ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อโรโดคอคคัส อีไคว ชนิดที่มีแวปเอ แวปบี และชนิดที่ไม่มีทั้งแวปเอและแวปบี ที่ถูกเก็บกินอยู่ในฟาโกซัยท์ของคน

ชื่อผู้เขียน นางสาวอรพรรณ อินต๊ะสุวรรณ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล ประธานกรรมการ

ดร. พญ. วรลักษณ์ สัปจาตุระ กรรมการ

บทคัดย่อ

โรโดคอคคัส อีไคว (*R. equi*) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดิน ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อขึ้นอยู่กับการมีหรือไม่มียีน *VapA* หรือ *VapB* โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่มียีน *VapA* เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมาก เชื้อสายพันธุ์ที่มียีน *VapB* มีความรุนแรงปานกลาง และถ้าไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* เป็นเชื้อที่ไม่มีความรุนแรง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* ส่วนที่พบในลูกม้าจะเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *VapA* แต่ดินบริเวณคอกสุกรพบสายพันธุ์ที่มียีน *VapB* แม้ว่าการระบาดในคนจะพบน้อย แต่ก็พบว่าผู้ที่ติดเชื้อ HIV มีอัตราการพบเชื้อนี้สูงกว่าในประชากรทั่วไป และส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์ที่มียีน *VapB* ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์ของ *R. equi* ในสุกร ผลการศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *R. equi* ได้ในต่อมน้ำเหลืองของสุกรที่ปกติ คิดเป็น 0.8% (4 ใน 500 ตัว) และในต่อมน้ำเหลืองที่ตรวจพบเชื้อนี้สามารถแยกเชื้อได้ 20 isolates เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่มียีน *VapB* 14 isolates คิดเป็น 70% ส่วนที่เหลือ 6 isolates เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB*

มีรายงานว่าเชื้อนี้สามารถเจริญได้ในแมคโครฝาจของคน หนู และม้า และเชื้อที่มียีน *VapA* สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในแมคโครฝาจได้นานกว่าเชื้อที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* เนื่องจากเซลล์ฟาโกซัยท์เป็นเซลล์กลุ่มแรกในระบบกลไกการป้องกันของร่างกายแบบไม่จำเพาะ ถ้าเซลล์ฟาโกซัยท์กินเชื้อโรคแล้วสามารถทำลายเชื้อได้หมด ก็ทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อไม่เป็นโรค ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเชื้อสายพันธุ์ที่มียีน *VapA* หรือ *VapB*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* ว่ามีความสามารถในการมีชีวิตรอดอยู่ในเซลล์ฟาโกซัยท์ที่แยกจากเลือดของคนแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร การศึกษานี้จะใช้ *R. equi* สายพันธุ์ ATCC 33701, A5 และ ATCC 6939 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานของสายพันธุ์ที่มียีน *VapA* หรือ *VapB* หรือไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* ตามลำดับ เป็นตัวควบคุม จากการศึกษาพบว่า *R. equi* สายพันธุ์ที่มียีน *VapA* ที่แยกได้จากลูกม้า สายพันธุ์ที่มียีน *VapB* ที่แยกได้จากสุกรและผู้ที่ติดเชื้อ HIV และสายพันธุ์ที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* ที่แยกได้จากดินและผู้ที่ติดเชื้อ HIV ถูกฆ่าและมีอัตราการอยู่รอดในเซลล์ฟาโกซัยท์ของคนได้ไม่แตกต่างจากเชื้อควบคุมของแต่ละสายพันธุ์ โดยพบว่าหลังจากที่ให้เซลล์ฟาโกซัยท์กินเชื้อก่อนนาน 90 นาที จำนวนเชื้อที่มีชีวิตของทั้ง 3 สายพันธุ์ลดลงใน 12 ชั่วโมงแรก ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยที่เชื้อที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* ยังคงมีจำนวนลดลงต่อ ในขณะที่จำนวนของเชื้อที่มียีน *VapA* หรือ *VapB* ไม่ลดลง แต่กลับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และจำนวนเชื้อทั้งสองนี้ที่ 48 ชั่วโมง ก็แตกต่างจากจำนวนของเชื้อที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* หรือ *VapB* อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) เช่นเดียวกัน จากการศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *R. equi* ในเซลล์ฟาโกซัยท์ของคนปกติเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* พบว่าเซลล์ฟาโกซัยท์ของคนสามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าเชื้อ *R. equi* เพราะหลังจากให้เซลล์ฟาโกซัยท์กินเชื้อนาน 90 นาที พบว่า *E. coli* ภายในเซลล์ถูกฆ่าหมด ในขณะที่ยังคงพบเชื้อ *R. equi* ที่มีชีวิตในเซลล์ฟาโกซัยท์อยู่ และสรุปได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ฟาโกซัยท์ต่อไป เชื้อ *R. equi* ก็ถูกฆ่ามากเรื่อยๆ ถ้าเป็นเชื้อที่ไม่รุนแรงจำนวนเชื้อในเซลล์ถูกฆ่าเพิ่มมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นเชื้อที่มีชีวิตรอดจะเพิ่มจำนวนขึ้น ในขณะที่เชื้อที่มีความรุนแรงมากหรือปานกลางจะถูกฆ่ามากถึงชั่วโมงที่ 12 เท่านั้น จากนั้นเชื้อที่มีชีวิตรอดจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ

ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า การที่เชื้อส่วนใหญ่ในดินเป็นเชื้อที่ไม่รุนแรงที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* และ *VapB* และเชื้อที่ได้จากคนส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงปานกลางที่มียีน *VapB* เช่นเดียวกับที่พบในสุกร จึงเป็นไปได้ที่สุกรจะเป็นแหล่งแพร่เชื้อ *R. equi* มาสู่คน และเชื้อ *R. equi* ที่ไม่มีทั้งยีน *VapA* หรือ *VapB* จะถูกฆ่าโดยเซลล์ฟาโกซัยท์ของคนได้มากกว่าเชื้อ *R. equi* ที่มียีน *VapA* หรือ *VapB* แต่การมียีน *VapA* หรือ *VapB* ไม่ได้ทำให้ความสามารถในการอยู่รอดแตกต่างกัน จึงเป็นไปได้ที่ยีน *VapA* หรือ *VapB* อาจจะเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *R. equi* หรือการยับยั้งการถูกฆ่าโดยเซลล์ฟาโกซัยท์ของคน

Thesis Title Survivals of *VapA*, *VapB* and Non-*VapA*, Non-*VapB Rhodococcus equi* Strains in Human Phagocytes

Author Ms. Oraphan Intasuwan

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul Chairperson
Dr. Volalcuk Supajatura Member

ABSTRACT

Rhodococcus equi (*R. equi*) is a bacteria commonly found in the soil. At least three virulent levels of *R. equi* have been identified. Virulent *R. equi* is characterized by the presence of *VapA* gene and are found in horses. *R. equi* strains of intermediate virulence are identified by *VapB* gene and are found in pig-breeding farm soil. Avirulent *R. equi* shows no evidence of *VapA* and *VapB* gene, and is widespread in soil. Interestingly, the HIV positive patients were infected mostly with *VapB*-positive strains. In this study, the strain of *R. equi* in pig was investigated. *R. equi* was isolated from submaxillary lymph nodes of apparently healthy pigs with the percentage of 0.8. Among positive lymph nodes, 14 isolates out of the total 20 were *VapB* gene positive strain and the rest 6 isolates were Non-*VapA*, Non-*VapB* strain.

The clinical isolates of *VapA* positive strains efficiently replicated within mouse macrophages in vitro, whereas the Non-*VapA*, Non-*VapB* derivative was rapidly cleared. Since phagocytes is the first line of body defense against infection, the survival of *VapA*, *VapB* and Non-*VapA*, Non-*VapB R. equi* in human peripheral blood phagocytes was investigated. *R. equi* ATCC 33701, A5 and ATCC 6939 were used as the standard control of *VapA*, *VapB* and Non-*VapA*, Non-*VapB* positive strain, respectively.

This study demonstrated that *VapA R. equi* isolated from foals, *VapB R. equi* isolated from pigs and HIV-positive patients, and Non-*VapA*, Non-*VapB R. equi* isolated from soils and HIV-positive patients were partially killed and the rest could replicate in phagocytes in the rate similar to their control strains. During the first 12 hours of culture period after prior 90 min phagocytosis, the number of viable intracellular bacteria of all 3 strains decreased but not significantly different. The number of viable intracellular *VapA* and *VapB* positive strain were lowest at 12 hour whereas that of Non-*VapA*, Non-*VapB* strain was at 24 hour. Then the survive bacteria replicated which the number increased with the time of incubation. The colony forming unit of intracellular *VapA* and *VapB* positive strain were significantly more than that of Non-*VapA*, Non-*VapB* strain at 24 and 48 hour ($P < 0.01$). In contrast, *E. coli* as control, did not persist within phagocytes after 90 min phagocytosis. These results indicated that virulent *VapA* strain and intermediate virulence *VapB* strains were more resistant to phagocyte killing *in vitro* than avirulent Non-*VapA*, Non-*VapB* strain.

Taken together, with the previous reports, pigs might be the critical reservoir of intermediate *VapB* strain which could transmit to human since this strain is commonly found in pigs and infected human. The strains differ in virulence, *VapA* or *VapB*, could control survival in human phagocytes similarly. Therefore, virulence factors identified as important in animal models is not be necessary important in human.