



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 6
วันที่ 6 กันยายน 2566

การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มร่วมกันของเชื้อเคลบเซลลา นิวโมเนียอี และ แคนดิดา แอลบิแคน
Additive effect on biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*

จิรัชญา จงรักษ์¹

รศ.ดร. นพ.อัษฎาศดิ์ ลีฬหวนิชกุล²

aleelahavanit@gmail.com

¹นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

chiratchayachr@gmail.com

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไบโอฟิล์มเป็นการรวมกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มาเกาะติดกับพื้นผิวและถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเมทริกซ์ของสารโพลีเมอร์ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตขึ้น ซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้มากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มร่วมกันของ *Klebsiella pneumoniae* และ *Candida albicans* เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้บ่อยตามโรงพยาบาลและสิ่งแวดล้อม สามารถก่อโรคได้ในบุคคลที่มีภูมิคุ้มกันต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน เด็กทารก คนชรา และผู้ป่วยที่ต้องใช้อุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น เครื่องช่วยหายใจ สายสวนปัสสาวะ เป็นต้น งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยนำ *K. pneumoniae* และ *C. albicans* มาเลี้ยงร่วมกันบนไมโครเพลทแล้วนำมาตรวจหาปริมาณไบโอฟิล์มโดยใช้สารละลายคริสตัลไวโอเลต โดยเปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มระหว่างกลุ่ม *K. pneumoniae*, *C. albicans* และกลุ่มที่มีทั้ง *K. pneumoniae*, *C. albicans* ซึ่งใน 3 กลุ่มนี้พบว่ากลุ่มที่มี *K. pneumoniae* และ *C. albicans* อยู่ร่วมกันนั้นมีปริมาณไบโอฟิล์มมากกว่ากลุ่มที่มีเพียง *K. pneumoniae* หรือ *C. albicans* อย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: ไบโอฟิล์ม, เคลบเซลลา นิวโมเนียอี, แคนดิดา แอลบิแคน

Abstract

Biofilms are communities of microorganisms that adhere to surfaces and are encased within extracellular polymeric substances (EPS). They enable microorganisms to survive in various environments. This research aims to study the synergistic effect of biofilm formation by *K. pneumoniae* and *C. albicans*, which are commonly found in hospitals and possibly cause several complications, particularly in the immunocompromised hosts such as infants, the elderly, and patients who require medical devices (respirators or urinary catheters). In this study, *K. pneumoniae* and *C. albicans* were co-cultured on a microplate and examined for biofilm formation using a crystal violet solution. Comparative analysis was performed between the biofilm formation of three groups: i) *K. pneumoniae*, ii) *C. albicans*, and iii) mixed *K. pneumoniae* and *C. albicans*. The results revealed that the group with both *K. pneumoniae*



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 6
วันที่ 6 กันยายน 2566

and *C. albicans* showed significantly higher quantities of biofilm than the groups with *K. pneumoniae* or *C. albicans* alone.

Keywords: Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*

บทนำ

K. pneumoniae อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีการสร้างแคปซูลและไม่เคลื่อนที่ ซึ่งถูกพบครั้งแรกโดย Carl Friedlander ในปี ค.ศ. 1882 โดยแยกได้จากปอดของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคปอดบวม (1) *K. pneumoniae* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม (ดินและน้ำ) และบนพื้นผิวที่ไม่มีชีวิต (อุปกรณ์ทางการแพทย์) ตลอดจนพื้นผิวของสิ่งมีชีวิต เช่น คอหอย ทางเดินอาหาร และสามารถแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นลึกตลอดจนกระแสเลือดได้ ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคที่รุนแรง เช่น ปอดบวม ทางเดินปัสสาวะอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด และฝีในตับได้ (2-4) ในทศวรรษที่ผ่านมา มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วของ *Klebsiella* สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง เมื่อมีการติดเชื้อโดยเฉพาะผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลจะทำให้มีอัตราป่วยและเสียชีวิตสูง (2) นอกจากนี้การก่อตัวของไบโอฟิล์มยังเป็นหนึ่งในลักษณะรุนแรงที่สำคัญของ *K. pneumoniae* ซึ่งนำไปสู่การต้านทานที่เพิ่มขึ้นต่อปัจจัยภายนอกที่รุนแรงและยาต้านจุลชีพต่างๆ โดยพบว่าการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มประมาณ 65 ถึง 80% (5) โดยทั่วไปแล้ว *C. albicans* เป็นเชื้อราที่พบในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ประมาณ 50% ในขณะที่เชื้อราที่ก่อโรคในโรงพยาบาลมากกว่า 80% คือ *Candida* (6) นอกจากการติดเชื้อจุลชีพแบบเดี่ยวแล้ว การอยู่ร่วมกันของ *K. pneumoniae* และ *C. albicans* ยังชักนำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มระหว่างอาณาจักรที่โดดเด่นซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงกว่าการติดเชื้อจุลินทรีย์แบบเดี่ยวๆ เช่น ปอด ทางเดินปัสสาวะ บาดแผล และอุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น (7)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย: เพื่อศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มร่วมกันของ *Klebsiella pneumoniae* และ *Candida albicans*

ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวนทั้งหมด 30 สายพันธุ์ และ *C. albicans* จำนวนทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ซึ่งทำการคัดแยกมาจากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ *K. pneumoniae* (ATCC 13883; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) จะถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ ทำการเก็บเชื้อดังกล่าวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2564 ถึง พ.ศ. 2566



การทบทวนวรรณกรรม

1. Biofilm formation

ไบโอฟิล์มเป็นชุมชนสามมิติที่ซับซ้อนของจุลินทรีย์ที่เกาะติดกับพื้นผิวทั้งแบบมีชีวิตและแบบไม่มีชีวิต ซึ่งถูกปกคลุมด้วยสารโพลีเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเอง (EPS) ซึ่งประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์ โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (5) ในตอนเริ่มต้นสัญญาณควอรัม (quorum sensing) ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นการสื่อสารระหว่างเซลล์ภายในชุมชนจุลินทรีย์ จากนั้นจุลินทรีย์จะไปเกาะติดกับพื้นผิวใดๆ ผ่านโครงสร้างการยึดเกาะ เช่น ฟิมเบรีย หลังจากการยึดเกาะ แบคทีเรียจะสร้างไมโครโคโลนีที่ล้อมรอบด้วยสารโพลีเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์ม ในแง่ของกระบวนการแพร่กระจาย รวมถึงการเปลี่ยนแปลงพีโนไทป์ ไบโอฟิล์มที่โตเต็มที่ที่จะแยกออกจากชุมชนเป็นแพลงก์ตอนซึ่งย้ายไปยังพื้นผิวใหม่เพื่อแพร่เชื้อไปยังตำแหน่งอื่น (8)

2. Klebsiella biofilm-associated molecules

การศึกษาก่อนหน้านี้มุ่งเน้นไปที่โมเลกุลพื้นผิวที่สำคัญที่สุดสำหรับ *K. pneumoniae* เช่น ฟิมเบรีย ซึ่งทำหน้าที่ในการยึดเกาะและพอลิแซ็กคาไรด์แบบแคปซูล ที่เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการสื่อสารระหว่างเซลล์ และช่วยให้คงสภาพของโครงสร้างไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ทั้งฟิมเบรียและแคปซูลยังเป็นปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคของแบคทีเรีย (9) ฟิมเบรียชนิดที่ 3 ถูกเข้ารหัสโดยโอเปอเรเตอร์ *mrkABCDF* และประกอบเข้าด้วยกันผ่านทาง *chaperone/usher* โดยโปรตีนที่ถอดรหัส *mrkA* และ *mrkD* มีหน้าที่ยึดเกาะกับพื้นผิวที่ไม่มีชีวิตและมีชีวิต ตามลำดับ (10, 11)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

K. pneumoniae (n=30) และ *C. albicans* (n=8) ถูกรวบรวมจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดเพื่อศึกษาในการทดลองต่อไป. นอกจากนี้ *K. pneumoniae* (ATCC 13883; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) จะถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ โดยเชื้อ *K. pneumoniae* จะถูกเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar (Difco™, Becton, NJ, USA) และ *C. albicans* จะถูกเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) ที่อุณหภูมิ 37°C โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนก่อนนำมาทำการทดลอง

2. การสร้างไบโอฟิล์ม

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกเตรียมตามข้างต้นมาเลี้ยงต่อใน Tryptic soy broth (TSB; Difco™, Becton) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยการเขย่า 200 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 20 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงข้ามคืนจะถูกปรับความเข้มข้นใน TSB ที่ 0.5 McFarland (ประมาณ 1×10^8 CFU/mL) *K. pneumoniae* และ *C. albicans* ที่ปรับความเข้มข้นแล้วจะถูกใส่ลงไปในเพลท 96 หลุม (200 μ L/หลุม) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24, 48,



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 6
วันที่ 6 กันยายน 2566

72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากการบ่ม ไปโอฟิล์มจะถูกย้อมด้วยวิธีมาตรฐานโดยใช้การย้อมสารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.1% (Sigma-Aldrich) เป็นเวลา 15 นาที และล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ ในการวัดปริมาณของไปโอฟิล์ม เพลทที่ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ตจะถูกละลายด้วยกรดอะซิติก 30% (Sigma-Aldrich) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีก่อนการวัดด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง (BioTek) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

3. การทดสอบพิมเบรีย

เตรียมแบคทีเรียตามวิธีการข้างต้น จากนั้นนำแบคทีเรียที่เตรียมไว้ไปหยดลงบนสไลด์แก้วและผสมกับสารละลายที่ประกอบด้วยยีสต์ 1% ใน 1X PBS จากนั้นหมุนสไลด์เบา ๆ จนกว่าจะมองเห็นการเกาะติดกันของแบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งจะทดสอบโดยการใส่และไม่ใส่แมนโนส 5 %

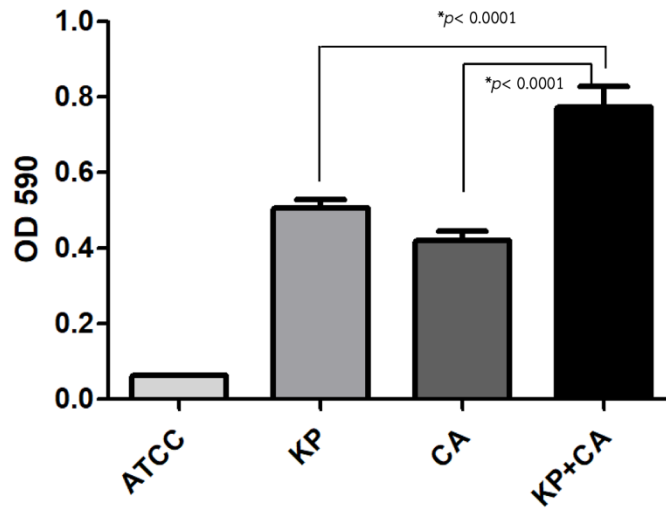
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ย \pm ข้อผิดพลาดมาตรฐาน (SE) จะถูกนำมาใช้สำหรับการนำเสนอข้อมูล และความแตกต่างระหว่างกลุ่มจะถูกตรวจสอบสำหรับนัยสำคัญทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (ANOVA) ตามด้วยการวิเคราะห์ของ Tukey's

ผลการวิจัย

1. การสร้างไปโอฟิล์ม

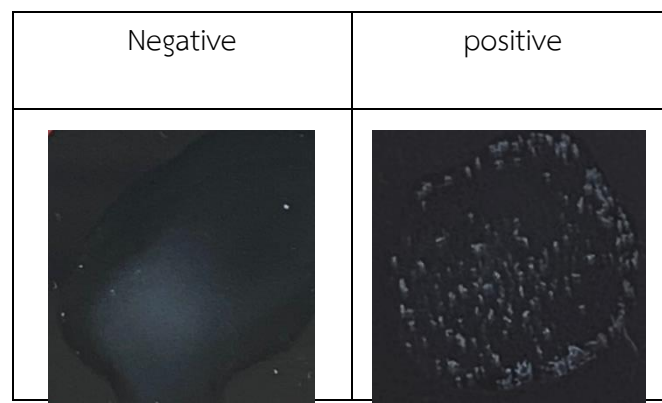
จากการทดสอบการสร้างไปโอฟิล์มของเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 30 สายพันธุ์ และ *C. albicans* จำนวน 8 สายพันธุ์โดยใช้สารละลายคริสตัลไวโอเล็ตและนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างไปโอฟิล์มได้มากที่สุดคือสายพันธุ์ KP79 และ *C. albicans* คือสายพันธุ์ End4737 จากนั้นเมื่อนำเชื้อทั้ง 2 ไปเลี้ยงร่วมกันพบว่ามีการสร้างไปโอฟิล์มมากกว่า *K. pneumoniae* หรือ *C. albicans* เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การสร้างไบโอฟิล์มของ *K. pneumoniae* และ/หรือ *C. albicans* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

2. การทดสอบการสร้างฟิมเบรีย

การทดสอบการเกาะติดกันของยีสต์เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการทดสอบการมีอยู่ของฟิมเบรียหรือฟิลไลในแบคทีเรีย การทดสอบนี้ใช้ประโยชน์จากความสามารถของฟิมเบรียในการจับกับตัวรับเฉพาะบนผิวเซลล์ของยีสต์ ซึ่งนำไปสู่การก่อตัวของกลุ่มก้อนหรือการเกาะติดกันที่มองเห็นได้ จากการทดสอบการสร้างฟิมเบรียพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เลือกมาทำการทดสอบนั้นสามารถจับกับตัวรับเฉพาะบนผิวเซลล์ของยีสต์ได้ ทำให้สามารถมองเห็นการเกาะติดกันได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การทดสอบการมีอยู่ของฟิมเบรียโดยวิธีการทดสอบการเกาะติดกันของยีสต์



สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าการอยู่ร่วมกันของ *K. pneumoniae* และ *C. albicans* ทำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่า *K. pneumoniae* เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การสร้างไบโอฟิล์มของ *K. pneumoniae* เริ่มต้นจากการยึดเกาะพื้นผิวโดยใช้ฟิมเบรีย ดังนั้นจึงได้ทดสอบการมีอยู่ของฟิมเบรียซึ่งจากผลการทดลองพบว่า *K. pneumoniae* นั้นมีฟิมเบรีย โดยเป็นฟิมเบรียชนิดที่ 3 ซึ่งเป็น mannose resistance การเติมแมนโนสในการทดสอบอาจมีผลกระทบ ซึ่งแมนโนสเป็นโมเลกุลน้ำตาลที่มักใช้เป็นตัวยับยั้งการแข่งขันในการทดสอบการเกาะติดของฟิมเบรีย ทั้งนี้เนื่องจากฟิมเบรีย หลายชนิด เมื่อเติมแมนโนสลงในทดสอบการเกาะติดกันของยีสต์ แมนโนสจะสามารถแข่งขันกับตัวรับที่พื้นผิวของยีสต์เพื่อจับกับฟิมเบรียของแบคทีเรีย สิ่งนี้อาจลดหรือยับยั้งการเกาะติดกันของยีสต์และแบคทีเรียโดยการปิดกั้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวรับฟิมเบรียและยีสต์ การเติมแมนโนสในการวิเคราะห์ ใช้เป็นตัวควบคุมเพื่อตรวจสอบว่าการเกาะติดกันนั้นจำเพาะต่อการจับที่อาศัยฟิมเบรียหรือไม่ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (12) พบว่าไบโอฟิล์มสามารถก่อให้เกิดโรคและทำให้เกิดการคงอยู่ของการติดเชื้อนานยิ่งขึ้น นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังทำให้เชื้อทนต่อยาปฏิชีวนะและมีความสามารถในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดความท้าทายอย่างมากในการรักษา การอยู่ร่วมกันของสายพันธุ์ *K. pneumoniae* และ *C. albicans* ในไบโอฟิล์มเป็นสิ่งที่น่ากังวลเป็นพิเศษในสถานพยาบาล เนื่องจากสามารถไปเกาะติดกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สายสวนปัสสาวะ ท่อช่วยหายใจ หรือสายสวนหลอดเลือด และก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม เมื่อเชื้อก่อโรคทั้งสองนี้ก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มร่วมกันจะสามารถมีผลเสริมฤทธิ์กันต่อการเกิดโรค ตัวอย่าง ได้แก่ การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะที่เกี่ยวข้องกับสายสวน (CAUTIs) และโรคปอดอักเสบที่เกี่ยวข้องกับเครื่องช่วยหายใจ (VAP) และการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยมักจะแสดงความต้านทานต่อสารต้านจุลชีพที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อจุลชีพชนิดเดียว

ข้อเสนอแนะ

จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกที่เป็นพื้นฐานของการก่อตัวและปฏิสัมพันธ์ภายในไบโอฟิล์ม *Klebsiella-Candida* ความก้าวหน้าในด้านนี้อาจนำไปสู่การปรับปรุงกลยุทธ์ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อโรคเหล่านี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(2):123-44.
2. Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:877995.
3. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629-61.



การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 6
วันที่ 6 กันยายน 2566

4. Dao TT, Liebenthal D, Tran TK, Ngoc Thi Vu B, Ngoc Thi Nguyen D, Thi Tran HK, et al. *Klebsiella pneumoniae* Oropharyngeal Carriage in Rural and Urban Vietnam and the Effect of Alcohol Consumption. PLOS ONE. 2014;9(3):e91999.
5. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(17).
6. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. Nat Rev Microbiol. 2018;16(1):19-31.
7. Maione A, de Alteriis E, Carraturo F, Galdiero S, Falanga A, Guida M, et al. The Membranotropic Peptide gH625 to Combat Mixed *Candida albicans/Klebsiella pneumoniae* Biofilm: Correlation between In Vitro Anti-Biofilm Activity and In Vivo Antimicrobial Protection. J Fungi (Basel). 2021;7(1).
8. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. Front Chem. 2019;7:824.
9. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouveleki LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J. 2017;36(10):1002-5.
10. Gomes AÉ I, Pacheco T, Dos Santos CDS, Pereira JA, Ribeiro ML, Darrieux M, et al. Functional Insights From KpfR, a New Transcriptional Regulator of Fimbrial Expression That Is Crucial for *Klebsiella pneumoniae* Pathogenicity. Front Microbiol. 2020;11:601921.
11. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiol. 2012;7(8):991-1002.
12. Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. Pathogens. 2014;3(3):743-58.