การคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆของแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้จากอุจจาระของหนูซึ่งจำเพาะต่อ *Klebsiella pneumoniae*

Isolation and characterization of bacteriophage against *Klebsiella pneumoniae* from mouse feces

สิริกานต์ มณฑาทิพย์[1]
อัษฎาศ์ ลีพหวนิชกุล[2]
aleelahavanit@gmail.com
[1]นักศึกษาระดับปริญญาโท สหสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Shlhz1215@gmail.com
[2]ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Klebsiella pneumoniae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในตระกูลEnterobacteriaceae และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ รวมทั้งสามารถก่อโรคได้ทั้งในพืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในยุคที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย แบคเทอริโอเฟจ หรือเฟจ ซึ่งได้ชื่อว่าเป็นนักฆ่าในธรรมชาติ ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ข้อดีของเฟจคือ เฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านสูง ไม่รบกวนแบคทีเรียประจำถิ่นตัวอื่นในร่างกาย และสามารถทำการคัดแยกได้จากหลายแหล่ง อาทิ น้ำทะเล น้ำเสีย ดิน และในอุจจาระของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในงานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์คือ เพื่อคัดแยกและศึกษาแบคเทอริโอเฟจจากอุจจาระของหนูที่จำเพาะต่อเชื้อ *K. pneumoniae* (KP_39) ภายหลังทำการคัดแยก พบว่า *Klebsiella* phage (ϕKP_39) มีลักษณะplaqueที่ใส จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนและทำบริสุทธิ์ เพื่อนำมาศึกษาคุณลักษณะต่างๆ โดยพบว่า ϕKP_39 มีความจำเพาะต่อ *K. pneumoniae* ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ จากทั้งหมด19 สายพันธุ์ และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิและpH ต่อการอยู่รอดของ ϕKP_39 พบว่า ϕKP_39 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 20, 30, และ 40 องศาเซลเซียส จะลดลงที่ 50 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อ pH ได้ตั้งแต่ 3-13 แต่จะมีความเสถียรที่pH 6-9 ผลการทดลองจะนำไปสู่การค้นหาแบคเทอริโอเฟจจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งน่าจะใช้ต่อในด้านการต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคในสิ่งมีชีวิตได้ดี

คำสำคัญ: แบคเทอริโอเฟจ, เคลบเซลลา นิวโอเนียอี, เชื้อที่ดื้อยา

Abstract

Klebsiella pneumoniae is described as a Gram-negative, non-motile bacterium and being a multi-drug-resistant pathogen. Bacteriophages are known as bacterial natural killers because they can be found ubiquitously and are seen as an alternative tool for bacterial infection and drug resistance because they are able to destroy the target pathogens without resulting in commensal microbiota. This study aims at the Isolation and characterization of

bacteriophage against *K. pneumoniae* from mouse feces (KP_39). After propagation and purification, ϕKP_39 showed a clear plaque. The host range test of ϕKP_39 was able to infect 6 out of the 19 *K. pneumoniae*. The thermal and pH sensitivity test of ϕKP_39 was stable at 4, 20, 30, and 40°C and reduced at 50°C. Moreover, ϕKP_39 was able to survive at pH 3–13 and stable pH of 6–9. The isolation of phages from samples of the animal might be more specific to the pathogenic bacteria.

Keywords: Bacteriophage, *Klebsiella pneumoniae*, drug-resistant bacteria

บทนำ

เมื่อการรักษาโรคที่ติดเชื้อจากแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะมีข้อจำกัด เนื่องจากมีการดื้อยาของแบคทีเรีย หนึ่งในเชื้อที่พบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงคือ *K. pneumoniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในตระกูล Enterobacteriaceae รูปร่างแท่ง แคปซูลหนา เคลื่อนที่ไม่ได้ เป็นเชื้อฉวยโอกาสในโรงพยาบาล และยังเป็นสาเหตุของหลายโรค อาทิ โรคปอดบวม การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อที่ผิวหนังแบบเรื้อรัง และการติดเชื้อในกระแสเลือด(1) เมื่อยาปฏิชีวนะใช้ไม่ได้ผล แบคเทอริโอเฟจ ถูกมองว่าเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียเจ้าบ้าน ไม่รบกวนจุลินทรีย์ประจำถิ่น(2) และไม่ก่ออันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ นอกจากนี้การคัดแยกเฟจ สามารถทำได้ง่าย เนื่องจากเราสามารถพบเฟจได้ในทุกบริเวณที่มีแบคทีเรียสร้างอาณานิคมอยู่ อาทิ ในน้ำทะเล น้ำเสีย ดิน และในอุจจาระของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงมนุษย์ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ คัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆของแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้จากอุจจาระของหนูซึ่งจำเพาะต่อ *K. pneumoniae*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะต่างๆของแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้จากอุจจาระของหนูซึ่งจำเพาะต่อ *K. pneumoniae*

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ มุ่งเน้นในการคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจในอุจจาระของหนูที่จำเพาะต่อ *K. pneumoniae* (KP_39) ที่ผ่านการทดสอบมาก่อนหน้าแล้วว่า มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูง จากนั้นทำการคัดแยก เพิ่มจำนวน และทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 และทำการทดสอบคุณลักษณะด้านต่างๆ ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และการศึกษาผลของอุณหภูมิและpH ต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ

การทบทวนวรรณกรรม

1. K*lebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แคปซูลหนา เคลื่อนที่ไม่ได้ รูปร่างแท่ง อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae และเป็นเชื้อประจำถิ่น ในหลายบริเวณ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจส่วนต้น *K. pneumoniae* เป็นหนึ่งในเชื้อที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ได้แก่ การติดเชื้อปอดอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ในปี 2019 *K. pneumoniae* ถูกจัดว่าเป็นเชื้อที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอยู่ในลำดับที่สาม รองลงมาจาก *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*(3)

2. แบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ หรือเฟจ เป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีการดำรงชีวิตแบบปรสิตและต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านอย่างแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวนตัวเอง โดยเฟจมีวงจรชีวิต 2 แบบ คือ ไลติกเฟจ (lytic phage) และไลโซเจนิคเฟจ (lysogenic phage) ไลติกเฟจถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย อาทิ เช่น การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด และปอดบวม และไม่นานมานี้ แบคเทอริโอเฟจกลับมาได้รับความสนใจมากขึ้น ในฐานะของ ทางเลือกในการทดแทนยาปฏิชีวนะในยุคที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย(4)

3. การใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย *K. pneumoniae*

ปัจจุบัน มีงานวิจัยที่มีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอเฟจในการควบคุมการติดเชื้อที่เกิดจาก *K. pneumoniae* มีจำนวนมาก อาทิเช่น มีรายงานว่าผู้ป่วยหญิงโดยระเบิด เป็นแผลที่ขา ติดเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ มีการบำบัดด้วยเฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะพบว่า ปริมาณแบคทีเรียมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (5) อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่ทำการคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ MDR *K. pneumoniae* ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล(6, 7) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การคัดแยกและศึกษาแบคเทอริโอเฟจนั้นจึงมีความสำคัญอย่างมากในยุคที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *K. pneumoniae*

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยก เพิ่มจำนวน และทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *K. pneumoniae* (phage isolation, propagation, and purification)

การคัดแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *K. pneumoniae* (KP_39) จะทำการผสมอุจจาระของหนูแบคทีเรีย KP_39 ในระยะ mid-log phase และอาหารเหลวTSB ด้วยอัตราส่วน 20:20:60 จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm นำไปปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm 1 ชั่วโมง นำส่วนใสไปกรองผ่านตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปทำ overlay agar assay(8) โดยใช้pipette ดูดส่วนใส 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 500 ไมโครลิตร ของ KP_39 (ความเข้มข้น 10^8 CFU/mL) และเติม 0.7% molten soft agar (TSB ที่มี agar 0.7%) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หมุนวนเพลทให้สารกระจาย และนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจ ใช้pipette tip เขี่ย single plaque นำมาผสมกับTSB และแบคทีเรียในระยะ mid-log phase นำไปบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนใสไปทำการทดสอบด้วย overlay agar assay

การทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอเฟจ ใช้วิธีที่ได้อธิบายไปในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน โดยจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้แน่ใจว่า single plaque ของแบคเทอริโอเฟจนั้นมีความบริสุทธิ์แล้ว

2. การศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range test)

การศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นจะใช้วิธี spot test โดยทำการผสมกับ 500 ไมโครลิตรของ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท (ความเข้มข้น 10^8 CFU/mL) และเติม 0.7% molten soft agar ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นหมุนวนเพลทให้สารกระจาย และหยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (ϕKP_39) ความหนาแน่น 10^9 PFU/mL ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น (clear zone)

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิและpH ต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ (thermal and pH sensitivity test)

การศึกษาผลของอุณหภูมิและpH ต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ นำแบคเทอริโอเฟจที่ความหนาแน่น 10^9 PFU/mL บ่มที่อุณหภูมิต่างๆได้แก่ 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่pH 1-14 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้pipette ดูดแบคเทอริโอเฟจปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 900 ไมโครลิตรของแบคทีเรีย KP_39 ที่ความหนาแน่น 10^8 และทำวิธี overlay agar assay

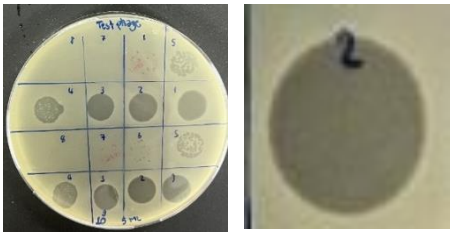
5.การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ one-way ANOVA และ *t*-test ทั้งนี้การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดพิจารณาความแตกต่างที่นัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 9

ผลการวิจัย

1. การคัดแยก เพิ่มจำนวน และทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *K. pneumoniae* (phage detection, propagation, and purification)

จากการคัดแยก เพิ่มจำนวน และทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *K. pneumoniae* (KP_39) พบว่ามีแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ KP_39 หลายตัว แต่พบว่า ϕKP_39 ที่เลือกมานั้น มีโซนใสที่ชัดเจน จากนั้นนำมาทำการเพิ่มจำนวน และทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอเฟจ พบว่ามีความหนาแน่นของเฟจที่ 10^9 PFU/mL (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะplaque ที่ปรากฏบนสนามของแบคทีเรีย (lawn of bacteria)

2. การศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range test)

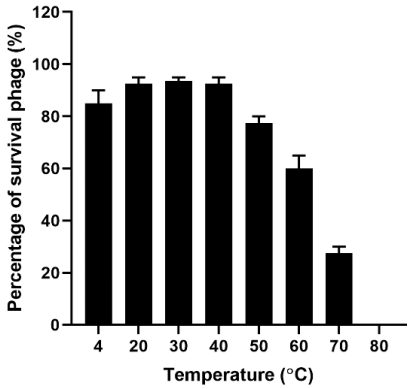
การศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยใช้ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot test พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 สามารถติดเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

Host	KP12	KP15	KP35	KP38	KP39	KP48	KP49	KP52	KP63	KP71	KP72	KP79	KP82	KP94	KP95	ATCC13883	PO789	SP1091	H1114
ϕKP_39	■	■			■	■	■	■											

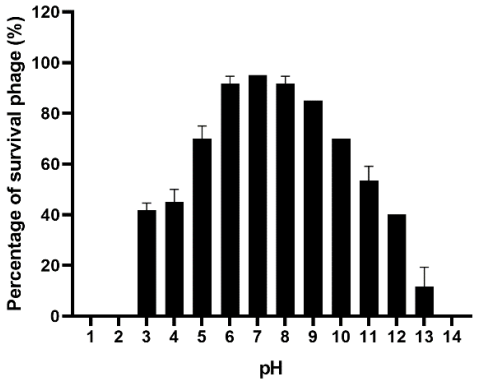
ตารางที่ 1 ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิและpH ต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ (thermal and pH sensitivity test)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 4, 20, 30, 40 องศาเซลเซียส และจะค่อยๆลดลงที่ 50 องศาเซลเซียส และไม่สามารถตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (กราฟที่1) ในการศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจนั้น พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 มีความเถียรที่pH 6-9 และสามารถอยู่รอดได้ตั้งแต่ pH 3-13 (กราฟที่2)



กราฟที่ 1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39



กราฟที่ 2 การศึกษาผลของpHต่อการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาและคัดแยกแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้จากอุจจาระของหนู พบว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *K. pneumoniae* (KP_39) และภายหลังการเพิ่มจำนวน ทำบริสุทธิ์ และนำมาศึกษาคุณลักษณะต่างๆ พบว่า ϕKP_39 มีลักษณะของplaque ที่ใส การทดสอบการศึกษาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า สามารถติดเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ จาก 19 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านสูง ในการศึกษาอัตราการอยู่รอดของแบคเทอริโอเฟจ ϕKP_39 ที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ พบว่า ϕKP_39 มีความเสถียรที่อุณหภูมิตั้งแต่ 4-40 องศาเซลเซียส และจะลดลงที่ 50 องศาเซลเซียส รวมทั้งไม่พบแบคเทอริโอเฟจที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า ϕKP_39 มีความสามารถในการอยู่รอดตั้งแต่ pH 3-13 แต่จะมีความเสถียรที่ pH 6-9 จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ในอุจจาระของหนู เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่เราจะสามารถศึกษาและคัดแยกแบคเทอริโอเฟจซึ่งจำเพาะต่อ *K. pneumoniae* เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในสภาวะที่มีการดื้อต่อยาที่แบคทีเรีย *K. pneumoniae*

เอกสารอ้างอิง

1. Anderson DJ, Engemann JJ, et al. Predictors of Mortality in Patients with Bloodstream Infection Due to Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006;50(5):1715-20.
2. Stone E, Campbell K, et al. Understanding and Exploiting Phage-Host Interactions. Viruses. 2019;11(6).
3. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022;399(10325):629-55.
4. O'Sullivan L, Buttimer C, et al. Bacteriophage-based tools: recent advances and novel applications. F1000Res. 2016;5(2782).
5. Eskenazi A, Lood C, et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Nat Commun. 2022;13(1):302.
6. Cortez KJ, Roilides E, et al. Infections Caused by Scedosporium spp. Clinical Microbiology Reviews. 2008;21(1):157-97.
7. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. Frontiers in Microbiology. 2021;12.
8. Stachurska X, Roszak M, et al. Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification. Antibiotics (Basel). 2021;10(11).