

การศึกษาคุณลักษณะของลำดับดีเอ็นเอของโปรเฟจในตัวอย่างทางคลินิก
ของ *Streptococcus agalactiae* ในประเทศไทย

Prophage DNA sequences in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates in Thailand

อานัติ บัวรัตน์ (Anat Buarat)¹

อนุศักดิ์ เกิดสิน (Anusak Kerdsin)²

โชติชนะ วิไลลักษณ์ (Chotechana Wilailuckana)³

อรุณวดี ชนะวงศ์ (Aroonwadee Chanawong)⁴

จารุกรณ์ วิศาลสวัสดิ์ (Jarukorn Visalsawadi)⁵

เบญจพร พิณสมบัติ (Benjaporn Pinsombut)⁶

นิชา เจริญศรี (Nicha Charoensri)⁷

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Master of Science Program in Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail: anat_buarat@kkumail.com

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาบริหารสาธารณสุข คณะสาธารณสุข มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

Assistant Professor, Faculty of Public Health, Kasetsart University Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus

E-mail: noksak99@gmail.com

³ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Associate Professor, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail: wchote@kku.ac.th

⁴ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Associate Professor, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail: aroonwad@kku.ac.th

⁵ นักเทคนิคการแพทย์ เชี่ยวชาญ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราช นครราชสีมา

Medical technologist, Department of Medical Technology, Mahorat Nakornrajchasma Hospital

E-mail: labkorat@gmail.com

⁶ นักเทคนิคการแพทย์ ชำนาญการพิเศษ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลระยอง

Medical technologist, Department of Medical Technology, Rayong Hospital

E-mail: Japornlab@gmail.com

⁷ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Assistant Professor, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail: nicha@kku.ac.th

บทคัดย่อ

Group B Streptococcus (GBS) สามารถก่อโรครุนแรงได้ในเด็กอ่อน ผู้สูงอายุ หรือผู้มีโรคประจำตัว เชื้อ GBS บางสายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค หรือการระบาดในบางภูมิภาค ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างรวมถึงแบคทีเรียโอเฟจ หรือเฟจ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Temperate phage ในระหว่างการติดเชื้อแบบ Lysogenic infection โพรเฟจ (Prophage) ทำให้แบคทีเรียมียืนเพิ่มหรือลดลงได้ ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ของโพรเฟจ และความรุนแรงของการติดเชื้อ และลักษณะทางระบาดวิทยาของ GBS ในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการศึกษาลักษณะของโพรเฟจในตัวอย่างทางคลินิกของ GBS ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และการวิเคราะห์โพรเฟจในจีโนมด้วย PHASTER โดยเชื้อ GBS จากตัวอย่างต่าง ๆ จากโรงพยาบาลในหลายภูมิภาค 108 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาโพรเฟจโดยวิธี PCR กับไพรเมอร์ 6 คู่ นอกจากนี้เชื้ออีก 9 ตัวอย่าง ยังนำมาวิเคราะห์หาลำดับจีโนมด้วย PHASTER เทียบกับข้อมูลจีโนมในแหล่งข้อมูลสาธารณะของเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน 7 ตัวอย่าง ผลการศึกษาด้วยเทคนิค PCR พบว่า 88.0% ของเชื้อ มีโพรเฟจอย่างน้อย 1 ชนิด โดยพบ Phage major capsid protein HK97 family พบมากที่สุด 51.0% การปรากฏของโพรเฟจถูกจำแนกเป็น 32 รูปแบบ โดยรูปแบบที่ 4 คือ BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05 พบมากที่สุดถึง 14.7% ผลการวิเคราะห์จีโนมด้วย PHASTER ทั้ง 16 ตัวอย่าง พบว่ามีโพรเฟจชนิดสมบูรณ์ Phage strept 315.3 มากที่สุด 77.8% และ 71.4% จากเชื้อในประเทศไทยและฐานข้อมูลสาธารณะ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบโพรเฟจที่พบเฉพาะเชื้อจากประเทศไทย ได้แก่ Phage strept T12, Phage strept Str PAP, Phage strept phi3396 และ Phage strept 20617 กล่าวโดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ GBS ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อในประเทศไทยส่วนใหญ่มีโพรเฟจอยู่ในจีโนม และมีความหลากหลายของชนิดโพรเฟจที่พบ แต่ข้อมูลที่ได้ไม่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างโพรเฟจกับการก่อโรคหรือสายพันธุ์กับการระบาด ข้อมูลลักษณะของโพรเฟจที่ได้นี้เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียโอเฟจเพื่อควบคุมเชื้อ GBS ในอนาคต

คำสำคัญ: *Streptococcus agalactiae*, prophage,

Abstract

Group B Streptococcus (GBS) can cause severe diseases in infants, elderly patients, or those with underlying conditions. Certain strains of GBS have been associated with severe infections or regional outbreaks. Strain diversity in a bacterial population may be related to various factors, one of which is bacteriophage (or phage), particularly temperate phage. During the lysogenic cycle, prophage can cause an increase or decrease in the size of the bacterial genome. There have yet been no reports from Thailand on the association between prophage and GBS severity nor the epidemiological characteristics of prophage in GBS. Therefore, this study aimed to characterize prophage DNA sequences in clinical GBS isolates in Thailand using polymerase chain

reaction (PCR) and by analyzing prophage DNA sequences in GBS genomes using PHASTER. One hundred eight GBS isolates from provincial hospitals were analyzed for prophage DNA sequences using a PCR-based method with 6 primer pairs. In addition, draft genome sequences of 9 GBS isolates were analyzed using PHASTER and compared with 7 public genomes of the same strain. The PCR analysis revealed that 88.0% of isolates (95/108) contained at least one prophage sequence. Of these, HK97 family phage major capsid protein was found at the highest rate (51.0%). The prophage sequences were categorized into 32 patterns. Of these, pattern 4 (containing only BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05) was present at the highest rate (14.7%). In addition, the analysis of 16 GBS genome sequences using PHASTER revealed intact prophage sequences, of which phage strept 315.3 was the most common, as it was found in 77.8% and 71.4% of Thai GBS isolates and public data, respectively. Moreover, phage strept T12, phage strept Str PAP, phage strept phi3396, and phage strept 20617 were found only in the Thai isolates.

This study showed that most clinical GBS isolates from Thailand carried highly diverse prophage sequences, but no association was found between prophages and infection or epidemics. The data regarding prophage characteristics from this study can aid in the development of bacteriophage-based methods of GBS control in the future.

Keywords: Streptococcus agalactiae, prophage

1. บทนำ

Streptococcus agalactiae หรือ Group B *Streptococcus* (GBS) แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบในระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ (Shabayek & Spellerberg, 2018) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อและเสียชีวิตในเด็กอ่อน เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด โรคปอดอักเสบ และโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ยิ่งไปกว่านั้นแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถก่อโรครุนแรงในผู้ใหญ่ได้ด้วย (Edmond et al., 2012; Ouchenir et al., 2017; Stoll et al., 2011) โดยพบอุบัติการณ์การติดเชื้อในผู้ใหญ่สูงขึ้น 2 ทศวรรษที่ผ่านมา (High, Edwards, & Baker, 2005) การเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อในมนุษย์ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่นี้ สอดคล้องกับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการและความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรีย

การจำแนกสายพันธุ์ของ GBS อาศัยวิธีการที่หลากหลาย โดยเริ่มแรกอาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันต่อคาร์โบไฮเดรตแอนติเจนบนแคปซูล ซึ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ย่อยได้ 10 serotype (Ia, Ib, II ถึง XI) (Edwards, Nizet, & Baker, 2011) ต่อมาใช้วิธี Multilocus sequence typing (MLST) ซึ่งเป็นการตรวจหาความแตกต่างของอัลลีลในยีนที่สำคัญต่อการดำรงชีพของแบคทีเรีย สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้มากกว่า 1,600 sequence type (STs) (Jolley & Maiden, 2010; Jones et al.,

2003) การจำแนกสายพันธุ์ของ GBS ช่วยให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์กับการก่อโรค เช่น สายพันธุ์ ST17 มักพบว่าเป็นสาเหตุของการก่อโรครุนแรงในเด็กอ่อน (Furfaro, Chang, & Payne, 2018) หรือสายพันธุ์ ST283 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการระบาดในประเทศสิงคโปร์ โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการบริโภคนมผง (Barkham et al., 2019; Kalimuddin et al., 2017) ซึ่งความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียหลายชนิดพบว่ามีเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนโดยมีแบคทีเรียโอเฟจเป็นตัวกลาง เช่น จีโนมของ *Streptococcus pyogenes* มียีนของแบคทีเรียโอเฟจอยู่ถึง 10% และมียีนที่เป็นปัจจัยของความรุนแรงในการก่อโรค เช่น Toxin type A ที่แสดงออกโดยยีน *speA* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายพันธุ์ M3 (Beres et al., 2002; Brussow, Canchaya, & Hardt, 2004; Salmond & Fineran, 2015)

แบคทีเรียโอเฟจ หรือเฟจ เป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียโดยการทำลายผนังเซลล์ในกรณีของ Virulent phage ในขณะที่ Temperate phage สามารถแทรกจีโนมของเฟจเข้ากับโครโมโซมของแบคทีเรีย ทำให้เกิดสถานะเรียกว่า “โปรเฟจ” (Lima-Mendez, Toussaint, & Leplae, 2011) ซึ่งโปรเฟจนี้ถูกนำมาใช้เป็น Genetic marker ในการศึกษาต่าง ๆ เช่น การศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อก่อโรค (Kwon, Seong, & Kim, 2013) ความสัมพันธ์ระหว่างโปรเฟจกับปัจจัยของความรุนแรงในเชื้อก่อโรค (Dini, Shokohizadeh, Jalilian, Moradi, & Arabestani, 2019) และการจำแนกชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรีย (Ko et al., 2018) ในกรณี GBS มีการศึกษาพบว่าโปรเฟจบางชนิดมักพบในสายพันธุ์ที่ก่อโรครุกรานระบบประสาทส่วนกลางในเด็กอ่อน การติดเชื้อที่ผิวหนัง ข้อ และกระดูกในผู้ใหญ่ (Salloum, Van Der Mee-Marquet, Domelier, Arnault, & Quentin, 2010; Van Der Mee-Marquet et al., 2006) ในประเทศไทย GBS serotype III พบว่าเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของการติดเชื้อในมนุษย์ (Paveenkittiporn, Ungcharoen, & Kerdsin, 2020) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาโปรเฟจในจีโนมของ GBS ที่ก่อโรคเหล่านี้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ลักษณะลำดับดีเอ็นเอของโปรเฟจใน GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 เพื่อวิเคราะห์ลักษณะลำดับดีเอ็นเอของโปรเฟจในจีโนมของ GBS จากตัวอย่างทางคลินิก

2.1 เพื่อจำแนกรูปแบบดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างแบคทีเรีย

เชื้อ GBS ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกันจำนวน 108 ตัวอย่าง เป็นแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างทางคลินิกในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 จากโรงพยาบาลระยอง โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา โรงพยาบาลน่าน โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ โรงพยาบาลอุดรดิตถ์ โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ และโรงพยาบาลบึงกาฬ เชื้อทั้งหมดได้รับการยืนยันสปีชีส์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer และการศึกษาครั้งนี้ได้รับการรับรองจากศูนย์วิจัยจริยธรรมในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่โครงการ HE612255

3.2 การตรวจหาดีเอ็นเอโปรเฟจด้วยเทคนิค PCR

3.2.1 สายไพรเมอร์

ไพรเมอร์จากการศึกษาของ Salloum และคณะ (Salloum, van der Mee-Marquet, Valentin-Domelier, & Quentin, 2011) ใช้สำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอโปรเฟจในยีนเป้าหมาย ได้แก่ ArpU family phage encoded transcriptional regulator, DNA modification methylase, phage major capsid protein, site-specific integrase, phage repressor protein, และ site-specific integrase ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1

3.2.2 ปฏิกริยาของ PCR และการตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ส่วนผสมของปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย Deoxynucleotide triphosphate ชนิดละ 0.2 mM, Taq DNA polymerase 0.625 ยูนิต (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), บัฟเฟอร์ PCR 1X (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), MgCl₂ ความเข้มข้น 2 mM, และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 μM โดยปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 μL อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกริยาแสดงไว้ในตารางที่ 2 ปฏิกริยา PCR ดำเนินการโดยเครื่อง FlexCycler2 (Biometra GmbH, Göttingen, Lower Saxony, Germany) ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยา วิเคราะห์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8% ด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยมีดีเอ็นเออ้างอิงขนาด 1 Kb (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

3.3 การตรวจหาดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS

3.3.1 ข้อมูลจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 จำนวน 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 2 ตัวอย่างจากแต่ละโรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลระยอง (RYG48 และ RYG76) โรงพยาบาลน่าน (NAN1 และ NAN2) โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ (PNB1 และ PNB4) และ 1 ตัวอย่างจากแต่ละโรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลบึงกาฬ (BKN1) โรงพยาบาลอุดรดิตต์ (UTT6) และโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา (NMA30) ลำดับนิวคลีโอไทด์วิเคราะห์โดยเครื่อง Illumina NovaSeq 6000 (Novogene, Singapore) และสร้างข้อมูลจีโนมโดยใช้ Unicycler (<https://github.com/rwick/Unicycler>) (Wick, Judd, Gorrie, & Holt, 2017) การวิเคราะห์ข้อมูลชนิดยีนโดยใช้ RASTtk (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>) (Brettin et al., 2015) ข้อมูล Sequence type วิเคราะห์โดย PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>) (Davis et al., 2020; Wattam et al., 2014) ในขณะที่ Serotyping วิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูลใน NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ LT671983 - LT671992 สำหรับ Serotype Ia, Ib, II ถึง IX ตามลำดับ (Kapatai, Patel, Efstratiou, & Chalker, 2017) การวิเคราะห์โปรเฟจในจีโนมวิเคราะห์โดย PHASTER (<https://phaster.ca/>) (Arndt et al., 2016)

3.3.2 จีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 จากฐานข้อมูลสาธารณะ

จีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 ถูกคัดเลือกจากฐานข้อมูลของ PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>) โดยใช้เกณฑ์สำหรับคัดเลือก ได้แก่ 1) เป็นจีโนมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับไพรเมอร์โปรเฟจที่ใช้ในการศึกษา

อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง และ 2) เป็นจีโนมที่รายงานจากประเทศในทวีปเอเชีย ส่วนชนิดของ Serotype ถูกวิเคราะห์เช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ใน 3.3.1 และถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย PHASTER (<https://phaster.ca/>) (Arndt et al., 2016) เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอโปรเฟจเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ยีนเป้าหมาย และตำแหน่งในสายพันธุ์อ้างอิง

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ยีนเป้าหมาย	สายพันธุ์อ้างอิง: ตำแหน่ง
F10	Forward TCAGCAGAGGAAGGAAAGGA Reverse CAATCAAGAGCCCTCCCTA	A phage-encoded transcriptional regulator, ArpU family	Sag27: 1398001-1398508
SAK_0738	Forward GGGATAAGAAAGCCAATC Reverse ACATAGATAGACGCATCG	DNA methylase prophage lambda W4	A909: 676338-676590
SAK_0748	Forward TGATTTCTTACTACTGGATTG Reverse CGCTTCTGGTAGAACGAG	Phage major capsid protein HK97 family	A909: 685231-685366
SAK_1326	Forward TTTGACCTACGGGATTATG Reverse TGAACGCCATCTTAGAAG	Site-specific recombinase, phage integrase family (remnant)	A909: 1309413-1309637
SAK_2090	Forward TAGAGCACCAAGGCGAATG Reverse AAACGACCTCATCACTAAACG	BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05	A909: 2081672-2081773
SAK_2094	Forward AAAGAGTAAAGCATTTTCG Reverse CCTAATCTATATTGGAGTTC	Prophage Sa05 site-specific recombinase phage integrase family	A909: 2085536-2086061

ตารางที่ 2 ขั้นตอนปฏิกิริยา อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนปฏิกิริยา	ไพรเมอร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	ทุกไพรเมอร์	94.0	5 นาที	1
Denaturation	ทุกไพรเมอร์	94.0	30 วินาที	35
Annealing	SAK_0738, SAK_2090	54.0	30 วินาที	35
	SAK_0748, F10	50.5		
	SAK_1326, SAK_2094	49.0		
Extension	ทุกไพรเมอร์	72.0	30 วินาที	35
Final extension	ทุกไพรเมอร์	72.0	2 นาที	1

4. ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะของตัวอย่าง GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก

GBS จำนวน 108 ตัวอย่าง ได้จาก โรงพยาบาลระยอง 23 ตัวอย่าง โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา 22 ตัวอย่าง โรงพยาบาลน่าน 20 ตัวอย่าง โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ และโรงพยาบาลอุดรดิตถ์แห่งละ 15 ตัวอย่าง โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ 11 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลบึงกาฬ 2 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยหญิง 69 รายและชาย 39 ราย (63.9% และ 36.1% ตามลำดับ) เป็นผู้ป่วยที่มีอายุเฉลี่ย 52.4 ปี (ตั้งแต่ 1 วันถึง 94 ปี) ประเภทของตัวอย่างแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ เลือด (34 ตัวอย่าง) ตัวอย่างจากระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ (32 ตัวอย่าง) หนอง (31 ตัวอย่าง) และประเภทอื่น ๆ (11 ตัวอย่าง) ดังแสดงในตารางที่ 3

4.2 ดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS

การตรวจดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS ด้วยเทคนิค PCR พบว่า จำนวน 95 ตัวอย่าง (88.0%) ตรวจพบดีเอ็นเอโปรเฟจโดยไพรเมอร์อย่างน้อยหนึ่งคู่ดังแสดงในตารางที่ 4 และ ไพรเมอร์ SAK_0748 (Phage major capsid protein HK97 family) เป็นไพรเมอร์ที่ตรวจพบโปรเฟจได้มากที่สุด (55/108 ตัวอย่าง, 51.0%) ตามมาด้วยไพรเมอร์ SAK_2090 (50/108 ตัวอย่าง, 46.3%) SAK_1326 (40/108 ตัวอย่าง, 37.0%) SAK_2094 (25/108 ตัวอย่าง, 23.2%) SAK_0738 (22/108 ตัวอย่าง, 20.4%) และ F10 (15/108 ตัวอย่าง, 13.9%) ตามลำดับ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าในจีโนมของแบคทีเรีย GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย ส่วนใหญ่มีดีเอ็นเอโปรเฟจ และมีชนิดของดีเอ็นเอโปรเฟจที่แตกต่างกันออกไป

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาและลักษณะของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

โรงพยาบาล	ประเภทตัวอย่าง				รวมทั้งหมด
	เลือด	ระบบทางเดินปัสสาวะ	หนอง	อื่น ๆ*	
ระยอง	4	14	3	2	23
มหาราชนครราชสีมา	7	5	7	3	22
น่าน	8	5	6	1	20
สวรรค์ประชารักษ์	5	3	5	2	15
อุดรดิตถ์	4	1	8	2	15
เพชรบูรณ์	5	4	1	1	11
บึงกาฬ	1	0	1	0	2
รวมทั้งหมด	34	32	31	11	108

4.3 รูปแบบของดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS

การพบดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS จำนวน 108 ตัวอย่าง มีรูปแบบที่มีความแตกต่างกัน จึงกำหนดรูปแบบออกเป็น 32 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดย รูปแบบที่ 1 ถึง 5 มี 1 ดีเอ็นเอโปรเฟจ รูปแบบที่ 6 ถึง 15 มี 2 ดีเอ็นเอโปรเฟจ รูปแบบที่ 16 ถึง 26 มี 3 ดีเอ็นเอโปรเฟจ รูปแบบที่ 27 ถึง 30 มี 4 ดีเอ็นเอโปรเฟจ ส่วนรูปแบบที่ 31 และ 32 มี 5 และ

6 ดีเอ็นเอโปรเฟจตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของรูปแบบการพบดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย

ตารางที่ 4 ดีเอ็นเอโปรเฟจที่ปรากฏในรูปแบบต่าง ๆ จำนวน 32 รูปแบบของตัวอย่าง GBS จำนวน 95 ตัวอย่าง

โปรเฟจ	รูปแบบโปรเฟจ																																N*		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
ไฟเบอร์																																			
F10	+					+	+	+	+							+	+	+	+	+													+	+	15
SAK_0738						+				+						+	+			+	+								+	+	+		+	+	22
SAK_0748		+					+			+	+	+	+			+		+			+		+	+	+			+	+		+	+	+	+	55
SAK_1326			+								+			+	+		+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	40
SAK_2090				+			+				+		+						+		+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	50
SAK_2094					+			+				+		+						+		+		+	+	+		+	+	+		+	+	+	25
จำนวน	1	11	2	14	2	1	3	1	1	4	3	11	2	3	6	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	7	2	1	1	1	1	95	
ตัวอย่าง**																																			

+ คือ ดีเอ็นเอโปรเฟจที่ปรากฏในรูปแบบนั้น ๆ

ดีเอ็นเอโปรเฟจที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากไฟเบอร์ต่าง ๆ ได้แก่

F10: A phage-encoded transcriptional regulator, ArpU family

SAK_0738: DNA methylase prophage lambda W4

SAK_0748: Phage major capsid protein HK97 family

SAK_1326: Site-specific recombinase, phage integrase family (remnant)

SAK_2090: BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05

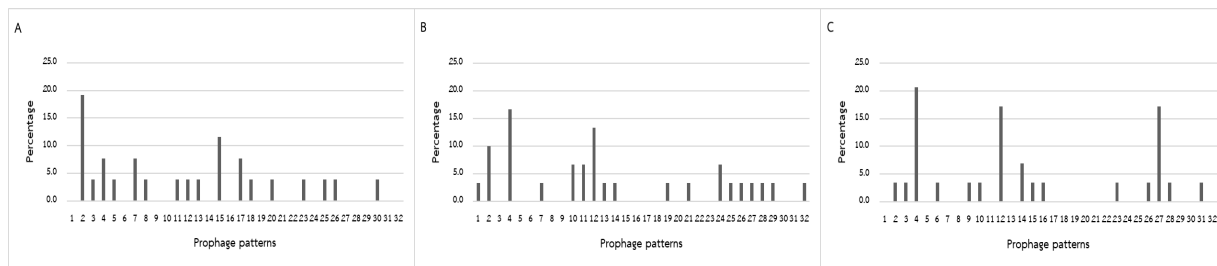
SAK_2094: Prophage Sa05 site-specific recombinase phage integrase family

* คือ จำนวนตัวอย่างที่ปรากฏดีเอ็นเอโปรเฟจโดยการใช้ไฟเบอร์นั้น ๆ

** คือ จำนวนตัวอย่างที่มีอยู่ในรูปแบบโปรเฟจนั้น ๆ

4.4 การกระจายของรูปแบบดีเอ็นเอโปรเฟจในตัวอย่างทางคลินิกแต่ละประเภท

เมื่อพิจารณาจำนวนรูปแบบของดีเอ็นเอโปรเฟจในตัวอย่างทางคลินิกแต่ละประเภท จำนวนรูปแบบดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างจากระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ 18 รูปแบบ จากตัวอย่างเลือด 17 รูปแบบ และจากตัวอย่างหนอง 15 รูปแบบ โดยพบรูปแบบที่ 2 มากที่สุดในตัวอย่างจากเลือด 22.2% ในขณะที่รูปแบบที่ 4 พบมากที่สุดในตัวอย่างจากระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ และหนอง 16.7% และ 20.7% ตามลำดับดังแสดงในรูปภาพที่ 1



รูปภาพที่ 1 แสดงรูปแบบของโปรเฟจในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างเลือด (A) ระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ (B) และหนอง (C)

4.5 ลักษณะจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283

ข้อมูลจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกของประเทศไทยจำนวน 9 ตัวอย่าง วิเคราะห์พบว่า ทั้งหมดจัดอยู่ใน Serotype III ขนาดของจีโนมอยู่ระหว่าง 2.02 ถึง 2.08 Mb (เฉลี่ย 2.03 Mb) และ %GC อยู่ระหว่าง 35.18 ถึง 35.22 (เฉลี่ย 35.19%) ดังแสดงในตารางที่ 5

จีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 ที่มีอยู่บนฐานข้อมูลสาธารณะจำนวน 7 จีโนมที่ถูกคัดเลือกและวิเคราะห์พบว่า ทั้งหมดจัดอยู่ใน Serotype III ขนาดของจีโนมอยู่ระหว่าง 2.02 ถึง 2.11 Mb (เฉลี่ย 2.09 Mb) และ %GC อยู่ระหว่าง 35.38 ถึง 35.48 (เฉลี่ย 35.06%) ดังแสดงในตารางที่ 6

4.6 ลักษณะของดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283

ผลวิเคราะห์จาก PHASTER แสดงให้เห็นว่าจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทยจำนวน 9 จีโนม ตรวจพบดีเอ็นเอโปรเฟจอยู่ระหว่าง 1 ถึง 4 โปรเฟจ (เฉลี่ย 2.33) โดยพบดีเอ็นเอโปรเฟจทั้งหมดจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ Phage lactoc bil310, Phage strept T12, Phage strept Str PAP, Phage strept phi3396, Phage strept 20617, Phage strept 315.5, Phage strept 315.3, และ Phage bacter Diva ซึ่งประกอบด้วยโปรเฟจที่สมบูรณ์ ไม่สมบูรณ์ และโปรเฟจที่ยังเป็นที่น่าสงสัยอยู่ในขณะที่จีโนมของ GBS ที่มีอยู่บนฐานข้อมูลสาธารณะจำนวน 7 จีโนมตรวจพบ 6 ดีเอ็นเอโปรเฟจ จำนวนดีเอ็นเอโปรเฟจอยู่ระหว่าง 1 ถึง 4 ดีเอ็นเอโปรเฟจ (เฉลี่ย 2.71) ทั้งหมดนี้ Phage strept 315.3, phage strept 315.5, และ phage lactoc bil310 พบใน 5 จีโนม ตามมาด้วย Phage bacter Diva, phage strept T12, และ phage bacill AR9 sequences ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 ลักษณะจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย และรูปแบบของโปรเฟจที่วิเคราะห์ด้วยวิธี *in silico* และ PCR และลักษณะของดีเอ็นเอโปรเฟจที่วิเคราะห์ด้วย PHASTER

ตัวอย่าง	ขนาดจีโนม (Mb)	%GC	รูปแบบโปรเฟจ		ลักษณะดีเอ็นเอโปรเฟจโดย PHASTER						
			<i>In silico</i>	วิธี PCR	จำนวนโปรเฟจ	ชื่อโปรเฟจ	ขนาด (Kb)			%GC	
							intact	incomplete	questionable		
RYG48	2.08	35.22	20	NA	4	Phage lactoc bIL310	113.7	16.4		35.04	
						Phage strept T12		19.9			33.61
						Phage strept T12					
						Phage strept Str PAP		22.4			37.01
NAN2	2.03	35.19	20	15	3	Phage lactoc bIL310		16.3	43.8	35.10	
						Phage strept T12					37.30
						Phage strept phi3396		4.3			
NAN1	2.05	35.19	20	30	3	Phage lactoc bIL310		16.4		35.05	
						Phage strept 20617		35.8			36.81
						Phage strept 315.5		41.4			
PNB1	2.03	35.19	15	15	3	Phage lactoc bIL310		16.4		35.04	
						Phage strept 315.3		38.0			37.37
						Phage bacter Diva					
BKN1	2.03	35.18	20	NF	2	Phage lactoc bIL310		16.3		35.10	
						Phage strept 315.3		40.3			37.03
PNB4	2.02	35.19	15	15	2	Phage lactoc bIL310		16.4		35.04	
						Phage strept 315.3		40.3			37.03
UTT6	2.02	35.19	15	NF	2	Phage lactoc bIL310		16.4		35.05	
						Phage strept 315.3		39.1			37.20
NMA30	2.03	35.18	15	4	1	Phage strept 315.3		40.3		37.03	
RYG76	2.02	35.19	15	NA	1	Phage strept 315.3		39.0		37.22	

NA คือ ไม่ได้ถูกวิเคราะห์, NF คือ ตรวจสอบไม่พบดีเอ็นเอโปรเฟจด้วยวิธี PCR

โปรเฟจที่สมบูรณ์จำนวน 4 โปรเฟจที่พบในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย ได้แก่ Phage strept 20617, Phage strept 315.5, Phage strept 315.3 และ Phage strept T12 เป็นที่น่าสนใจว่ามี 8 จาก 9 จีโนมที่มีโปรเฟจสมบูรณ์อย่างน้อย 1 โปรเฟจ โดยพบ Phage strept 315.3 มากถึง 6 ใน 9 จีโนม ดังแสดงในตารางที่ 7

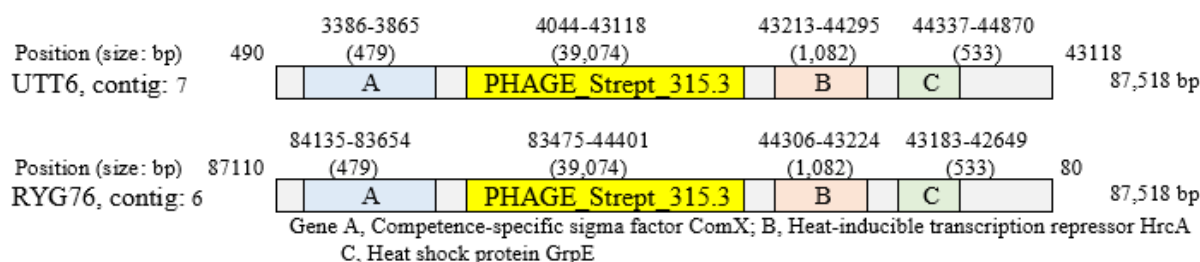
ตัวอย่างลักษณะของยีนบริเวณที่พบ Phage strept 315.3 ในจีโนม เช่น ตัวอย่าง UTT6 และ RYG76 ประกอบด้วย ยีน Competence-specific sigma factor ComX, Heat-inducible transcription repressor HrcA, and Heat shock protein GrpE ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 6 ลักษณะจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 ในฐานะข้อมูลสาธารณะ และรูปแบบของโปรเฟจที่วิเคราะห์ด้วยวิธี *in silico* และลักษณะของดีเอ็นเอโปรเฟจที่วิเคราะห์ด้วย PHASTER

Strain (Accession)	ขนาดจี โนม (Mb)	%GC	รูปแบบโปรเฟจ (<i>In silico</i> analysis)	ลักษณะโปรเฟจที่พบ โดย PHASTER					
				จำนวน โปรเฟจ	ชื่อโปรเฟจ	ขนาด (Kb)			%GC
						intact	incomplete	questionable	
SG-M1 (CP012419)	2.11	35.48	20	4	Phage lactoc bIL310 Phage strept 315.3 Phage strept 315.5 Phage bacter Diva	37.5	16.4	42.6 28.3	35.04 37.26 37.47 34.93
SG-M29 (CP021866)	2.11	35.48	20	3	Phage lactoc bIL310 Phage strept 315.3 Phage strept 315.5	37.5	16.4	42.6	35.04 37.26 37.47
SG-M50 (CP021865)	2.11	35.48	20	3	Phage lactoc bIL310 Phage strept 315.3 Phage strept 315.5	37.5	16.4	42.6	35.04 37.26 37.47
SG-M158 (CP021864)	2.11	35.48	20	3	Phage lactoc bIL310 Phage strept 315.3 Phage strept 315.5	37.5	16.4	42.6	35.04 37.26 37.47
SG-M163 (CP021863)	2.11	35.48	20	3	Phage lactoc bIL310 Phage strept 315.3 Phage strept 315.5	37.5	16.4	42.6	35.04 37.26 37.47
CU_GBS_08 (CP010874)	2.08	35.40	15	2	Phage strept T12 Phage bacter Diva	41.4		30.8	37.27 34.92
CU_GBS_98 (CP010875)	2.02	35.38	15	1	Phage bacill AR9		7.5		36.54

ตารางที่ 7 โพรเฟจสมบูรณ์ที่พบในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย

Predicted intact phage	จำนวนตัวอย่าง	ขนาดเฉลี่ย (Kb)	%GC เฉลี่ย	แบคทีเรียโพรเฟจอ้างอิง	ความเหมือน (%)
315.3-like	6	39.5	37.15	<i>S. pyogenes</i> phage 315.3	88.05
315.5-like	1	41.4	37.64	<i>S. pyogenes</i> phage 315.5	95.63
20617-like	1	35.8	36.81	Streptococcus phage 20617	87.89
T12-like	1	113.7	36.84	Streptococcus phage T12	94.73



รูปภาพที่ 2 โพรเฟจสมบูรณ์และยีนข้างเคียงที่พบใน จีโนมของ GBS UTT6 และ RYG76 ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย ยีน Phage Strept 315.3 อยู่ระหว่างยีน Competence-specific sigma factor ComX (A), Heat-inducible transcription repressor HrcA (B), และ Heat shock protein GrpE (C)

5. สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาดีเอ็นเอโพรเฟจในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่เพื่อตรวจหายีนเป้าหมายจำนวน 6 ยีน และ การศึกษาดีเอ็นเอโพรเฟจจากข้อมูลจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 จำนวน 9 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่ามีตัวอย่างมากถึง 88.0% มีดีเอ็นเอโพรเฟจ อย่างน้อย 1 โพรเฟจในจีโนม สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาในปี พ.ศ. 2553 และ 2554 ที่แสดงให้เห็นว่า GBS สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง และกระดูกและข้อทุกตัวอย่าง (100%, 115/115) (Salloum et al., 2010, 2011) มีจำนวนดีเอ็นเอโพรเฟจอย่างน้อยหนึ่งโพรเฟจในจีโนม ในทำนองเดียวกันกับสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรครุนแรงในเด็กและผู้ใหญ่ที่มีดีเอ็นเอโพรเฟจอย่างน้อยหนึ่งโพรเฟจในจีโนมมากถึง 99.3% (141/142) โดยพบว่าดีเอ็นเอโพรเฟจ Site-specific recombinase, phage integrase family (remnant) พบมากที่สุด (62.6%) ตามมาด้วย Phage major capsid protein HK97 family (50.4%) ในสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง และกระดูกและข้อ ในขณะที่สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุการก่อโรครุนแรงในเด็กและผู้ใหญ่พบดีเอ็นเอโพรเฟจ BRO domain protein, prophage antirepressor prophage Sa05 มากที่สุด (80.0%) รองลงมาคือ Phage major capsid protein HK97 family (72.0%) ถึงแม้ว่าจำนวนการตรวจพบดีเอ็นเอโพรเฟจในการศึกษานี้จะต่ำกว่าการค้นพบในการศึกษาข้างต้นเล็กน้อย แต่ในความเป็นจริงคือการศึกษานี้ใช้จำนวนไพรเมอร์ 6 คู่ น้อยกว่าการศึกษาของ Mee-Marquet และคณะในปี 2549 และ Salloum และคณะในปี 2553 และ 2554

ในประเทศฝรั่งเศส ที่ใช้ไพรเมอร์ถึง 10 คู่ (F5, F7, SAG0566 และ SAJ_2395 สามารถตรวจพบอีเอ็นเอโปรเฟจได้ 23%, 20%, 1%, และ 3% ตามลำดับในการศึกษาในตัวอย่างจำนวน 142 ตัวอย่าง (Salloum et al., 2011)) (Salloum et al., 2010, 2011; Van Der Mee-Marquet et al., 2006) ด้วยระยะเวลาที่ผ่านมาและพื้นที่ที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อความสามารถของไพรเมอร์ได้ กล่าวคือเมื่อระยะเวลาผ่านไปองค์ประกอบของจีโนมของ GBS มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดการวิวัฒนาการทำให้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบไว้ไม่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งที่มีความเปลี่ยนแปลงไปของนิวคลีโอไทด์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การค้นพบนี้ก็เป็นเครื่องยืนยันของการมีอยู่ของอีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS (Medini, Donati, Tettelin, Masignani, & Rappuoli, 2005; Tettelin et al., 2002) ประกอบกับผลจากวิเคราะห์จีโนมที่ได้จากการทำ Whole genome sequencing จำนวน 9 ตัวอย่างโดยใช้ PHASTER พบว่าทุกจีโนมมีการปรากฏอยู่ของอีเอ็นเอโปรเฟจ นอกจากนี้ยังพบโปรเฟจที่สมบูรณ์อีกถึง 4 อีเอ็นเอโปรเฟจ

เมื่อไม่นานมานี้ GBS ที่เป็นสาเหตุการก่อโรคในมนุษย์ของประเทศไทยได้ถูกทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างจากลักษณะทางคลินิกประเภทต่าง ๆ (Paveenkittiporn et al., 2020) โดย 3 อันดับแรกที่มีการศึกษาตรงกับการจำแนกประเภทตัวอย่างในการศึกษานี้ ได้แก่ ตัวอย่างจากระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ เลือด และหนอง โดยพบอีเอ็นเอโปรเฟจอย่างน้อยหนึ่งโปรเฟจมากถึง 93.8%, 62.5% และ 76.5% ใกล้เคียงกับผลการศึกษาที่ผ่านมาในผู้ป่วยติดเชื้อระยะแพร่กระจาย และการติดเชื้อที่ผิวหนัง (Salloum et al., 2010, 2011; Van Der Mee-Marquet et al., 2006) ผลการศึกษานี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่า GBS สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุการก่อโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อระยะแพร่กระจายในผู้ใหญ่ และการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ที่มีอีเอ็นเอโปรเฟจอยู่ในจีโนม อย่างไรก็ตามเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานดังกล่าว ควรมีการศึกษาให้ครอบคลุมในทุกกลุ่มลักษณะทางคลินิก และใช้ตัวอย่างจำนวนมากและครอบคลุมในทุกพื้นที่ของประเทศไทยในอนาคต

เพื่อตรวจสอบการกระจายของรูปแบบต่าง ๆ ของโปรเฟจ โดยตัวอย่างถูกจำแนกออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ตัวอย่างที่แยกได้จากระบบทางเดินปัสสาวะและการสืบพันธุ์ เลือด และหนอง การศึกษาแสดงให้เห็นความหลากหลายของรูปแบบในตัวอย่างแต่ละประเภทที่แตกต่างกันเฉลี่ย 16.7 รูปแบบ และมีเพียง 3 รูปแบบเท่านั้นที่พบในทุกประเภทของตัวอย่าง

แบคทีเรียโอเฟจ ถือเป็นยาต้านจุลชีพรูปแบบใหม่ที่น่าสนใจ แบคทีเรียโอเฟจ HN48 เคยถูกรายงานว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อ GBS ในปลาไนล (Oreochromis niloticus) (Luo et al., 2018) ในการศึกษาที่พบโปรเฟจที่สมบูรณ์ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียโอเฟจบางสายพันธุ์ ได้แก่ phage 315.3-like sequence, phage 315.5-like sequence, phage 20617-like sequence, และ phage T12-like โดยที่แบคทีเรียโอเฟจ T12 มีความสามารถเปลี่ยน *S. pyogenes* T25₃ ให้สามารถก่อโรคโดยการแลกเปลี่ยนยีน (Weeks & Ferretti, 1984) ทำนองเดียวกับแบคทีเรียโอเฟจ *S. pyogenes* phage 315.3 และ 315.5 ถูกสันนิษฐานว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิดอุบัติใหม่ของ *S. pyogenes* serotype M3 ที่มีความรุนแรงกว่าปกติโดยมีแบคทีเรียโอเฟจเป็นสื่อกลาง (Beres et al., 2002) นอกจากนี้ *Streptococcus thermophilus* phage 20617 ยังเคยถูกอธิบายว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มการยึดเกาะกับพื้นผิวที่เป็นของแข็ง และทนต่อความร้อนใน *S. thermophilus* สายพันธุ์ Lysogenic strain (Arioli et al., 2018) ถึงแม้ว่าแบคทีเรียโอเฟจเหล่านี้จะไม่ได้ถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ GBS แต่กระนั้นการปรากฏของโปรเฟจเหล่านี้ในจีโนมของ GBS อาจเป็นหลักฐานการมีส่วนร่วมใน

การขนส่งยีนระหว่างสปีชีส์โดยมีแบคทีริโอเฟจเป็นสื่อกลาง และอาจส่งเสริมให้แบคทีเรียที่ได้รับยีนนั้น ๆ มีความสามารถในการก่อโรคมมากขึ้นเช่นเดียวกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (Beres et al., 2002; Brussow et al., 2004; Salmond & Fineran, 2015) นอกจากนี้โปรเฟจอาจจะสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแตกทำลายของเซลล์ผ่าน Spontaneous prophage induction (SPI) (Cortes, Krog, & Balázsi, 2019; Raya & H'bert, 2009) ด้วยคุณลักษณะเช่นนี้ของโปรเฟจ อาจจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านการใช้ประโยชน์จากแบคทีริโอเฟจในการควบคุมเชื้อ GBS ในอนาคต เช่นเดียวกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานการใช้แบคทีริโอเฟจในการควบคุมการติดเชื้อในทั้งพืชและสัตว์ (Gill & Abedon, 2003; Goode, Allen, & Barrow, 2003; Ul Haq, Chaudhry, Akhtar, Andleeb, & Qadri, 2012)

โดยสรุปการศึกษาในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการตรวจหาดีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย ซึ่งพบว่ามิตีเอ็นเอโปรเฟจในจีโนมของ GBS อยู่ถึง 88.0% การศึกษาลำดับจีโนมของ GBS สายพันธุ์ ST283 เปิดเผยให้เห็นว่าทุกจีโนมมิตีเอ็นเอโปรเฟจเป็นองค์ประกอบโดยพบว่ามิตีเอ็นเอโปรเฟจที่สมบูรณ์จำนวน 4 โปรเฟจ การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่ามิตีเอ็นเอโปรเฟจเป็นองค์ประกอบในจีโนมของ GBS ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิกในประเทศไทย การศึกษานี้ อาจจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านการใช้ประโยชน์จากแบคทีริโอเฟจได้ในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการสนับสนุนจาก 1) ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ 2) ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม โครงการวิจัยเรื่อง “การใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อเป็นทางเลือกแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงปลาไนล์” มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รหัสโครงการ I62-00-30-01) และ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (รหัสโครงการ 29418)

7. เอกสารอ้างอิง

- Arioli, S., Eraclio, G., Scala, G. Della, Neri, E., Colombo, S., Scaloni, A., ... Mora, D. (2018). Role of temperate bacteriophage ϕ 20617 on streptococcus thermophilus DSM 20617T Autolysis and biology. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02719>
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Barkham, T., Zadoks, R. N., Azmai, M. N. A., Baker, S., Bich, V. T. N., Chalker, V., ... Chen, S. L. (2019). One hypervirulent clone, sequence type 283, accounts for a large proportion of invasive *Streptococcus agalactiae* isolated from humans and diseased tilapia in southeast asia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007421>
- Beres, S. B., Sylva, G. L., Barbian, K. D., Lei, B., Hoff, J. S., Mammarella, N. D., ... Musser, J. M. (2002). Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: Phage-

- encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.152298499>
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., ... Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*.
<https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Brussow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.3.560-602.2004>
- Cortes, M. G., Krog, J., & Balázsi, G. (2019). Optimality of the spontaneous prophage induction rate. *Journal of Theoretical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110005>
- Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., ... Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz943>
- Dini, M., Shokoohzadeh, L., Jalilian, F. A., Moradi, A., & Arabestani, M. R. (2019). Genotyping and characterization of prophage patterns in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4711-4>
- Edmond, K. M., Kortsalioudaki, C., Scott, S., Schrag, S. J., Zaidi, A. K., Cousens, S., & Heath, P. T. (2012). Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: Systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61651-6)
- Edwards, M. S., Nizet, V., & Baker, C. J. (2011). Group B Streptococcal Infections. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00012-2>
- Furfaro, L. L., Chang, B. J., & Payne, M. S. (2018). Perinatal streptococcus agalactiae epidemiology and surveillance targets. *Clinical Microbiology Reviews*.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00049-18>
- Gill, J., & Abedon, S. T. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Feature Articles*.
<https://doi.org/10.1094/apsnetfeature-2003-1103>
- Goode, D., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2003). Reduction of experimental *Salmonella* and

- Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5032-5036.2003>
- High, K. P., Edwards, M. S., & Baker, C. J. (2005). Group B Streptococcal Infections in Elderly Adults. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/432804>
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>
- Jones, N., Bohnsack, J. F., Takahashi, S., Oliver, K. A., Chan, M. S., Kunst, F., ... Spratt, B. G. (2003). Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2530-2536.2003>
- Kalimuddin, S., Chen, S. L., Lim, C. T. K., Koh, T. H., Tan, T. Y., Kam, M., ... Barkham, T. (2017). 2015 Epidemic of severe streptococcus agalactiae sequence type 283 infections in Singapore associated with the consumption of raw freshwater fish: A detailed analysis of clinical, epidemiological, and bacterial sequencing data. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/cix021>
- Kapatai, G., Patel, D., Efstratiou, A., & Chalker, V. J. (2017). Comparison of molecular serotyping approaches of Streptococcus agalactiae from genomic sequences. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3820-5>
- Ko, D. S., Seong, W. J., Kim, D., Kim, E. K., Kim, N. H., Lee, C. Y., ... Kwon, H. J. (2018). Molecular prophage typing of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. *Journal of Veterinary Science*. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.6.771>
- Kwon, H. J., Seong, W. J., & Kim, J. H. (2013). Molecular prophage typing of avian pathogenic Escherichia coli. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.005>
- Lima-Mendez, G., Toussaint, A., & Leplae, R. (2011). A modular view of the bacteriophage genomic space: Identification of host and lifestyle marker modules. *Research in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.006>
- Luo, X., Liao, G., Liu, C., Jiang, X., Lin, M., Zhao, C., ... Huang, Z. (2018). Characterization of bacteriophage HN48 and its protective effects in Nile tilapia Oreochromis niloticus against streptococcus agalactiae infections. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.12838>

- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>
- Ouchenir, L., Renaud, C., Khan, S., Bitnun, A., Boisvert, A.-A., McDonald, J., ... Robinson, J. L. (2017). The epidemiology, management, and outcomes of bacterial meningitis in infants. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0476>
- Paveenkittiporn, W., Ungcharoen, R., & Kerdsin, A. (2020). Streptococcus agalactiae infections and clinical relevance in adults, Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115005>
- Raya, R. R., & H'bert, E. M. (2009). Isolation of Phage via Induction of Lysogens. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_3
- Salloum, M., Van Der Mee-Marquet, N., Domelier, A. S., Arnault, L., & Quentin, R. (2010). Molecular Characterization and Prophage DNA Contents of Streptococcus agalactiae Strains Isolated from Adult Skin and Osteoarticular Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.01820-09>
- Salloum, M., van der Mee-Marquet, N., Valentin-Domelier, A. S., & Quentin, R. (2011). Diversity of prophage DNA regions of streptococcus agalactiae clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020256>
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Shabayek, S., & Spellerberg, B. (2018). Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00437>
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Sánchez, P. J., Faix, R. G., Poindexter, B. B., Van Meurs, K. P., ... Higgins, R. D. (2011). Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2217>
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Eisen, J. A., Peterson, S., Wessels, M. R., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V Streptococcus agalactiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.182380799>

- Ul Haq, I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Van Der Mee-Marquet, N., Domelier, A. S., Mereghetti, L., Lanotte, P., Rosenau, A., Van Leeuwen, W., & Quentin, R. (2006). Prophagic DNA fragments in *Streptococcus agalactiae* strains and association with neonatal meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1049-1058.2006>
- Wattam, A. R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T. L., Driscoll, T., Gabbard, J. L., ... Sobral, B. W. (2014). PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1099>
- Weeks, C. R., & Ferretti, J. J. (1984). The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) is located in bacteriophage T12. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/iai.46.2.531-536.1984>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>