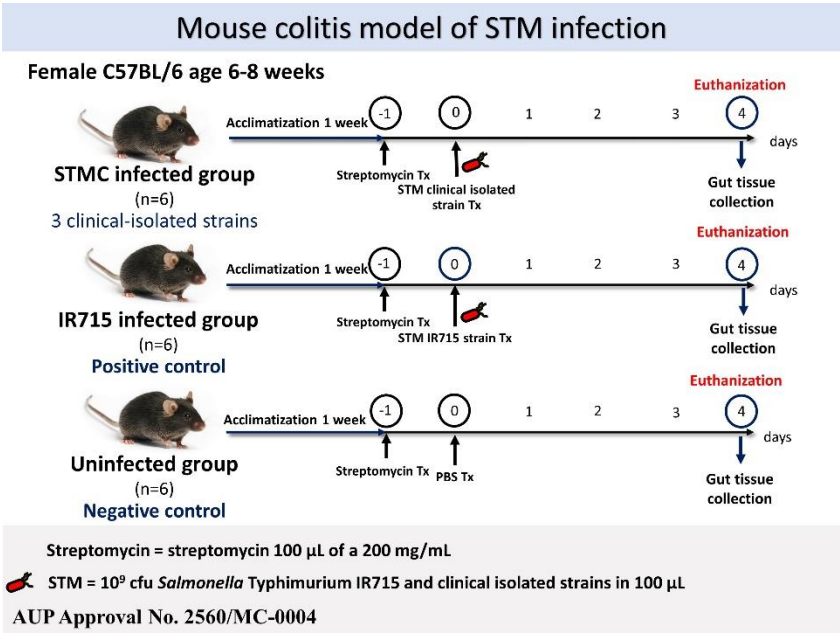
ซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมที่แยกได้จากผู้ป่วยสามคนที่มีภาวะท้องร่วงเฉียบพลันจาก รพ.มหาราชนครเชียงใหม่ ช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 ถูกเลือกมาอย่างสุ่มได้แก่ STMC12 STMC19 และ STMC56 จะนำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อกำเนิดพยาธิในหนูทดลอง เปรียบเทียบกับตัวมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ IR715 โดยเชื้อซาลโมเนลลาที่แยกจากผู้ป่วยจะมีการดื้อยา carbenicillin และ streptomycin ส่วนเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจะดื้อยา nalidixic acid และ streptomycin ดังนั้น จึงนำเชื้อมาเจริญบน LB agar (15 g/L agar) ที่มี carbenicillin (0.1 mg/mL) และ nalidixic acid (0.05 mg/mL) เพื่อใช้ในหนูทดลองต่อไป

การศึกษาในสัตว์ทดลอง (Animal study)

หนูทดลองในการศึกษานี้จะใช้หนูสายพันธุ์ C57BL/6 อายุ 6-8 สัปดาห์ ซึ่งได้รับมาจากบริษัทโนมุระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ตั้งอยู่ที่ กรุงเทพฯ ประเทศไทย หนูทุกตัวจะได้รับการเลี้ยงภายใต้ระบบห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลองความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2 (ABSL2) ซึ่งจะถูกเลี้ยงภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 25°C ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงและให้มืด 12 ชั่วโมงตามวงจรชีวิตหนูรวมถึงได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ตลอดการทดลอง หนูทดลองจะได้รับยาปฏิชีวนะ streptomycin ปริมาณ 100 μL จากความเข้มข้นของยา 200 mg/mL (streptomycin sulfate, Sigma Aldrich©, Lot Number 5K013479) หลังจากนั้น 1 วันจึงให้หนูรับเชื้อซาลโมเนลลาที่เตรียมไว้ด้วยการกิน

10^9 cfu ของซาลโมเนลลา IR715 STMC12 STMC19 และ STMC56 ใน 100 µL phosphate buffered saline (PBS) ในแต่ละกลุ่ม (หนู 6 ตัวต่อกลุ่ม) จากนั้น 4 วันหลังการติดเชื้อจึงทำการการุณยฆาตหนูทดลองและเก็บตัวอย่างอวัยวะหนูทดลองเพื่อมาทำการศึกษาอื่น ๆ ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 1 การทดลองนี้ได้รับอนุญาตตามมาตรฐาน Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) หมายเลข Approval No. 2560/MC-0004

รูปที่ 1 แสดงวิธีดำเนินการทดลองในหนูทดลองโมเดลลำไส้อักเสบเฉียบพลัน



การตรวจวัดปริมาณโคโลนีแบคทีเรีย (Determination of Bacterial Colonization by Colony Forming Unit (cfu) Count)

การตรวจวัดปริมาณเชื้อซาลโมเนลลาจะนำอวัยวะหนูทดลองที่เก็บได้แก่ ลำไส้ใหญ่ และ ม้าม ของหนูทดลองมาทำการเลี้ยงเจริญแบคทีเรียบนเพลทด้วยวิธีการนำเนื้อเยื่อที่ถูกเก็บใน PBS มาทำการชั่งน้ำหนักก่อนและหลังเก็บชิ้นเนื้อและทำการแตกเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย PBS ด้วยเม็ดบีดขนาด 1.0 มม. 2 นาที (Biospec Products, Bartlesville, USA) จากนั้นจึงทำการเจือจางความเข้มข้นลงสิบเท่า (ten-fold dilution) และทำการเพลทลงบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ Nalidixic acid สำหรับ IR715 และ Carbenicillin สำหรับ STMC 12 19 และ 56 จากนั้นนำเพลทไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อได้ผลโคโลนีจะนำปริมาณแบคทีเรียที่ได้มาคำนวณเทียบกับน้ำหนักของเนื้อเยื่ออีกครั้ง

การวัดการแสดงออกของยีนด้วย Quantitative Real- Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

การวัดการแสดงออกของยีนจะนำเนื้อเยื่อหนูทดลองที่เก็บไว้ในสาร RNA preservation solution (RNAstore reagent, TIANGEN, China) มาทำการแตกเซลล์ด้วยเม็ดบีดขนาด 1.0 มม. 2 นาที (Biospec Products, Bartlesville, USA) และทำการสกัด RNA ด้วย TRIzol reagent (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) โดยปฏิบัติตามคู่มือการสกัดของ TRIzol reagent เมื่อทำการสกัดเสร็จจึงทำการกำจัด DNA ด้วยชุด DNase treatment (Ambion, Life technologies, Vilnius, Lithuania) ตามคู่มือของชุดปฏิบัติการ จากนั้นจึงทำการแปลง

RNA เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุด cDNA synthesis kit (Bioline, Taunton, MA, USA) สุดท้ายจึงทำการวัดปริมาณของยีนจาก cDNA โดยใช้น้ำยา SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX Kit (Bioline, Taunton, MA, USA) และเครื่อง Viia7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) ในการเพิ่มปริมาณและอ่านผล จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบ cycle threshold (comparative Ct method) กับ *Gapdh* ซึ่งเป็น housekeeping gene (Thiennimitr et al., 2011) โดย primer ที่ใช้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้ในการดูปริมาณการแสดงออกของยีนด้วย qRT-PCR

Organism	Target gene/ purpose	Sequence	Encoded	Reference
Mouse (*Mus musculus*)	*Gapdh*	5'-TGCACCCAAACCGAAGTCAT-3' 5'-TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC-3'	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	(Whistler et al., 2018)
	Kc	5'-TGCACCCAAACCGAAGTCAT-3' 5'-TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC-3'	Growth-regulated alpha protein	
	Zo-1	5'-CAGGGCTCTTTGGAGGAA-3' 5'-TACACGATCGTGGCAATAAAC-3'	Tight junction protein ZO-1	(Hapfelmeier et al., 2005)

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

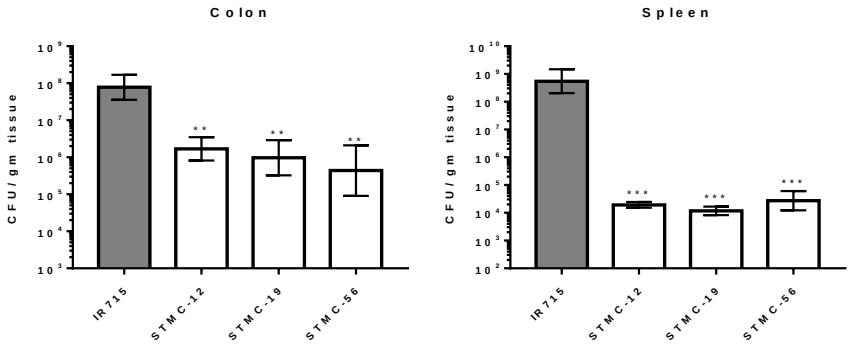
การวิเคราะห์ทางสถิติจากการดูปริมาณโคโลนีแบคทีเรียและปริมาณการแสดงออกของ RNA จะแปลงข้อมูลเป็นลอการิทึม (logarithm) และทำการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ one-way ANOVA เพื่อดูความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มและคำนวณเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มด้วย T test เพื่อหากลุ่มที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า *p*-value เท่ากับ * ** และ *** แสดงค่า *p*-values < 0.05 0.01 และ 0.001

สรุปผลการวิจัย

ซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม มีพยาธิกำเนิดลำไส้อักเสบในหนูแตกต่างกัน

ผลจากการนำเชื้อซาลโมเนลลา สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคในหนูทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มสายพันธุ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการพบว่าพยาธิกำเนิดจะมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อครบวันที่ 4 หลังให้เชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม จะพบปริมาณซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีการรุกรานเข้าสู่ลำไส้ใหญ่น้อยกว่าสายพันธุ์ IR715 และเมื่อตรวจสอบการรุกรานของเชื้อไปยังม้ามพบว่าซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยก็จะมีปริมาณที่รุกรานไปยังม้ามน้อยกว่าสายพันธุ์ IR715 เช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนั้น จะเห็นได้ว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับเชื้อซาลโมเนลลาสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยจะมีการติดเชื้อเข้าสู่อวัยวะในปริมาณที่น้อยกว่าสายพันธุ์มาตรฐานในขณะที่หนูที่ได้รับสายพันธุ์ IR715 จะมีปริมาณเชื้อรุกรานในอวัยวะของหนูมากกว่า

รูปที่ 2 แสดงปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่และม้ามในหนูทดลอง

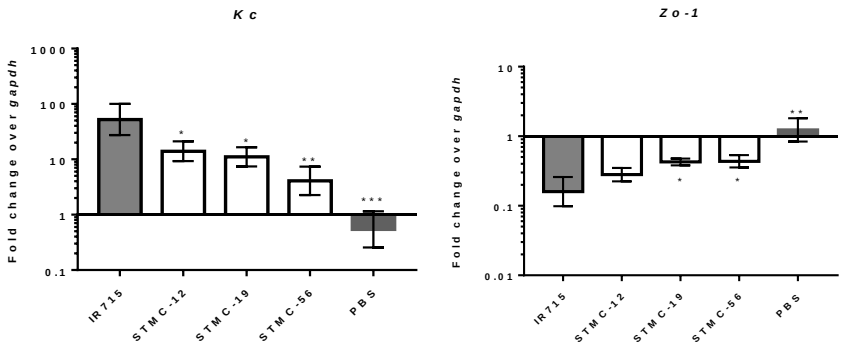


รูปที่ 2 แสดงปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่และม้ามของหนูทดลอง โดยแสดงปริมาณเป็น CFU/gm tissue ในแต่ละกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับซาลโมเนลลาต่างชนิดกัน โดยเปรียบเทียบกับ STM IR715 และแสดงค่า error bar เป็นแบบ geometric means ± S.E.M. มีค่านัยสำคัญ $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ และ $***P < 0.001$.

ซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนโฮสต์แตกต่างกัน

ผลจากการติดเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมที่แตกต่างกันพบว่าในลำไส้หนูทดลองมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันโดยพบว่าการแสดงออกของยีน *Kc* ที่จะแปลงเป็นโปรตีน chemoattractant ในหนูกลุ่มที่ได้รับซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม สายพันธุ์ IR715 จะมีการแสดงออกของยีน *Kc* ที่สูงกว่าหนูที่ได้รับสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกกลุ่ม รวมถึงพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม IR715 มีการแสดงออกของยีน *Zo-1* ซึ่งจะแปลงเป็นโปรตีน tight junction ลดลงน้อยกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม ที่แยกได้จากผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม STMC-19 และ STMC-56 ในขณะที่ STMC-12 พบการลดลงการแสดงออกของยีน *Zo-1* เท่ากับหนูกลุ่มที่ได้รับ IR715 ในขณะเดียวกันพบว่าหากเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ PBS จะพบว่ามีการแสดงออกของยีน *Zo-1* ที่สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 3 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน *Kc* และ *Zo-1* ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง



รูปที่ 3 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีนในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง โดยแสดงปริมาณเป็น Fold change over *Gapdh* ในแต่ละกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับซาลโมเนลลาต่างชนิดกัน โดยเปรียบเทียบกับ STM IR715 และแสดงค่า error bar เป็นแบบ geometric means ± S.E.M. มีค่านัยสำคัญ $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ และ $***P < 0.001$.

อภิปรายผล

เชื้อซาลโมเนลลา เอนเทอริกา เซโรวา ไทฟิมูเรียม เป็นเชื้อที่ก่อโรคทางเดินอาหารให้เกิดภาวะลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่สามารถพบได้ทั่วโลก โดยพบว่าเชื้อมีความสามารถในการทำให้เกิดการเสียชีวิตได้มากถึง 700,000 คนต่อปี จากการที่เชื้อมีความสามารถในการรุกรานเข้าสู่อวัยวะภายในและส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (Kirk et al., 2015; Majowicz et al., 2010) ซึ่งที่ผ่านมาพบว่าเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม มีความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรงได้เช่น ซาลโมเนลลา ที่พบในซับซาฮาร่าแอฟริกา (sub-Saharan Africa) (Feasey, Dougan, Kingsley, Heyderman, & Gordon, 2012; Herrero-Fresno et al., 2014; Parsons et al., 2013) รวมถึงรายงานล่าสุดที่พบในประเทศเวียดนาม (Mather et al., 2018) ซึ่งความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดของเชื้อซาลโมเนลลาในผู้ป่วยไทยยังไม่เคยมีการนำมาทดสอบในหนูทดลองโมเดลลำไส้อักเสบเฉียบพลันมาก่อน

การใช้หนูทดลองทดสอบความสามารในการก่อพยาธิกำเนิดของเชื้อต่าง ๆ เคยมีการศึกษาและวิจัยมาก่อน รวมถึงเชื้อก่อโรคซาลโมเนลลา ซึ่งล้วนเป็นการนำเชื้อซาลโมเนลลามาตรฐานในห้องปฏิบัติการมาใช้ทดสอบ ตัวอย่างเช่นการทดสอบการแย่งเหล็กของซาลโมเนลลากับอีโคไล นิซเซิล 1917 (Deriu et al., 2013) และการสร้างไมโครซิน (microcins) ของอีโคไล นิซเซิล 1917 ช่วยรักษาซาลโมเนลลา (Sassone-Corsi et al., 2016) ซึ่งการทดลองจะให้ยา streptomycin ก่อนได้รับเชื้อซาลโมเนลลาเพื่อทำลายการต่อต้านการตั้งรกรากจากเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Colonization resistance) (Barthel et al., 2003) และทำให้เชื้อซาลโมเนลลาเข้ามาเจริญเติบโตแทนที่ได้และเกิดโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน

หลังจากการทดลองนำเชื้อซาลโมเนลลาที่ได้จากผู้ป่วยจริงมาทำการศึกษาความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดในหนูทดลองพบว่าเชื้อซาลโมเนลลาสายพันธุ์ IR715 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการจะสามารถรุกรานเข้าสู่ลำไส้ได้ดีกว่าอีกทั้งยังพบการกระจายตัวไปยังม้ามได้มากกว่าซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยในรพ. มหาราชนครเชียงใหม่ ซึ่งผลที่ได้นี้ยังสอดคล้องไปกับการพบว่าซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยจะมีความสามารถในการกระตุ้มภูมิคุ้มกันของโฮสต์ให้หลั่งสารเรียกเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลได้น้อยลงและยังมีการแสดงออกของยีน *Zo-1* ซึ่งแสดงออกของโปรตีนโปรตีน tight junction ที่มากกว่าหนูกลุ่มที่ติดเชื้อซาลโมเนลลาสายพันธุ์มาตรฐานอีกด้วยเช่นกัน แต่หากเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อซาลโมเนลลาจะพบว่าก็ยังอยู่ในเกณฑ์โรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ซึ่งคาดว่าความแตกต่างเกิดจากการมีความแตกต่างทางลักษณะของ phenotype และ/หรือ genotype ของซาลโมเนลลา (García-Quintanilla & Casadesús, 2011; Gulig & Doyle, 1993; Gymoese et al., 2017; Ho et al., 2002; Kurita et al., 2003; Monte et al., 2019) ทั้งนี้การศึกษาถึงความแตกต่างทางลักษณะของ phenotype และ genotype ในซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยจำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไป

งานวิจัยนี้จึงเป็นการแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดและกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ของซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยที่ถูกทดสอบในหนูทดลองลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ซึ่งพบว่าเชื้อที่ถูกทดสอบความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดของซาลโมเนลลาที่แยกได้จากผู้ป่วยและถูกนำมาทดสอบนั้นมีความสามารถในการรุกรานได้น้อยกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน IR715 ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนและสามารถเอาไปต่อยอดการศึกษาในหนูทดลองได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

(1) สามารถนำโมเดลหนูทดลองลำไส้อักเสบเฉียบพลันมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อซาลโมเนลลา เอนเทอริกา ไทฟิมูเรียม ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย แต่ต้องพึงคำนึงถึงความรุนแรงในการก่อพยาธกำเนิดที่เบากว่าสายพันธุ์มาตรฐาน

(2) สามารถนำมาใช้พิสูจน์ความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดของเชื้อซาลโมเนลลา เอนเทอริกา ไทฟิมูเรียม ที่มีความแตกต่างกันทั้งในด้าน genotype และ phenotype

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

(1) งานวิจัยนี้ทำให้สามารถนำโมเดลการทดลองในหนูลำไส้อักเสบเฉียบพลันไปใช้ต่อยอดในงานวิจัยทดสอบการก่อพยาธิกำเนิดของซาลโมเนลลา เอนเทอริกา ไทฟิมูเรียม เช่น การทดสอบการให้โปรไบโอติกต่อการรักษาและการป้องกันเชื้อซาลโมเนลลา การทดสอบการให้ฟาจ (bacteriophage) ต่อการรักษาและการป้องกันเชื้อซาลโมเนลลา เป็นต้น

(2) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อซาลโมเนลลา เอนเทอริกา ไทฟิมูเรียม ที่แยกได้จากผู้ป่วยและถูกนำมาทดลองมีความสามารถในการก่อพยาธิกำเนิดแตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งสามารถนำซาลโมเนลลา เอนเทอริกา ไทฟิมูเรียม ที่คาดว่าจะมีความรุนแรงมากกว่าหรือมีความแตกต่างกันในแต่ละตัวจาก phenotype หรือ genotype ก็สามารถนำมาใช้ทดสอบในโมเดลหนูทดลองได้เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martinez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., . . . Hardt, W. D. (2003). Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. ***Infect Immun,*** 71(5), 2839-2858.

Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., . . . Raffatellu, M. (2013). Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal colonization by competing for iron. ***Cell Host Microbe,*** 14(1), 26-37. doi:10.1016/j.chom.2013.06.007

Everest, P., Roberts, M., & Dougan, G. (1998). Susceptibility to Salmonella typhimurium infection and effectiveness of vaccination in mice deficient in the tumor necrosis factor alpha p55 receptor. ***Infection and Immunity,*** 66(7), 3355-3364.

Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. ***Lancet,*** 379(9835), 2489-2499. doi:10.1016/s0140-6736(11)61752-2

García-Quintanilla, M., & Casadesús, J. (2011). Virulence plasmid interchange between strains ATCC 14028, LT2, and SL1344 of Salmonella enterica serovar Typhimurium. ***Plasmid,*** 65(2), 169-175. doi:https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.12.001

Gordon, M. A., Banda, H. T., Gondwe, M., Gordon, S. B., Boeree, M. J., Walsh, A. L., . . . Molyneux, M. E. (2002). Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: high mortality and frequent recrudescence. ***Aids,*** 16(12), 1633-1641.

Gulig, P. A., & Doyle, T. J. (1993). The Salmonella typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. ***Infect Immun,*** 61(2), 504-511.

Gymoese, P., Sørensen, G., Litrup, E., Olsen, J. E., Nielsen, E. M., & Torpdahl, M. (2017). Investigation of Outbreaks of Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Its Monophasic Variants Using Whole-Genome Sequencing, Denmark. ***Emerg Infect Dis,*** 23(10), 1631-1639. doi:10.3201/eid2310.161248

Hapfelmeier, S., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Müller, A. J., Heikenwalder, M., . . . Hardt, W.-D. (2005). The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-2 and SPI-1 Type III Secretion Systems Allow *Salmonella* Serovar Typhimurium to Trigger Colitis via MyD88-Dependent and MyD88-Independent Mechanisms. ***The Journal of Immunology,*** 174(3), 1675-1685. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1675

Herrero-Fresno, A., Wallrodt, I., Leekitcharoenphon, P., Olsen, J. E., Aarestrup, F. M., & Hendriksen, R. S. (2014). The Role of the st313-td Gene in Virulence of Salmonella Typhimurium ST313. ***PLoS One,*** 9(1), e84566. doi:10.1371/journal.pone.0084566

Ho, T. D., Figueroa-Bossi, N., Wang, M., Uzzau, S., Bossi, L., & Slauch, J. M. (2002). Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of Salmonella enterica serovar Typhimurium. ***J Bacteriol,*** 184(19), 5234-5239. doi:10.1128/jb.184.19.5234-5239.2002

Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C., & Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. ***Antimicrob Agents Chemother,*** 52(8), 2818-2824. doi:10.1128/aac.00171-08

Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleesschauwer, B., . . . Angulo, F. J. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. ***PLOS Medicine,*** 12(12), e1001921. doi:10.1371/journal.pmed.1001921

Kurita, A., Gotoh, H., Eguchi, M., Okada, N., Matsuura, S., Matsui, H., . . . Kikuchi, Y. (2003). Intracellular expression of the Salmonella plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. ***Microb Pathog,*** 35(1), 43-48.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., . . . for the International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness", S. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. ***Clinical Infectious Diseases,*** 50(6), 882-889. doi:10.1086/650733

Mather, A. E., Phuong, T. L. T., Gao, Y., Clare, S., Mukhopadhyay, S., Goulding, D. A., . . . Baker, S. (2018). New Variant of Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serovar Typhimurium Associated with Invasive Disease in Immunocompromised Patients in Vietnam. ***MBio,*** 9 (5) . doi:10.1128/mBio.01056-18

Monte, D. F., Nelson, V., Cerdeira, L., Keelara, S., Greene, S., Griffin, D., . . . Thakur, S. (2019). Multidrug- and colistin-resistant Salmonella enterica 4,[5],12:i:- sequence type 34 carrying the mcr-3.1 gene on the IncHI2 plasmid recovered from a human. ***J Med Microbiol,*** 68(7), 986-990. doi:10.1099/jmm.0.001012

Parsons, B. N., Humphrey, S., Salisbury, A. M., Mikoleit, J., Hinton, J. C., Gordon, M. A., & Wigley, P. (2013). Invasive non-typhoidal Salmonella typhimurium ST313 are not host-restricted and have an invasive phenotype in experimentally infected chickens. ***PLoS Negl Trop Dis,*** 7(10), e2487. doi:10.1371/journal.pntd.0002487

Sassone-Corsi, M., Nuccio, S. P., Liu, H., Hernandez, D., Vu, C. T., Takahashi, A. A., . . . Raffatellu, M. (2016). Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. ***Nature,*** 540(7632), 280-283. doi:10.1038/nature20557

Thamlikitkul, V., Dhiraputra, C., Paisarnsinsup, T., & Chareandee, C. (1996). Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: clinical features and risk factors. ***Trop Med Int Health,*** 1(4), 443-448.

Thiennimitr, P., Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Tolstikov, V., Huseby, D. L., . . . Bäumler, A. J. (2011). Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. ***Proceedings of the National Academy of Sciences,*** 108(42), 17480-17485. doi:10.1073/pnas.1107857108

Tsolis, R. M., Xavier, M. N., Santos, R. L., & Bäumler, A. J. (2011). How To Become a Top Model: Impact of Animal Experimentation on Human *Salmonella* Disease Research. ***Infection and Immunity,*** 79(5), 1806-1814. doi:10.1128/iai.01369-10

Whistler, T., Sapchookul, P., McCormick, D. W., Sangwichian, O., Jorakate, P., Makprasert, S., . . . Gregory, C. J. (2018). Epidemiology and antimicrobial resistance of invasive non-typhoidal Salmonellosis in rural Thailand from 2006-2014. ***PLoS neglected tropical diseases,*** 12(8), e0006718. doi:10.1371/journal.pntd.0006718