



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องมือทำลายเชื้อโรค
(Sterilants) สารฆ่าเชื้อโรคที่ใช้กับอุปกรณ์ทางการแพทย์ (Disinfectants)
และสารฆ่าเชื้อโรคที่ใช้ภายนอกร่างกาย (Antiseptics) ต่อการทำลายไบโอฟิล์ม
ของเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาล

โดย อ.ดร.นพ.พลวัฒน์ ดิ่งเพชรและคณะ

กรกฎาคม 2559

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องมือทำลายเชื้อโรค (Sterilants) สารฆ่าเชื้อโรคที่ใช้กับอุปกรณ์ทางการแพทย์ (Disinfectants) และสารฆ่าเชื้อโรคที่ใช้ภายนอกร่างกาย (Antiseptics) ต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาล

Biofilms Decontamination: Measurements of the Effectiveness of Decontamination Agents and Methods against Biofilms Formed by Common Nosocomial Pathogens

คณะผู้วิจัย

1. อ.ดร.นพ.พลวัฒน์ ตั้งเพชร
2. ผศ.ดร.สุมาลี คอนโด

สังกัด

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องมือทำลายเชื้อโรค (Sterilants) สารฆ่าเชื้อโรคที่ใช้กับอุปกรณ์ทางการแพทย์ (Disinfectants) และสารฆ่าเชื้อโรคที่ใช้ภายนอกร่างกาย (Antiseptics) ต่อการทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาล

ภูมิหลัง: ปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญระดับนานาชาติ เนื่องจากส่งผลต่อการดูแลรักษาชีวิตของผู้ป่วยรวมทั้งต่อเศรษฐกิจเนื่องจากการจัดการปัญหาดังกล่าวต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูง ปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลนั้นส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีความทนทานต่อการทำลายโดยยาปฏิชีวนะ โดยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุในโรงพยาบาลได้แก่ *Staphylococcus aureus* (ทั้งสายพันธุ์ Methicillin-sensitive *S. aureus* และ Methicillin-resistant *S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น เชื้อเหล่านี้สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมโรงพยาบาลรวมถึงภายในร่างกายของผู้ป่วยและบุคลากรทางการแพทย์ โดยพบว่าการเจริญเติบโตของเชือนั้นเกิดขึ้นในรูปแบบจำเพาะที่เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งการเจริญเติบโตในลักษณะดังกล่าวทำให้เชื้อมีความทนทานต่อการถูกทำลายมากยิ่งขึ้น เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อที่ก่อโรคในโรงพยาบาล (Nosocomial pathogens) มีความดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่าเชื้อที่ติดมาจากชุมชน แต่ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความทนทานของเชื้อเมื่อเจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มต่อการถูกกำจัดโดยเครื่องมือทำลายเชื้อโรค เช่น หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Steam Sterilization or Autoclave) เครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Irradiation) สารฆ่าเชื้อที่ใช้กับอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น สารกำจัดไบโอฟิล์ม (Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner; 3M™) ซึ่งเครื่องมือและสารเคมีเหล่านี้เป็นวิธีการที่ใช้ในการกำจัดเชื้อในโรงพยาบาล

วัตถุประสงค์: การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องมือที่ใช้ในการกำจัดเชื้อก่อโรค ต่อการทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นโดยเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาล

วัสดุและวิธีการ: เพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, ESBL-producing *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* ให้เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มใน Calgary Biofilm Device และในโมเดลการเลี้ยงไบโอฟิล์มที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ แล้วนำเชื้อที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มไปทดสอบกับ รังสีอัลตราไวโอเลต หม้อนึ่งอัดไอน้ำ และ Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner (3M™) โดยวัดความสามารถในการกำจัดเชื้อของเครื่องมือด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และวัดความสามารถในการทำลายไบโอฟิล์มของเครื่องมือด้วยวิธีการย้อมไบโอฟิล์มด้วย crystal violet

ผลการศึกษา: ภายใต้การทดสอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตจากเครื่อง Biosafety cabinet with UV เชื้อ *A. baumannii* ถูกทำลายที่ 1 นาที เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*,

MRSA, ESBL-producing *E. coli* ถูกทำลายที่ 5 นาที ในขณะที่ *E. coli* ถูกทำลายที่ 20 นาที และ ต้องใช้เวลาถึง 30 นาทีในการทำลายเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม ส่วนใน UV sterilizer เชื้อ *A. baumannii* และ MRSA ถูกทำลายที่ 1 นาที เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, และ ESBL-producing *E. coli* ถูกทำลายที่ 5 นาที ในขณะที่ต้องใช้เวลาถึง 20 นาทีในการทำลายเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มได้หมด อย่างไรก็ตามปริมาณไบโอฟิล์มจากการวัดด้วย crystal violet และลักษณะของไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนระหว่างตัวอย่างที่ได้รับการฉายรังสีไม่แตกต่างกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการฉายรังสี ภายใต้การทดสอบด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ หรือ Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที 15 psi พบว่าเชื้อถูกทำลายทั้งหมด แต่ไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ และภายใต้การทดสอบด้วย Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner (3M™) พบว่าวิธีนี้มีความสามารถในการกำจัดไบโอฟิล์มได้ดี แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้

สรุป: เครื่องมือที่ใช้ในการทำลายเชื้อในโรงพยาบาลที่สำคัญคือ หม้อนึ่งอัดไอน้ำ และเครื่องมือที่ใช้ในการกำจัดเชื้อในสิ่งแวดล้อมโรงพยาบาลที่สำคัญคือ เครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหม้อนึ่งอัดไอน้ำและการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อในไบโอฟิล์ม แต่ไม่ได้กำจัดไบโอฟิล์มให้หมดไป ในขณะที่ Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner (3M™) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ทางการแพทย์สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ดีแต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ ข้อมูลที่ได้ี้มีความสำคัญสำหรับการนำมาใช้เพื่อการควบคุมและกำจัดเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล

คำสำคัญ: ไบโอฟิล์ม, การติดเชื้อในโรงพยาบาล, การกำจัดเชื้อ, การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต, การใช้หม้อนึ่งอัดแรงดันไอน้ำ

Abstract

Biofilms Decontamination: Measurements of the Effectiveness of Decontamination Agents and Methods against Biofilms Formed by Common Nosocomial Pathogens

Background: Healthcare-associated infection (HAI), or nosocomial infection, has been an urgent problem globally. It is a significant cause of morbidity and mortality among people who receive hospital or healthcare services, and over millions of patients are affected by HAI every year worldwide. It also creates a significant economic burden as the overall costs arising from HAI are very high. HAI is usually resulted from infections by bacterial pathogens. Common causative pathogens include *Staphylococcus aureus* (both methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains), coagulase negative Staphylococci (such as *Staphylococcus epidermidis*), *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. These pathogens dwell in the hospital environment as well as colonize on the human skin, nasal cavity or in the gastrointestinal tract. There is a growing body of evidence showing that the growth of bacteria in nature is in the form of biofilms. Bacteria growing within biofilms are more resistant to treatment with antimicrobial agents than planktonic cells of the same species. Biofilms are involved in a variety of infectious conditions such as catheter-associated infections, urinary tract infections, infections of prostheses and heart valves, bacterial endocarditis, dental plaque and gingivitis, and infections in people with cystic fibrosis. In healthcare facilities, biofilms can be commonly found on various surfaces and settings. Such biofilms serve as a possible source of transmission, contributing to the increasing incidence of hospital-acquired infections. While hospitals generally have sanitation protocols regarding surface bio-decontamination and equipment sterilization, they are not created specifically to deal with biofilms. There is limited available data concerning the true efficacy of such sterilization methods as well as for the use of disinfectants or detergents against biofilms.

Objectives: The main objective of this study was to measure the efficacy of decontamination agents and methods against biofilms formed by common nosocomial pathogens. We tested the efficacy of UV Irradiation, Steam Sterilization (Autoclave) in adjunct with the usage of multi-enzymes biofilm removal (3MTM). A novel model supporting the growth of biofilms was also developed to aid the tests against Autoclave decontamination.

Results: When tested biofilms with Biosafety cabinet with UV irradiation, it was found that *A. baumannii* was completely destroyed within 1 minute, *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, ESBL-producing *E. coli* were destroyed within 5 minutes, *E. coli* was destroyed within 20 minutes and it took up to 30 minute to eliminate all vital *P. aeruginosa* that grew in biofilms. For UV sterilizer, it was found that *A. baumannii* and MRSA were completely destroyed within 1 minute, *S. aureus*, *S. epidermidis* and ESBL-producing *E. coli* were destroyed within 5 minutes, and it took up to 20 minute to eliminate all vital *P. aeruginosa* and *E. coli* that grew in biofilms. However, the biofilms of each pathogen were not removed by these instruments. The microscopic characteristics of biofilms were no change between samples that exposed to UV and that did not expose. When tested biofilm against the steam sterilization (Autoclave), all pathogens were completely destroyed. However, the biofilms were not eliminated. When pre-treated biofilm samples with Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner (3MTM) prior to the steam sterilization, the complete removal of biofilms was observed. However, using Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner alone could not destroy the bacteria.

Conclusion: Two common and important methods of decontamination within the healthcare facilities are Autoclave and UV irradiation. This study demonstrated that the two methods can eliminate the bacterial pathogen commonly causing nosocomial infections. However, they cannot eliminate biofilms of those pathogens. Combined usage of chemicals such as Biofilm Removal Multi-Enzyme Cleaner (3MTM) can improve the effectiveness of these decontamination methods.

Keywords: Biofilms, Nosocomial Infections, Decontamination, UV Irradiation, Steam Sterilization

1. ทบทวนวรรณกรรม

1.1 การติดเชื้อในโรงพยาบาล (Healthcare Associated Infection)

1.1.1 นิยามของการติดเชื้อในโรงพยาบาล

การติดเชื้อในโรงพยาบาล หรือ Healthcare Associated Infection หรือ hospital-acquired infection (หรือ HAI) หรือ nosocomial infection หมายถึงการที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อในขณะที่ได้รับการรักษาพยาบาล ซึ่งจากนิยามโดย Centre of Disease Control and Prevention (สหรัฐอเมริกา) ได้กำหนดไว้คือ ผู้ป่วยต้องมีอาการ อาการแสดง หรือผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ที่บ่งบอกว่ามีการติดเชื้อทั้งที่เกิดขึ้นเฉพาะส่วน (localized infections) หรือติดเชื้อทุกระบบในร่างกาย (systemic infections) ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากวันที่ 3 ของการนอนโรงพยาบาล โดยก่อนหน้าวันดังกล่าว ผู้ป่วยต้องไม่มีอาการ อาการแสดง หรือผลตรวจที่บ่งบอกว่ามีการติดเชื้อ¹

1.1.2 ระบาดวิทยาและผลกระทบทางเศรษฐกิจของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

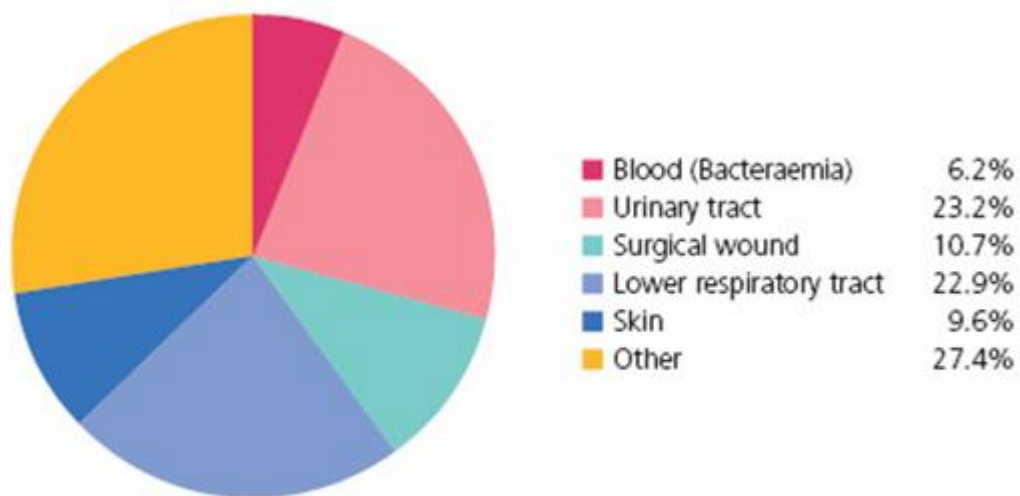
การติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก ซึ่งทำให้เกิดการเสียชีวิตและความพิการจำนวนมาก จากการสำรวจจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 2002 พบว่า มีผู้ติดเชื้อทั้งหมดประมาณ 1.7 ล้านราย โดยเป็นผู้ป่วยเด็กแรกเกิดในแผนก ICU 33,269 ราย และเด็กแรกเกิดนอกแผนก ICU 19,059 ราย เป็นเด็กโตและผู้ใหญ่ในแผนก ICU จำนวน 417,946 ราย และที่เหลือ 1,266,851 รายเป็นเด็กโตและผู้ใหญ่นอกแผนก ICU มีผู้เสียชีวิตทั้งหมด 98,987 ราย โดย 35,967 รายเสียชีวิตจากการติดเชื้อในปอด (pneumonia), 30,665 รายเสียชีวิตจากการติดเชื้อในกระแสเลือด (bloodstream infections) และ 13,088 รายเสียชีวิตจากการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infections)² ซึ่งการติดเชื้อในโรงพยาบาลนี้ส่งผลให้เกิดรายจ่ายสูงถึง 11,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (หรือประมาณ 360,000 ล้านบาท)

เช่นเดียวกับในประเทศอังกฤษ มีรายงานการคำนวณค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับการรักษาและจัดการการติดเชื้อในโรงพยาบาล คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 1 พันล้านปอนด์ (หรือประมาณ 54,000 ล้านบาท)³

สำหรับในประเทศไทย ได้มีการสำรวจใน 20 โรงพยาบาลทั่วประเทศเมื่อปี ค.ศ. 2006 พบว่า จากผู้ป่วยทั่วประเทศจำนวนทั้งสิ้น 9,865 ราย มีอัตราการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล 6.5% โดยพบว่าโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยมีอัตราดังกล่าวสูงที่สุด (7.6%) รองลงมาคือโรงพยาบาลศูนย์ (6.0%) และโรงพยาบาลทั่วไปหรือโรงพยาบาลชุมชน (4.9%)⁴

1.1.3 การติดเชื้อในโรงพยาบาลในระบบต่างๆ

ในปัจจุบันเนื่องด้วยวิวัฒนาการทางการแพทย์ก้าวหน้า มีการทำหัตถการหรือการรักษาที่บุกรุก (invasive procedures) เพื่อใช้ตรวจหรือรักษาผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถเป็นช่องทางให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้ รูปที่ 1.1 แสดงการติดเชื้อที่พบบ่อยในระบบต่างๆ ได้แก่ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งสัมพันธ์กับการใส่สายสวนปัสสาวะ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งสัมพันธ์กับการใส่ท่อช่วยหายใจ การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด ซึ่งสัมพันธ์กับชนิดของการผ่าตัด และการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งสัมพันธ์กับการใส่สายสวนหลอดเลือด (catheter) เป็นต้น⁵



รูปที่ 1.1 อัตราส่วนของอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลแยกตามระบบ⁵

1.1.4 เชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

จากรายงานการสำรวจเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาล (nosocomial bloodstream infection) ในผู้ป่วยทั่วประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 24,179 ราย พบว่า เชื้อ coagulase-negative *Staphylococci* ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นอันดับแรก รองลงมาคือ *Staphylococcus aureus* ดังในตารางที่ 1.1 ซึ่งแสดงถึงเชื้อก่อโรคที่พบบ่อย 10 อันดับแรกที่เป็นสาเหตุของ nosocomial bloodstream infection⁶

ตารางที่ 1.1 เชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อในกระแสเลือดที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่เข้ารับการ
รักษาในโรงพยาบาลในประเทศสหรัฐอเมริกา⁶

Pathogen	BSIs per 10,000 admissions	Percentage of BSIs (rank)			Crude mortality, %		
		Total (n = 20,978)	ICU (n = 10,515)	Non-ICU ward (n = 10,442)	Total	ICU	Non-ICU ward
CoNS	15.8	31.3 (1)	35.9 (1) ^a	26.6 (1)	20.7	25.7	13.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	10.3	20.2 (2)	16.8 (2) ^a	23.7 (2)	25.4	34.4	18.9
<i>Enterococcus</i> species ^c	4.8	9.4 (3)	9.8 (4)	9.0 (3)	33.9	43.0	24.0
<i>Candida</i> species ^c	4.6	9.0 (4)	10.1 (3)	7.9 (4)	39.2	47.1	29.0
<i>E. scherichia coli</i>	2.8	5.6 (5)	3.7 (8) ^a	7.6 (5)	22.4	33.9	16.9
<i>Klebsiella</i> species	2.4	4.8 (6)	4.0 (7) ^a	5.5 (6)	27.6	37.4	20.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.1	4.3 (7)	4.7 (5)	3.8 (7)	38.7	47.9	27.6
<i>Enterobacter</i> species	1.9	3.9 (8)	4.7 (6) ^a	3.1 (8)	26.7	32.5	18.0
<i>Serratia</i> species ^b	0.9	1.7 (9)	2.1 (9) ^a	1.3 (10)	27.4	33.9	17.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.6	1.3 (10)	1.6 (10) ^a	0.9 (11)	34.0	43.4	16.3

NOTE. *Bacteroides* species (n = 150; 1.4% of isolates) ranked ninth in non-ICU wards. CoNS, coagulase-negative staphylococci.

^a P < .05 for patients in ICUs vs. patients in non-ICU wards.

^b Significantly more frequent in patients without neutropenia.

^c Significantly more frequent in patients with neutropenia.

สำหรับในประเทศไทย จากการสำรวจโดยสมหวัง ด้านชัยวิจิตรและคณะ
พบว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับแรก รองลงมาคือ *Klebsiella*
spp. และ *Acinetobacter buamannii* ดังแสดงในตารางที่ 1.2⁴

ตารางที่ 1.2 เชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศไทย⁴

Pathogens	Categories of hospitals, %				Total average %
	U	R	P	O	
Pathogens identified	75.8	73.9	58.1	70.6	70.8
No growth	6.9	1.2	10.9	13.0	7.9
Culture not done	13.4	22.4	23.3	11.3	16.7
Result not available	3.9	2.5	7.8	5.1	4.6
Bacteria					
Gram-positive	20.3	20.5	14.0	23.2	19.9
MRSA*	5.6	4.3	0.8	7.9	5.0
MSSA**	3.9	3.7	3.1	0.6	2.9
<i>Enterococcus</i> spp.	3.0	5.0	2.3	6.8	4.3
Other	7.8	7.5	7.8	7.9	7.7
Gram-negative	72.0	75.2	61.2	70.1	70.2
<i>P. aeruginosa</i>	13.8	13.0	11.6	14.7	13.4
<i>Klebsiella</i> spp.	10.3	16.1	12.4	5.6	10.9
<i>A. baumannii</i>	12.1	16.8	5.0	6.8	10.7
<i>E. coli</i>	12.9	6.8	10.1	15.8	6.9
Other	22.9	22.5	22.1	27.2	28.3
Fungus	8.2	5.0	2.3	6.8	6.0
Virus	0.9	0	0	0.6	0.4
Other	0.4	1.9	9.3	6.8	4.0

* MRSA = methicillin resistant *S. aureus*

**MSSA = methicillin sensitive *S. aureus*

1.1.5 การควบคุมการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดผลกระทบทั้งทางสาธารณสุขและทาง เศรษฐกิจ การเฝ้าระวังและการควบคุมเพื่อลดการเกิดปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็นเร่งด่วน โดยต้องพิจารณาทั้งในด้านการบริหารจัดการ ได้แก่ การกำหนดนโยบายและมาตรการการปฏิบัติสำหรับบุคลากร การให้การศึกษาแก่บุคลากร หรือ การแยกผู้ป่วย เป็นต้น และในด้านการจัดโครงสร้างของโรงพยาบาล ได้แก่ การใช้วัสดุที่ง่ายต่อการรักษาความสะอาด การมีอุปกรณ์อำนวยความสะดวกสำหรับล้างมือก่อนและหลังสัมผัสผู้ป่วย การสร้างหอผู้ป่วยไม่แออัด ให้มีการระบายอากาศที่ดี หรือมีการแยกบริเวณที่สะอาดและสกปรกออกจากกัน เป็นต้น⁷

หนึ่งในมาตรการสำคัญที่ปฏิบัติกันทั่วไป คือ การแยกผู้ป่วยโรคติดเชื้อ (Isolation precautions) โดย Center of Disease Control and Prevention (สหรัฐอเมริกา) ได้จัดทำข้อปฏิบัติซึ่งเป็นแนวทางที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ข้อปฏิบัติทั่วไป เช่น การล้างมือและการใช้ถุงมือ การจัดบริเวณให้ผู้ป่วยที่เหมาะสม และการทำความสะอาดห้องเมื่อผู้ป่วยย้ายออกจากห้อง เป็นต้น⁸

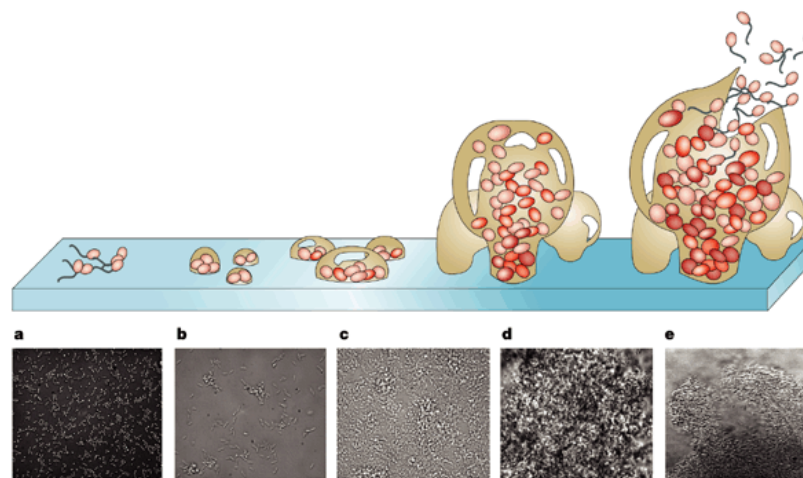
1.2 ไบโอฟิล์ม (Biofilms)

1.2.1 ความหมายของไบโอฟิล์ม

การศึกษาทางจุลชีววิทยาในอดีตมักเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth culture) ซึ่งเชื้อที่เจริญเติบโตในลักษณะนี้มักล่องลอยหรือว่ายอยู่ในอาหารที่เลี้ยง การเจริญเติบโตในลักษณะนี้เรียกว่าเป็นแบบ planktonic mode of growth แต่ในธรรมชาติ หรือในโรคติดเชื้อต่างๆ เชื้อก่อโรคเหล่านี้มักเจริญเติบโตในรูปแบบพิเศษที่เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (biofilms) ซึ่งตามความหมายคือ การเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อมีจำนวนเชื้ออยู่ร่วมกันหลายเซลล์ โดยแบคทีเรียเซลล์บางส่วนจะยึดเกาะกับพื้นผิวและบางส่วนจะเจริญเป็นโครงสร้างจำเพาะ ซึ่งทั้งหมดจะถูกเคลือบด้วยสารโพลีเมอร์ที่เชื้อผลิตขึ้นมา (A structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced polymeric matrix and adherent to an inert or living surface.)⁹ โดยปัจจุบันพบว่า แบคทีเรียที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มนี้มีบทบาทสำคัญทางการแพทย์มากมาย ดังที่จะได้กล่าวต่อไป

1.2.2 โครงสร้างของไบโอฟิล์ม

การศึกษาด้านโครงสร้างของไบโอฟิล์มของเชื้อชนิดต่างๆที่เจริญในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย พบว่า โครงสร้างของไบโอฟิล์มมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะในด้านโครงสร้างที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะต่างๆ¹⁰ โดยพบว่าโครงสร้าง 73 - 98% เป็นสารโพลีเมอร์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) และช่องว่างสำหรับลำเลียงสารอาหาร (water channels) โดยมีกลุ่มของเซลล์กระจาย (microcolonies) อยู่ภายใน¹¹ จากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างในระดับยีนส์และการแสดงออกของยีนส์ พบว่า กระบวนการเกิดไบโอฟิล์มประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 5 ขั้นตอน คือ (a) reversible attachment, (b) irreversible attachment, (c) early maturation, (d) late maturation และ (e) dispersion ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 ขั้นตอนการเกิดและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในรูปแบบไบโอฟิล์ม¹¹

1.2.3 บทบาทของไบโอฟิล์มต่อการก่อโรค

วิทยาการทางการแพทย์ในปัจจุบันทำให้เราทราบถึงบทบาทของไบโอฟิล์มต่อการก่อโรคมามากขึ้น¹² ภาวะที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์ม เช่น การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการใส่สายสวนปัสสาวะ การให้สารน้ำทางหลอดเลือดหรือการใส่ท่อช่วยหายใจเป็นระยะเวลานาน การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการใส่ขั้วเทียม เป็นต้น¹² Donlan และคณะ ตั้งข้อสังเกตว่า เหตุผลที่แบคทีเรียเจริญเติบโตในรูปแบบไบโอฟิล์มก็เพื่อให้เซลล์ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมและมีชีวิตอยู่ได้มากขึ้น¹⁰ การที่กลุ่มเซลล์เชื้อโรคยึดเกาะกับพื้นผิว นอกจากจะเป็นการสร้างความมั่นคงทางหนึ่งให้กับตัวเชื้อและไบโอฟิล์มแล้ว ยังส่งผลเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเชื้อที่ยึดเกาะด้วย¹³ โดยพบว่าแบคทีเรียที่เจริญภายในไบโอฟิล์มมีความทนทานต่อสารจากภายนอกที่อาจก่อโทษแก่ไบโอฟิล์ม เช่นยาปฏิชีวนะ เป็นต้น¹⁴ ซึ่งมีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในรูปแบบนี้มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียที่เจริญในรูปแบบ planktonic ถึงประมาณ 1000 เท่า¹⁵ เชื่อว่าการที่เชื้อถูกปกป้องด้วยสารโพลีเมอร์ที่เชื้อผลิต เป็นกลไกสำคัญที่

ทำให้ยาไม่สามารถผ่านเข้าไปทำลายเชื้อที่อยู่ภายในได้^{14,15} ซึ่งนอกจากยาปฏิชีวนะแล้ว ยังพบว่าภูมิคุ้มกันของร่างกายก็ไม่สามารถทำลายเชื้อได้อย่างที่ควรจะเป็น¹⁶

1.2.4 ไบโอฟิล์มในสิ่งแวดล้อมและการก่อโรค

นอกจากความสามารถในการก่อโรคโดยตรงของไบโอฟิล์มแล้ว เรายังพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในโรงพยาบาล มีลักษณะการเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมในรูปแบบไบโอฟิล์มด้วย โดยแหล่งที่พบได้บ่อย เช่น ท่อระบายน้ำ ท่ออากาศ อ่างล้างมือ หรือแม้แต่ตามเครื่องช่วยหายใจ เป็นต้น¹⁷ ข้อมูลในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่า เชื้อที่เจริญในรูปแบบนี้มีบทบาทสำคัญโดยเป็นแหล่งแพร่กระจายจากสิ่งแวดล้อมสู่ผู้ป่วย ซึ่งนำไปสู่ปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาลอันเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ในขณะนี้ ตัวอย่างเชื้อเหล่านี้ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas* spp. เป็นต้น^{17,18}

1.3 ที่มาและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

การลดอุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นสิ่งสำคัญที่บุคลากรทางสาธารณสุขในทุกระดับจะต้องตระหนัก จากการพบว่าไบโอฟิล์มมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดังกล่าว¹⁹ การค้นหาวิธีกำจัดไบโอฟิล์มอย่างมีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำอย่างเร่งด่วน การทำความสะอาดผู้ป่วย (patient decolonization) เช่น การล้างมือ หรือการอาบน้ำด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (skin decolonization) การทำความสะอาดห้องเมื่อผู้ป่วยย้ายออกจากห้อง (environment cleaning and decontamination) เป็นแนวทางที่มีหลักฐานว่าสามารถการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลได้²⁰ ในปัจจุบันวิธีที่ใช้สำหรับการกำจัดเชื้อบนพื้นผิวและในอากาศ ได้แก่ การใช้ disinfectant เช่น การใช้ chlorhexidine การพ่นด้วย hydrogen peroxide vapour หรือ การพ่น formaldehyde เป็นต้น^{21,22}

การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตหรือแสงยูวีในการกำจัดเชื้อ (Ultraviolet or UV irradiation) เป็นวิธีอีกวิธีหนึ่งที่ใช้กันแพร่หลายในโรงพยาบาลในปัจจุบัน ทั้งในห้องผ่าตัด และห้องปฏิบัติการ ซึ่งพบว่าสามารถกำจัดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ²³ การนึ่งด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Steam sterilization or Autoclave) เป็นอีกหนึ่งวิธีการกำจัดเชื้อที่ปลอดภัยและประหยัดทางแพทย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย วิธีนี้เหมาะสำหรับวัสดุหรืออุปกรณ์ที่สามารถทนต่อความร้อนและแรงดันไอน้ำ การนึ่งด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำมีประสิทธิภาพสูงสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียารายงานการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการใช้รังสียูวีต่อการกำจัดเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยใน

โรงพยาบาล *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa และ *Acinetobacter baumannii* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อเหล่านี้เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม ดังนั้นการวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพการกำจัดไบโอฟิล์มของเครื่องมือดังกล่าว โดยในการกำจัดเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของรังสียูวี เช่น ระยะเวลาในการฉายรังสี และ ระยะห่างของแหล่งกำเนิดรังสีและตัวอย่างเชื้อ ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพของการนิ่งด้วยหม้ออัดแรงดันไอน้ำ ได้ทำการศึกษาร่วมกับการใช้เอ็นไซม์ย่อยไบโอฟิล์ม (Biofilm Removal Enzyme) ผู้วิจัยหวังว่า ผลงานวิจัยที่ได้จะเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบควบคุมการติดเชื้อและแนวทางการจัดการปนเปื้อนของเชื้อในโรงพยาบาลที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป

2. ระเบียบวิธีการศึกษา

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานดังนี้ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ซึ่งทั้งหมดได้มาจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) จำนวน 2 ตัวอย่าง, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) จำนวน 4 ตัวอย่าง และ Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* จำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ โดยได้ให้ชื่อสายพันธุ์ดังในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เชื้อแบคทีเรียที่ศึกษา

	Species	Designated Strain	Sources
Standard strain	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 15305	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Clinical isolates	<i>Staphylococcus aureus</i>	MSSA-1	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Staphylococcus aureus</i>	MSSA-2	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA-1	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA-2	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA-3	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA-4	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Escherichia coli</i>	ESBL-1	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Escherichia coli</i>	ESBL-2	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Escherichia coli</i>	ESBL-3	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Escherichia coli</i>	ESBL-4	รพ.ธรรมศาสตร์
	<i>Escherichia coli</i>	ESBL-5	รพ.ธรรมศาสตร์

2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียประมาณ 2 - 3 โคโลนีที่ถูกเพาะเลี้ยงบน Horse blood agar (HBA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ถูกนำมาเลี้ยงใน Trypticase soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าโดยเครื่อง orbital shaker ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.3 การเก็บเชื้อแบคทีเรีย

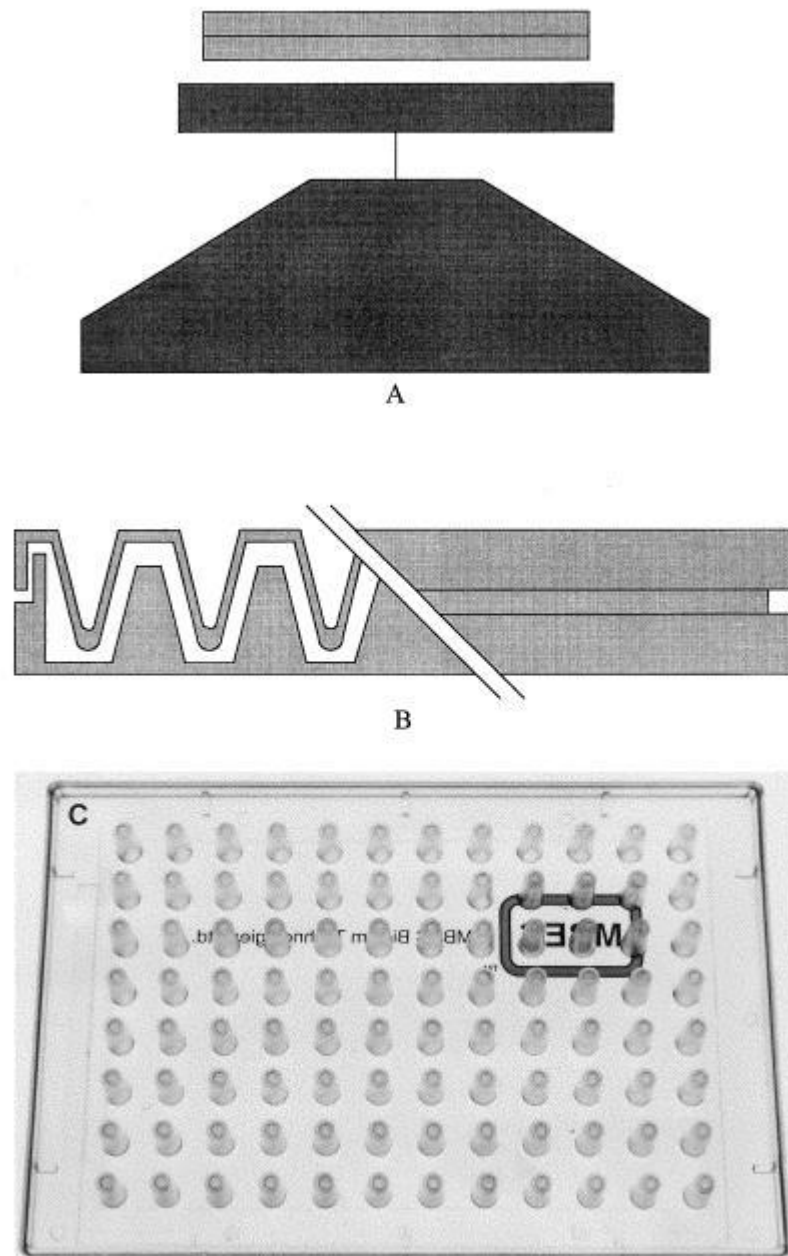
โคโลนีเดียวของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเพาะเลี้ยงบน HBA ได้ถูกนำมาเก็บใน 15% Glycerol และเก็บแช่แข็งในตู้ -80 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาศึกษา เชื้อจากหลอดแช่แข็งจะถูกนำมาเพาะลงบน HBA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มโดย Microtiter plate assay

การเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มโดยใช้ Microtiter plate assay ทำตามขั้นตอนตามวิธีของ Stepanovic และคณะ²⁴⁻²⁶ โดยเริ่มจาก เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบตามวิธีข้อ 2.1 จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:100 จากนั้นใส่เชื้อที่เจือจางปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมของ 96-well plate แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดย microtiter plate (Steriline, UK) ที่นำมาทดสอบทำจาก polystyrene ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตท่อน้ำพลาสติก โดยสามารถพบไบโอฟิล์มเจริญบนพื้นผิวนี้ได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในระบบท่อน้ำประปา หรือในระบบ dental pipeline เป็นต้น²⁷

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มด้วย Calgary biofilm device

การเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มด้วย Calgary biofilm device (CBD) ถูกพัฒนาโดย Ceri และคณะ²⁸ วิธีนี้เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบความไวของไบโอฟิล์มต่อยาปฏิชีวนะ CBD ประกอบด้วย (1) 96-well microtiter plate (2) ฝาปิดที่มี 96 pegs ที่สามารถใส่ลงไปพอดีในหลุมของ microtiter plate และ (3) เครื่องเขย่าสาร (shaker) ดังรูปที่ 2.1 โดยเมื่อใส่อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อลงในแต่ละหลุมและปิดด้วยฝาที่มี peg ซึ่งจะปิดสนิทเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน และวาง microplate บน shaker จะเกิดการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ peg การไหลวนของสารอาหารรอบ peg ที่เกิดขึ้นใน CBD จะใกล้เคียงกับการไหลของน้ำตามพื้นผิวที่พบในสิ่งแวดล้อม ลักษณะดังกล่าวจะกระตุ้นให้เชื้อที่เกาะติดกับ peg เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม และเมื่อไบโอฟิล์มเจริญเต็มทีบน peg ก็สามารถถูกแยกนำมาทดสอบกับสารต่างๆที่ต้องการทดสอบได้²⁸



รูปที่ 2.1 Calgary Biofilm Device (A) เครื่องเขย่าสาร (shaker) ที่ใช้วาง microplate เพื่อให้เกิดการไหลวนของสารน้ำภายในรอบ peg ภายในหลุม เครื่องเขย่านี้สามารถวางใน incubator เพื่อปรับอุณหภูมิได้ (B) แผนภาพตัดขวางของ microtiter plate และฝาปิดที่มี peg (C) ฝาปิดที่มี peg²⁸

ขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบตามวิธีข้อ 2.1 จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:100 จากนั้นใส่เชื้อที่เจือจางปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมของ 96-well plate โดยหลังจากใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบแล้ว ปิด plate ด้วยฝาปิดที่มี peg (ดังรูปที่ 2.2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อยึดเกาะกับ peg หลังจากครบกำหนดจึงบ่มต่อที่อุณหภูมิดังกล่าวโดยเขย่าที่ 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตในรูปแบบไบโอฟิล์มบน peg

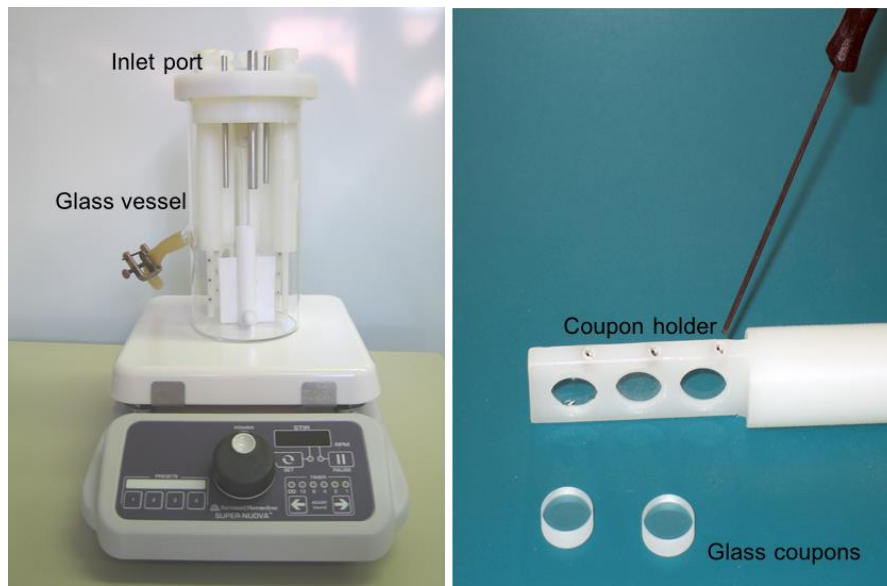


รูปที่ 2.2 Microtiter plate และ Cover ที่มี Pegs (NuncTM)

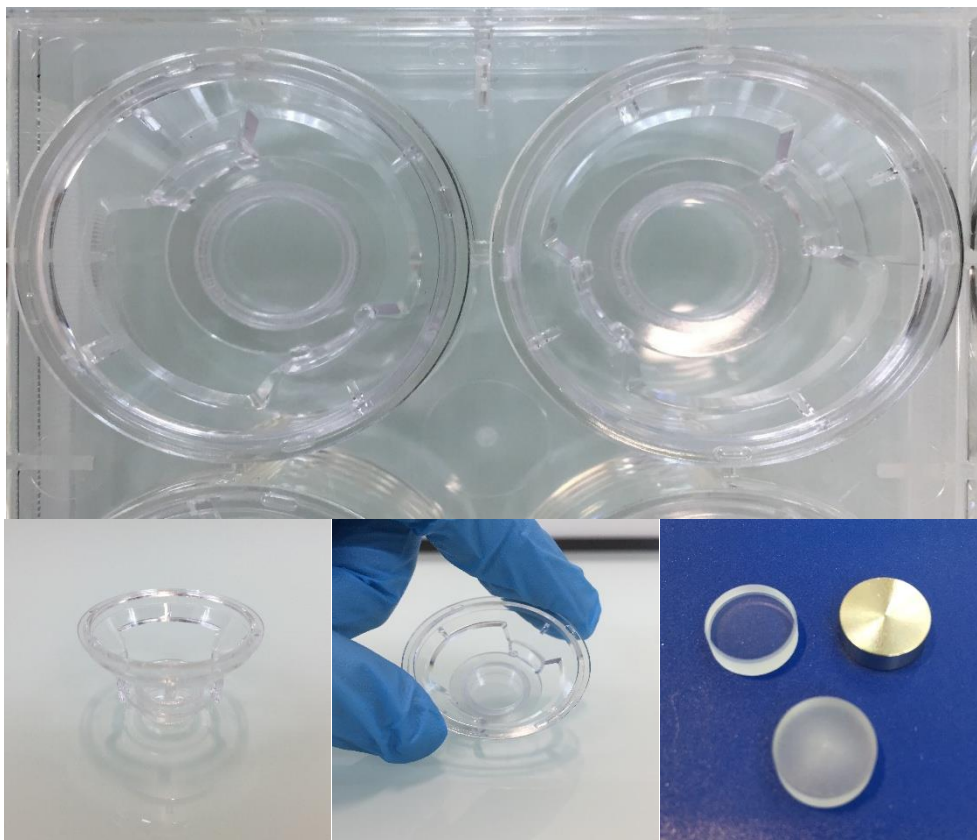
2.6 การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มในรูปแบบใหม่

แม้ Calgary Biofilm Device (CBD) จะถูกพัฒนามาเพื่อรองรับการเจริญเติบโตของเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์ม แต่ในหนึ่ง plate cover ที่ประกอบด้วย 96 pegs นั้นสามารถถูกนำไปทดสอบได้เพียงหนึ่งการทดสอบ นอกจากนั้น plate cover with pegs ทำมาจาก polystyrene ไม่สามารถทนความร้อนในเครื่อง autoclave ได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาโมเดลใหม่เพื่อการเพาะเลี้ยงและทดสอบไบโอฟิล์ม โดยเรียกในการศึกษานี้ว่า “Modified Coupon-Holder Biofilm Device”

โดยอาศัยหลักการของการเกิดไบโอฟิล์ม คือต้องมี surface ให้รองรับการเจริญเติบโตของเชื้อ การศึกษานี้จึงได้ประยุกต์การเลี้ยงเชื้อใน CBD กับใน CDC Biofilm Reactor (รูปที่ 2.3) โดยใช้ 6-well plate ร่วมกับ 12-mm insert (Transwell®, Corning Incorporated) โดยให้มี insert เพื่อใช้วาง coupons (BioSurface Technologies Corporation, USA) ดังรูปที่ 2.4 โดยใช้ coupons ที่ผลิตจาก Polycarbonate และ Stainless Steel



รูปที่ 2.3 CDC Biofilm Reactor และ Glass coupons (BioSurface Technologies Corporation, USA)



รูปที่ 2.4 Plate และ insert สำหรับวาง coupon เพื่อเลี้ยงไบโอฟิล์มใน Modified Coupon-Holder Biofilm Device

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเริ่มจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบตามวิธีข้อ 2.1 จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:100 จากนั้นใส่เชื้อที่เจือจางปริมาณ 3.5 มิลลิลิตรลงในหลุมของ 6-well plate แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อยึดเกาะกับ peg หลังจากครบกำหนดจึงบ่มต่อที่อุณหภูมิดังกล่าวโดยเขย่าที่ 40 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตในรูปแบบไบโอฟิล์มบน coupons

2.7 การวัดระดับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่เจริญใน Microplate assay

เพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มตามวิธีข้อ 2.4 เมื่อครบกำหนดเวลา เชื้อในแต่ละหลุมจะถูกดูดออกจากหลุม เพื่อให้เหลือเพียงเชื้อที่ยึดเกาะกับผิวของหลุมทดลอง หลังจากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย 0.9% Normal Saline Solution (NSS) โดยทำซ้ำ 3 รอบ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วจึงใส่สารละลาย crystal violet (0.2%) ปริมาณ 120 ไมโครลิตร ทั้งไว้ 2 ชั่วโมงจึงล้างออก และทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งจึงใส่ Acetone-Ethanol solution ลงในแต่ละหลุม และเขย่าที่ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงมาวัดค่าความเข้มข้นสีด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ OD 595 nm เชื้อหนึ่งสายพันธุ์จะถูกใส่ใน 3 หลุมของแต่ละ 96-well plate โดยทำซ้ำ 2 plates (duplication)

2.8 การวัดค่าระดับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่เจริญใน Calgary Biofilm Device

เพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มตามวิธีข้อ 2.5 เมื่อครบกำหนด นำ plate cover with pegs ไปล้างใน 96-well plate ที่มี NSS ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วสามารถนำ peg ไปทดสอบต่อหรือไปวัดค่าการสร้างไบโอฟิล์มโดยการใส่ใน 96-well plate ที่มี 0.2% crystal violet 120 uL ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงจึงล้างออก และทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งจึงเปลี่ยนมาใส่ใน 96-well plate อีกอันหนึ่งที่มี Acetone-Ethanol solution (120 uL) ในแต่ละหลุม และเขย่าที่ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงมาวัดค่าความเข้มข้นสีด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ OD 595 nm

2.9 การหาปริมาณเชื้อที่เจริญบน Calgary Biofilm Device

นำ peg ที่ผ่านการทดสอบไป sonicate ใน NSS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น serial dilute แล้วนำ 100 ไมโครลิตรไปเพาะเลี้ยงใน nutrient agar โดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน

2.10 การวัดค่าระดับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่เจริญใน Modified Coupon-Holder Biofilm Device

หลังจากที่ได้ไบโอฟิล์มเจริญบน coupon จากขั้นตอนที่ 2.6 ไบโอฟิล์มบน coupon จะถูกนำไปล้างใน NSS 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้เกาะกับพื้นผิว coupon ออก แล้วสามารถนำ coupons ไปทดสอบต่อได้ การวัดค่าไบโอฟิล์มบน coupon ทำโดยย้อมไบโอฟิล์มด้วย 0.2% crystal violet นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีส่วนเกินออก แล้วใส่ coupon ลงใน 5-mL Eppendorf tube และใส่ Acetone-Ethanol solution 3 mL และเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปวัดค่า OD 595 nm

2.11 การทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างไบโอฟิล์ม

เพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มดังวิธีข้อ 2.4 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารที่ต้องการทดสอบดังนี้

1. Cation-adjusted Muller Hinton broth (CAMHB)
2. Trypticase Soy broth (TSB)
3. Trypticase Soy broth supplemented with 2% glucose (TSB-G)

นำเชื้อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด จึงทำการล้างและย้อมด้วย crystal violet solution และวัดความค่า OD 595 nm ตามวิธีข้อ 2.7

2.12 การทดสอบความทนทานของเชื้อต่อความแห้ง

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบน HBA จากนั้นนำ 2-3 โคโลนีของเชื้อใส่ใน 0.9% NSS ปริมาณ 2 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไม้พันสำลี (sterile) จุ่มแล้วนำมา streak ให้ทั่วทั้ง HBA แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดี แบ่งเชื้อออกเป็นส่วนเท่ากัน ใช้ไม้พันสำลี (sterile) ป้ายเชื้อที่แบ่งลงบน sterile petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วนำเชื้อใส่กล่องทึบแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องตามเวลาที่ต้องการทดสอบคือ 3, 6, 12, 24 ชั่วโมง และ 2, 3, 6, 7, 14 และ 21 วัน เมื่อครบกำหนดตามระยะเวลาที่ต้องการทดสอบ จึงใส่ 0.9% NSS ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง และนำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงบน Nutrient agar (NA) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย

2.13 การทดสอบการทำลายเชื้อที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มโดยรังสียูวี

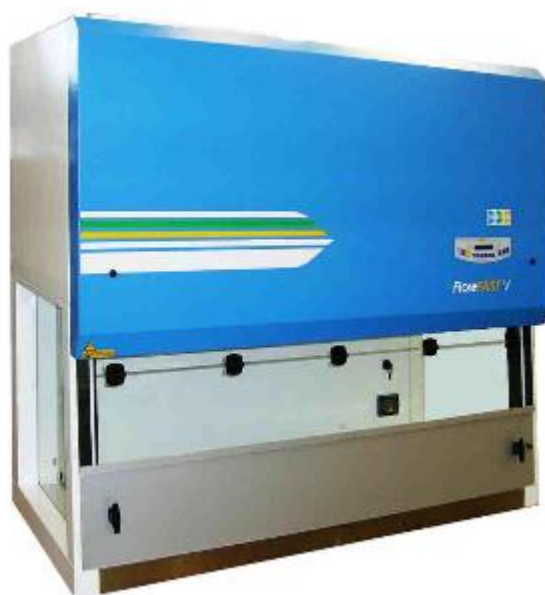
เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 2.5 เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างเชื้อส่วนที่เกินจากไบโอฟิล์มออกด้วย 0.9% NSS หลังจากนั้นนำ peg ที่มีไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละชนิดไปทดสอบภายใต้สภาวะที่ต้องการศึกษาคือ

1. UV Sterilization Cabinet (M-2036 Double UV Sterilizer) (รูป 2.3) โดยวางให้ห่างจากแหล่งกำเนิดรังสี UV 20 เซนติเมตร ซึ่งจะมีความเข้มแสงเฉลี่ยที่ $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$
2. Biosafety cabinet class II with UV lamp (SafeFast™) (รูป 2.4) โดยวางให้ห่างจากแหล่งกำเนิดรังสี UV 50 เซนติเมตร ซึ่งจะมีความเข้มแสงเฉลี่ยที่ $125 \mu\text{W}/\text{cm}^2$

โดยทดสอบที่เวลา 30 นาที 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำ peg มาใส่ใน 96-well plate ที่บรรจุ 0.9% NSS และนำไปใส่ในเครื่อง sonicator เป็นเวลา 5 นาที และนำมาเขย่าต่อบนเครื่อง orbital shaker ที่ 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไบโอฟิล์มหลุดออกจาก peg หลังจากนั้นจึงนำเชื้อใน 0.9% NSS ไปเพาะบน NA เพื่อบันทึกปริมาณโคโลนี ร่วมกับเชื้อที่เจริญบน peg ที่ไม่ได้ผ่านการทำลายด้วยรังสี UV (control) การทดลองทำแบบ duplicate โดยเชื้อแต่ละชนิดจะเจริญบน peg จำนวน 2 แท่งบนแต่ละ plate นอกจากนั้นนำ peg มาวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยวิธี 2.8



รูปที่ 2.5 UV Sterilizer



รูปที่ 2.6 Biosafety Cabinet (Class II) with Internal UV Lamp (SafeFast™)

2.14 การทดสอบการทำลายเชื้อที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มโดย Steam Sterilization

เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 2.6 เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างเชื้อส่วนที่เกินจากไบโอฟิล์มออกด้วย 0.9% NSS หลังจากนั้นนำ coupons ที่มีไบโอฟิล์มของเชื้อแต่ละชนิดไปทดสอบภายใต้สภาวะที่ต้องการศึกษาคือ

1. Autoclave ที่ 121°C 15 นาที 15 psi
2. แช่ใน Biofilm Removal Multi-Enzymes (3M™) 3 ชั่วโมงที่ 45°C ตามด้วย Autoclave ที่ 121°C 15 นาที 15 psi

โดยเมื่อครบกำหนดเวลา ทำการวัดค่าปริมาณไบโอฟิล์มด้วยวิธีข้อ 2.10 เปรียบเทียบกับปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่ม positive control คือมีเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มที่ไม่ได้ผ่านการนิ่งด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างหลังการแช่ด้วย Biofilm Removal Multi-Enzyme และหลังการ Autoclave

2.15 การดูลักษณะไบโอฟิล์มด้วย Scanning electron microscope

นำไบโอฟิล์มจากข้อ 2.4 และที่ผ่านการทดสอบตามข้อ 2.13 มาแช่ใน 3% Glutaraldehyde with 0.15% Alcian blue ใน 0.2M Sodium cacodylate เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย 0.2M Sodium cacodylate buffer แล้วทำการ dehydration ใน serial dilution ของ ethanol ที่ 30%, 50%, 70%, 95% อย่างละ 5 นาที และใน 100% Ethanol 5 นาที 2 ครั้ง และแช่ใน HMDS (Hexamethyldisilazane) 5 นาที

จากนั้นจึงปล่อยให้แห้งใน silica gel container เป็นเวลาหนึ่งคืนก่อนนำไป sputter coat with gold particle (Polaron SC7640 Sputter Coater, Fisons Instrument) และดูด้วยกล้อง scanning electron microscope (JEOL) ที่กำลังขยาย 5000 และ 10,000 เท่า

3. รายงานผลการทดลอง

3.1 การเจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มของเชื้อชนิดและสายพันธุ์ต่าง ๆ

Microplate assay เป็นการวัดปริมาณของเชื้อที่ยึดเกาะกับพื้นผิว โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน microplate เชื้อบางส่วนจะยึดเกาะกับผิวของหลุมและสร้างเป็นไบโอฟิล์ม การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มสามารถทำได้โดยล้างเชื้อที่ไม่ยึดเกาะกับผิว (planktonic cells) ออกและย้อมด้วยสี crystal violet ซึ่งสีจะติดเฉพาะเชื้อที่ยังคงเกาะยึดอยู่ภายในผิวของหลุม เมื่อทำการ decolorization สี crystal violet ด้วยสารละลาย Acetone-Ethanol และนำไปวัดค่าความเข้มแสง (OD 595 nm) ค่าดังกล่าวจะแปรผันกับปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อแต่ละชนิดสร้าง ตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2 แสดงค่า OD 595 nm ของเชื้อ Gram-positive และ Gram-negative ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ Cation-adjusted Muller Hinton broth (CAMHB), Trypticase soy broth (TSB) และ Trypticase soy broth supplemented with 2% glucose (TSB-G) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากเชื้อที่นำมาทดสอบจำนวน 16 ตัวอย่าง ดังตาราง 2.1 พบว่า ในกลุ่ม Gram-positive bacteria เชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ จำนวน 6 ตัวอย่าง (MSSA-1, MSSA-2, MRSA-1, MRSA-2, MRSA-3 และ MRSA-4) เชื้อ MRSA-3 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ OD595 nm ของเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยใช้ ANOVA พบว่า เชื้อ *S. aureus*, MSSA-1, MRSA-1, MRSA-2, MRSA-3 และ MRSA-4 เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ในขณะที่ *S. epidermidis* เจริญได้ดีที่สุดใน TSB

ตารางที่ 3.1 ปริมาณไบโอฟิล์ม (แสดงเป็นค่า OD595nm) ของ Gram-positive bacteria

Culture Media	Gram Positive Bacteria							
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	MSSA-1	MSSA-2	MRSA-1	MRSA-2	MRSA-3	MRSA-4
CAMHB	0.160	0.162	0.057	0.056	0.051	0.059	0.067	0.053
TSB	0.084	0.275	0.080	0.183	0.067	0.078	0.081	0.075
TSB-G	0.386	0.102	0.208	0.185	0.164	0.199	0.258	0.164

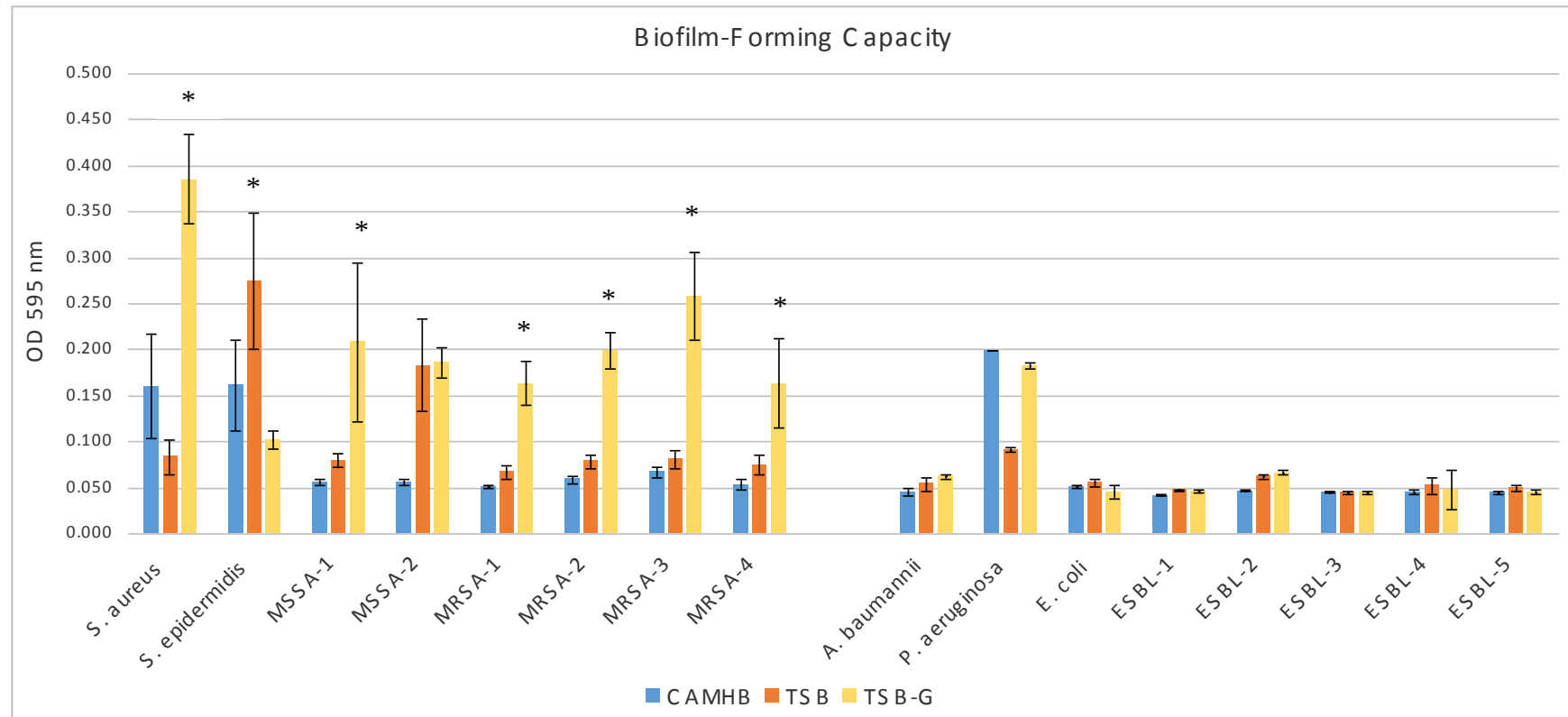
สำหรับเชื้อในกลุ่ม Gram-negative bacteria เชื้อ *P. aeruginosa* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. baumannii*

และเชื้อ *E. coli* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ และเมื่อเปรียบเทียบเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิต ESBL จำนวน 5 ตัวอย่าง (ESBL-1, ESBL-2, ESBL-3, ESBL-4 และ ESBL-5) เชื้อ ESBL-2 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.1

ตารางที่ 3.2 ปริมาณไบโอฟิล์ม (แสดงเป็นค่าOD_{595nm}) ของ Gram-negative bacteria

Culture Media	Gram Negative Bacteria							
	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	ESBL-1	ESBL-2	ESBL-3	ESBL-4	ESBL-5
CAMHB	0.045	0.199	0.052	0.041	0.047	0.045	0.045	0.044
TSB	0.054	0.091	0.055	0.047	0.062	0.044	0.052	0.050
TSB-G	0.062	0.183	0.045	0.046	0.067	0.044	0.048	0.045

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในรูปแบบไบโอฟิล์มของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ พบว่า Trypticase soy broth supplemented with 2% glucose ทำให้เชื้อส่วนใหญ่สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด ยกเว้นเชื้อ *S. epidermidis* และ เชื้อ *P. aeruginosa* ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดใน Trypticase soy broth และ Cation-adjusted Muller Hinton broth ตามลำดับ (รูปที่ 3.1)

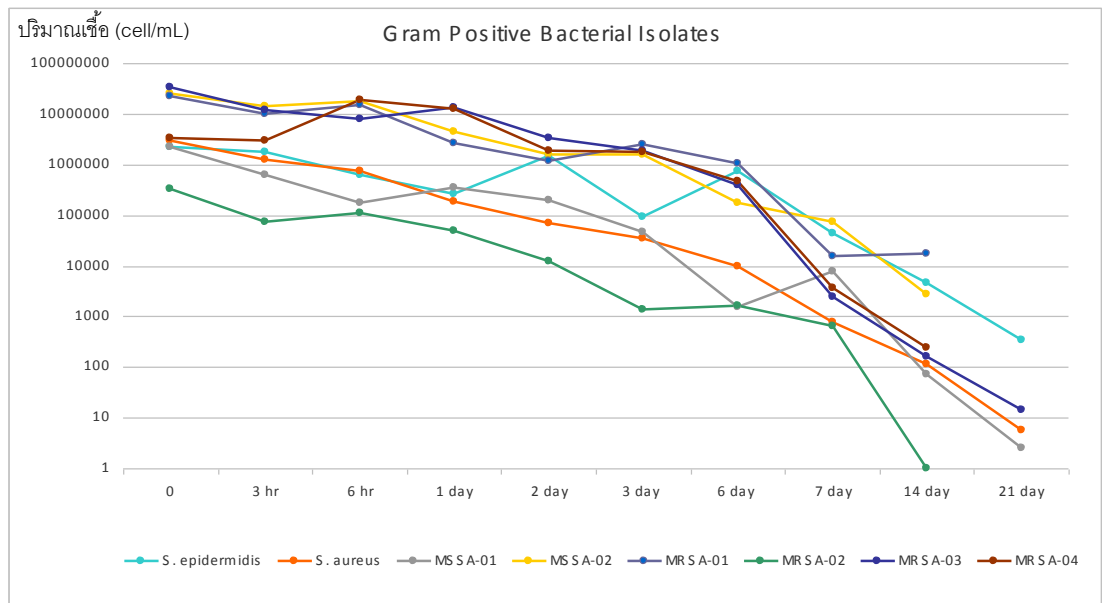


รูปที่ 3.1 แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณไบโอฟิล์มที่ 48 ชั่วโมง ของเชื้อชนิดและสายพันธุ์ต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ

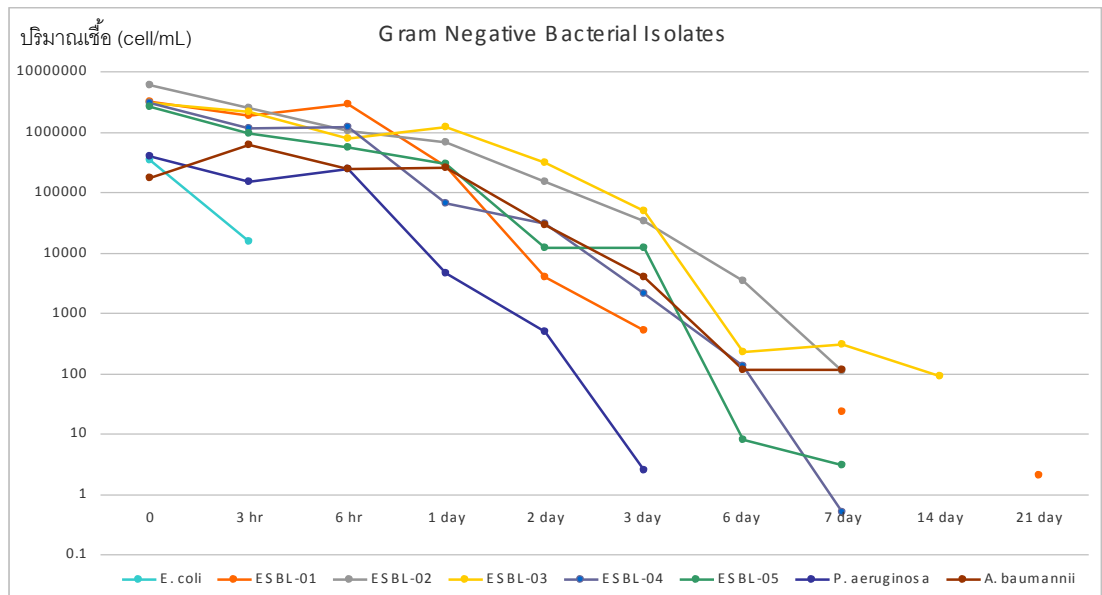
Error bar แสดงถึงค่า standard error of mean * p value < 0.05

3.2 ความทนทานของเชื้อต่อความแห้ง

เมื่อนำเชื้อมาทดสอบบนความแห้งเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 3 ชั่วโมงถึง 21 วัน พบว่า เชื้อ Gram-positive bacteria ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบสามารถมีชีวิตได้ถึง 14 วัน โดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* สายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อ MSSA-1 และ MRSA-3 ที่สามารถมีชีวิตได้ถึง 21 วันในสภาวะแห้งที่ไม่มีสารอาหารหรือน้ำ (รูปที่ 3.2) ในขณะที่เชื้อ Gram-negative bacteria มีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแห้งอยู่เพียง 7 วัน โดยเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานสามารถทนทานต่อสภาวะดังกล่าวได้เพียง 3 ชั่วโมงและ 3 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.2 ความทนทานของ Gram-positive bacteria ต่อความแห้ง
แกน X แสดงถึงปริมาณเชื้อ (cells/mL) แกน Y แสดงระยะเวลา



รูปที่ 3.3 ความทนทานของ Gram-negative bacteria ต่อความแห้ง
แกน X แสดงถึงปริมาณเชื้อ (cells/mL) แกน Y แสดงระยะเวลา

เมื่อพิจารณาที่ 3 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ยังคงมีชีวิตรอด โดยมีอัตราการรอดชีวิตดังตารางที่ 3.3 โดยพบว่าในกลุ่ม Gram-positive เชื้อ MRSA-4 สามารถทนได้ดี ในขณะที่มีเพียง 4.4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐานที่ทนทานต่อความแห้งได้ในระยะเวลาดังกล่าว และเป็นที่น่าสนใจที่เชื้อ *A. baumannii* มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเทียบกับเวลาเริ่มการทดลอง

ตารางที่ 3.3 จำนวนเชื้อที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมงเมื่อทดสอบในสภาวะแห้ง

Tested Bacteria	Number of bacterial cells (cells/mL)		Percent of survival cells
	0 hr	3 hr	
<i>S. aureus</i>	3000000	1215000	40.5
<i>S. epidermidis</i>	2240000	1770000	79.0
MSSA-1	2210000	615000	27.8
MSSA-2	24500000	14000000	57.1
MRSA-1	22500000	10000000	44.4
MRSA-2	320000	75000	23.4
MRSA-3	33000000	12000000	36.4
MRSA-4	3255000	3000000	92.2
<i>A. baumannii</i>	170000	595000	350.0
<i>P. aeruginosa</i>	395000	150000	38.0
<i>E. coli</i>	340000	15000	4.4
ESBL-1	3125000	1855000	59.4
ESBL-2	5850000	2505000	42.8
ESBL-3	2985000	2150000	72.0
ESBL-4	2920000	1150000	39.4
ESBL-5	2620000	935000	35.7

3.3 เชื้อสายพันธุ์สำหรับการทดสอบการทำลายโดยรังสียูวี

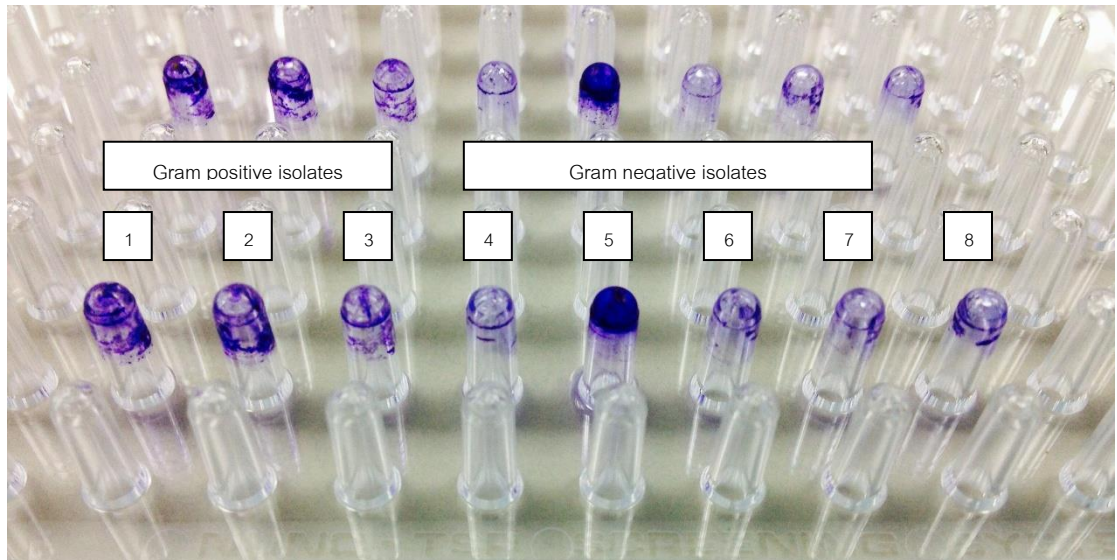
การคัดเลือกสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจพิจารณาจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (ปัจจัยหลัก) และความสามารถในการทนต่อความแห้ง (ปัจจัยรอง) ซึ่งจากผลการทดลองในข้อ 3.1 และ 3.2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ MRSA-3 และ ESBL-2 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่ม Clinical isolates Gram-positive และ Gram-negative bacteria ตามลำดับ รวมทั้งมีความทนทานต่อสภาวะแห้งได้ จึงคัดเลือกเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มาทำการทดสอบร่วมกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานอีก 5 ชนิด โดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ทำให้เกิดการเจริญแบบไบโอฟิล์มมากที่สุดสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (ตามผลการทดลองข้อ 3.1) ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เชื้อที่ถูกนำมาทดสอบความทนทานต่อรังสียูวีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

	Tested Bacteria	Culture Media
Gram Positive	<i>S. aureus</i>	TSB-G
	<i>S. epidermidis</i>	TSB
	MRSA-3	TSB-G
Gram Negative	<i>A. baumannii</i>	TSB-G
	<i>P. aeruginosa</i>	CAMHB
	<i>E. coli</i>	TSB-G
	ESBL-2	TSB-G

3.4 ผลการทำลายเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มของรังสียูวี

เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบดังในตารางที่ 3.4 ตามวิธีในข้อ 2.5 จะได้เชื้อเจริญเติบโตรูปแบบไบโอฟิล์มบน peg ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ รูปที่ 3.4 เป็นการย้อมด้วย crystal violet solution เพื่อให้เห็นถึงไบโอฟิล์มที่เจริญอยู่บน peg



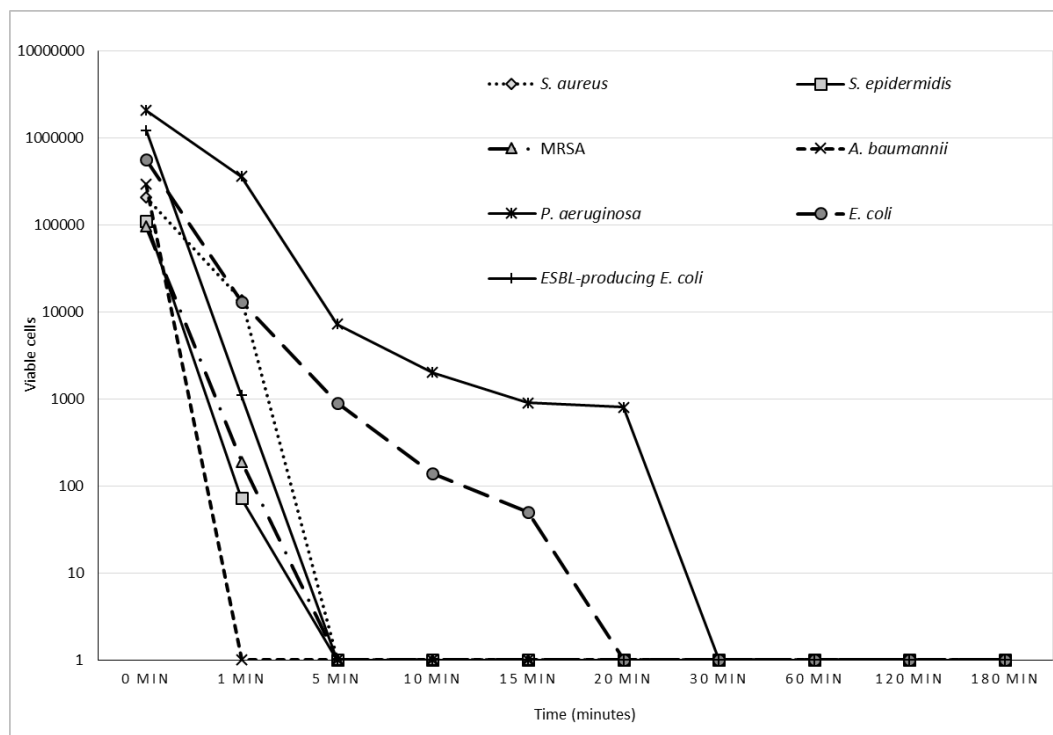
รูปที่ 3.4 ไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบน peg

1 = *S. aureus* 2 = *S. Epidermidis* 3 = MRSA-3
4 = *A. Baumannii* 5 = *P. aeruginosa* 6 = *E. coli* 7 = ESBL-2
8 = Control (TSB-G broth)

ปริมาณของเชื้อแต่ละชนิดที่เจริญแบบไบโอฟิล์มบน peg ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6 (ที่ 0 นาที) โดยพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีปริมาณเซลล์ที่ประกอบเป็นไบโอฟิล์มจำนวนมากที่สุด (2,065,000 เซลล์) เมื่อนำไบโอฟิล์มที่เจริญอยู่บน peg ไปทดสอบใน UV sterilizer และ Biosafety cabinet with UV lamp ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180 นาที โดยเมื่อครบกำหนดเวลา ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อวัดปริมาณของเชื้อ พบว่า ใน Biosafety cabinet with UV lamp เชื้อ *A. baumannii* ถูกทำลายที่ 1 นาที เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, ESBL-producing *E. coli* ถูกทำลายที่ 5 นาที ในขณะที่ *E. coli* ถูกทำลายที่ 20 นาที และ ต้องใช้เวลาถึง 30 นาทีในการทำลายเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม (ตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ปริมาณเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มก่อนและหลังการได้รับรังสี UV จากเครื่อง Biosafety cabinet

Isolates	Number of vital cells in each time point (cells)									
	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	180 min
<i>S. aureus</i>	205000	13700	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	110000	72	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA	95000	186.5	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	293500	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	2065000	360000	7200	2000	900	800	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	565000	12950	900	140	50	0	0	0	0	0
ESBL-producing <i>E. coli</i>	1200000	1100	0	0	0	0	0	0	0	0



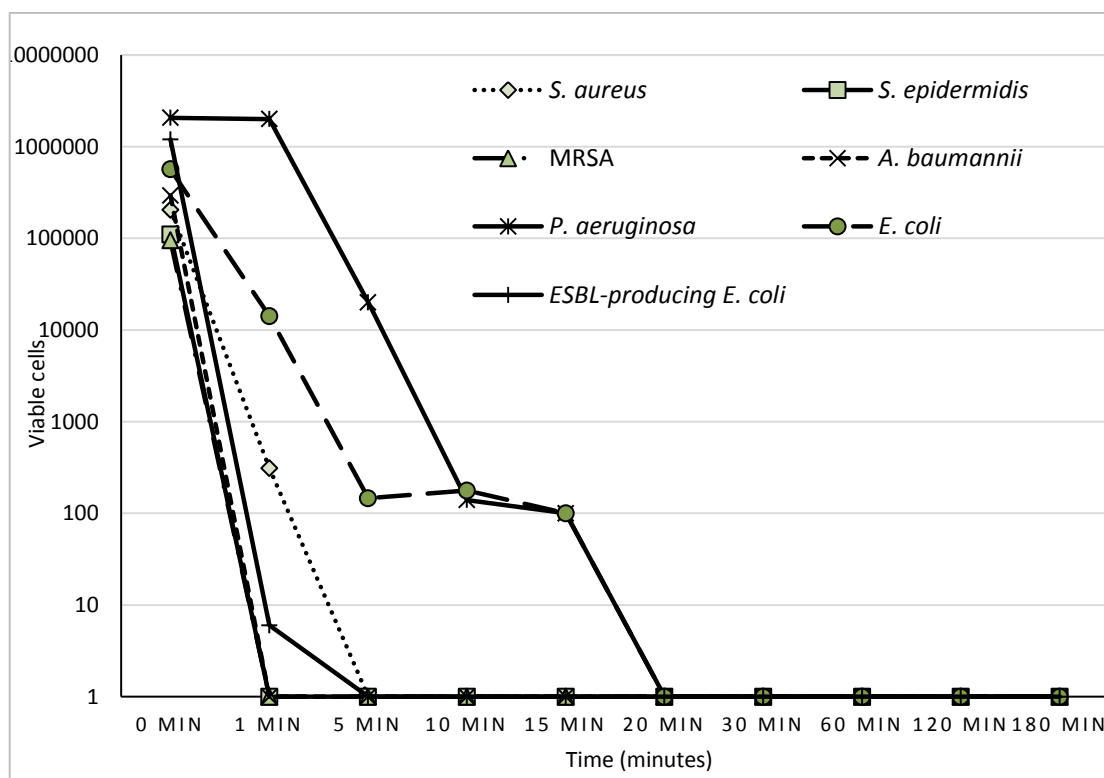
รูปที่ 3.5 กราฟแสดงปริมาณเชื้อหลังได้รับรังสี UV ใน Biosafety cabinet ที่เวลาต่างๆ

ส่วนใน UV sterilizer เชื้อ *A. baumannii* และ MRSA ถูกทำลายที่ 1 นาที เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, และ ESBL-producing *E. coli* ถูกทำลายที่ 5 นาที ในขณะที่

ที่ต้องใช้เวลาถึง 20 นาทีในการทำลายเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม (ตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.6)

ตารางที่ 3.6 ปริมาณเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มก่อนและหลังการได้รับรังสียูวีจากเครื่อง UV sterilizer

Isolates	Number of vital cells in each time point (cells)									
	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	180 min
<i>S. aureus</i>	205000	311	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	110000	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA	95000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	293500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	2065000	2000000	20000	140	100	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	565000	14200	146	177	100	0	0	0	0	0
ESBL-producing <i>E. coli</i>	1200000	6	0	0	0	0	0	0	0	0

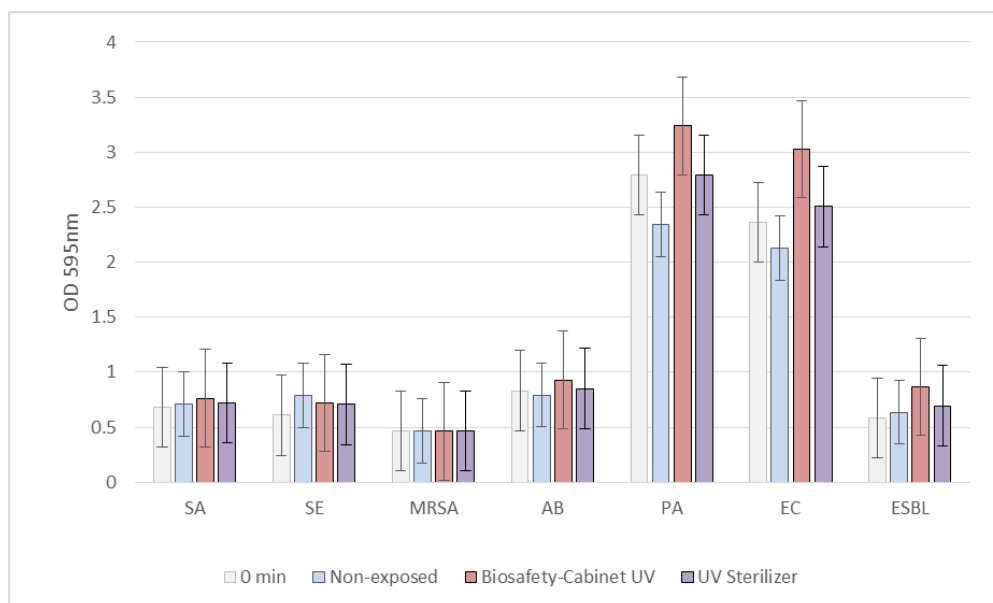


รูปที่ 3.6 กราฟแสดงปริมาณเชื้อหลังได้รับรังสี UV ใน Biosafety cabinet ที่เวลาต่างๆ

เมื่อทำการทดสอบวัดปริมาณไบโอฟิล์ม (ซึ่งสามารถเป็นเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่หรือเชื้อที่ตายแล้ว) พบว่า ปริมาณไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* มีปริมาณมากที่สุด เมื่อทำการทดสอบนำไบโอฟิล์มไปรับรังสียูวีจาก Biosafety cabinet with UV และ UV sterilizer เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับไบโอฟิล์มที่ไม่ได้รับการฉายแสงเป็นเวลา 30 นาที พบว่า ปริมาณไบโอฟิล์มไม่มีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.7 แสดงว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ต สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์ม

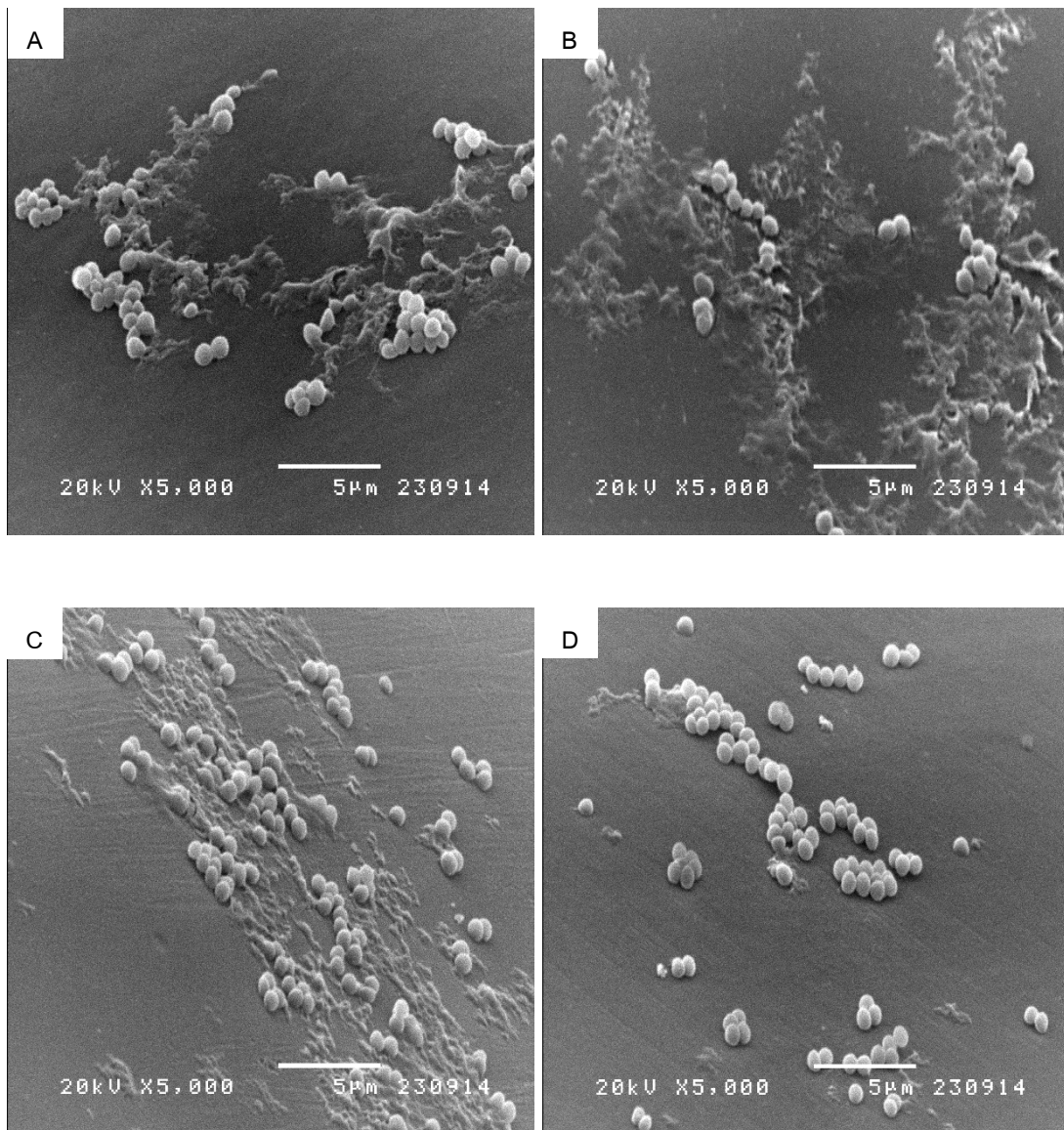
ตารางที่ 3.7 ปริมาณ Biofilms เปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต

Bacteria	Crystal Stained Biofilms (OD595)			
	Baseline	Non-exposure	UV exposure	
			Biosafety Cabinet	UV Sterilizer
<i>S. aureus</i>	0.68	0.71	0.76	0.72
<i>S. epidermidis</i>	0.61	0.79	0.72	0.71
MRSA	0.47	0.47	0.46	0.47
<i>A. baumannii</i>	0.83	0.79	0.93	0.85
<i>P. aeruginosa</i>	2.79	2.34	3.24	2.79
<i>E. coli</i>	2.36	2.13	3.03	2.51
ESBL-producing <i>E. coli</i>	0.59	0.64	0.87	0.76

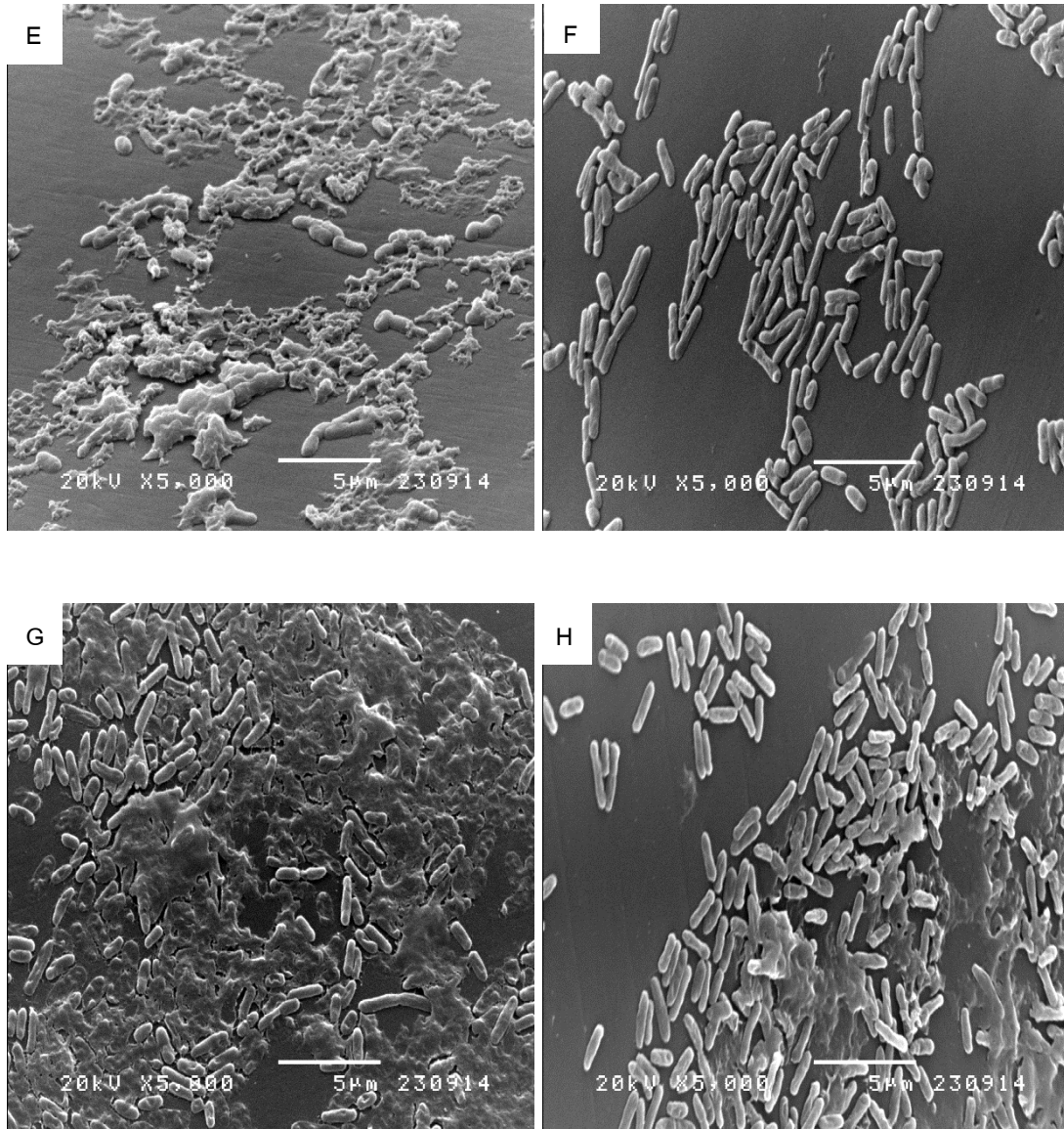


รูปที่ 3.7 กราฟแสดงปริมาณ Biofilms เปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับรังสียูวี

เมื่อนำไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยเปรียบเทียบลักษณะไบโอฟิล์มก่อนและหลังการได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า รูปร่างของเซลล์ของทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับรังสียวี่ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณของ Extracellular Polymeric Substance (EPS) ที่ยึดและห่อหุ้มเซลล์ในตัวอย่างที่ได้รับรังสี มีปริมาณน้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้รับรังสี อย่างไรก็ตามปริมาณของ EPS matrix ดังกล่าวไม่สามารถวัดเป็นค่าได้



รูปที่ 3.8 (คำอธิบายในหน้าถัดไป)



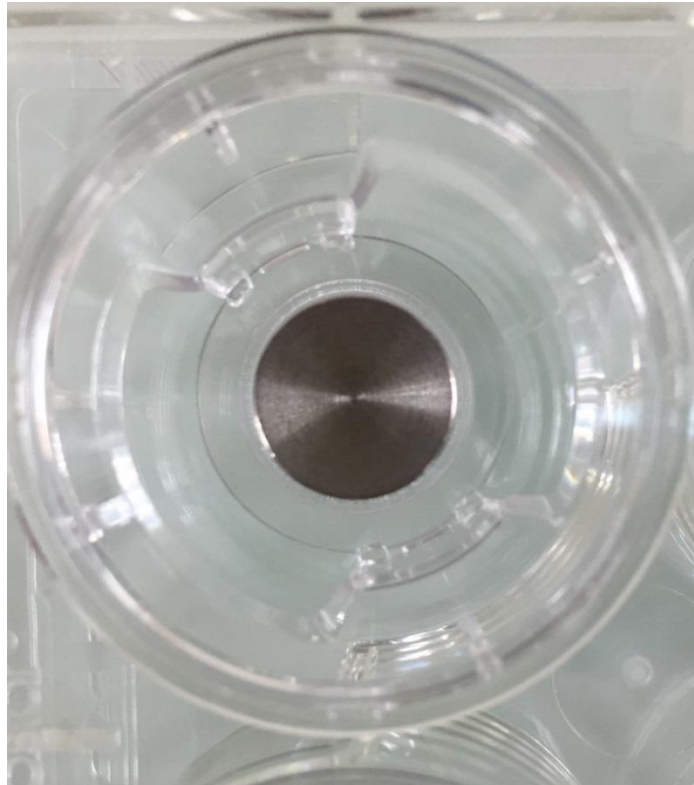
รูปที่ 3.8 Scanning electron micrographs of: (A) *S. aureus* no-UV-exposure; (B) *S. aureus* with 30-minutes UV exposure; (C) *S. epidermidis* no-UV-exposure; (D) *S. epidermidis* with 30-minutes UV exposure; (E) *E. coli* no-UV-exposure; (F) *E. coli* with 30-minutes UV exposure; (G) *P. aeruginosa* no-UV-exposure; (H) *P. aeruginosa* with 30-minutes UV exposure. All images were x5000 magnification.

3.5 การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มในรูปแบบใหม่

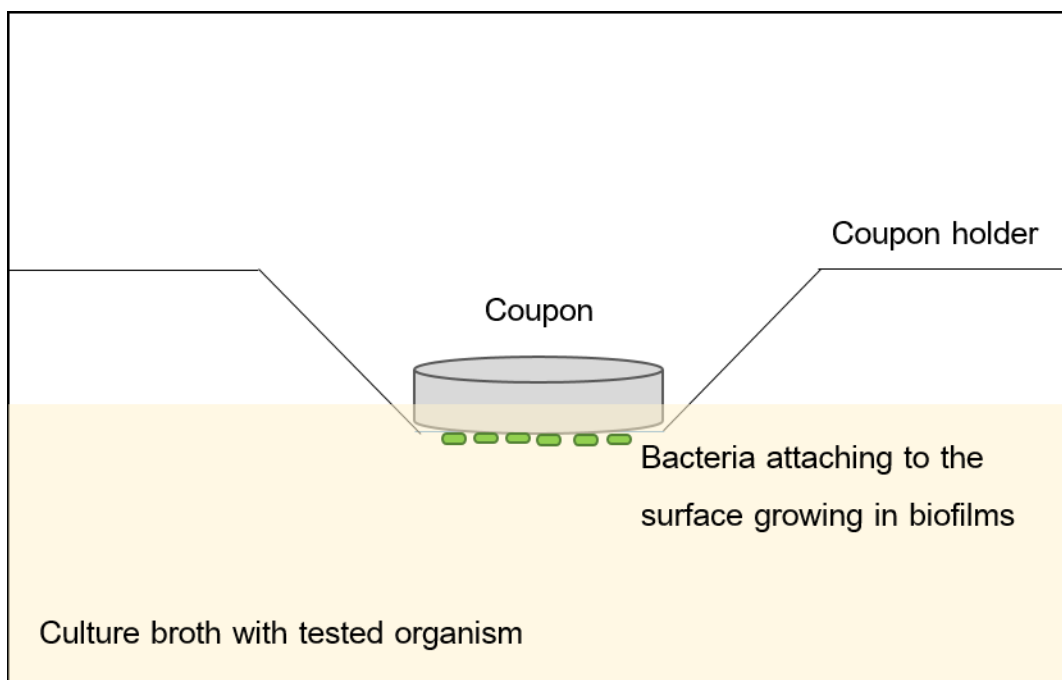
เนื่องจากการเลี้ยงไบโอฟิล์มโดย Calgary Biofilm Device ไบโอฟิล์มจะเจริญเติบโตบน polystyrene ซึ่งไม่สามารถทนความร้อนจากการ Autoclave ได้ นอกจากนั้น ไบโอฟิล์มบนหนึ่ง plate cover ที่ประกอบด้วย 96 pegs นั้นสามารถถูกนำไปทดสอบได้เพียงหนึ่งการทดสอบ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาโมเดลใหม่เพื่อการเพาะเลี้ยงบนวัสดุที่ทนทานต่อความร้อนและการ Autoclave รวมทั้งสามารถนำไบโอฟิล์มไปทดสอบได้หลากหลายมากขึ้น

จากหลักการของการเกิดไบโอฟิล์ม คือต้องมี surface ให้รองรับการเจริญเติบโตของเชื้อ การศึกษานี้จึงได้ประยุกต์การเลี้ยงไบโอฟิล์มโดย Calgary Biofilm Device (CBD) กับใน CDC Biofilm Reactor (รูปที่ 2.3) โดย CBD อาศัย peg ที่จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น surface ให้เชื้อมาเกาะ (attachment) และเจริญต่อไปเป็นไบโอฟิล์ม ในขณะที่ CDC Biofilm Reactor อาศัย coupon ที่ถูกยึดด้วย coupon holders (รูปที่ 2.3) เป็น surface ให้เชื้อยึดเกาะ และใส่ใน vessel ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ และวางบน magnetic stirrer เพื่อ create แรงเฉื่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อไหลวน

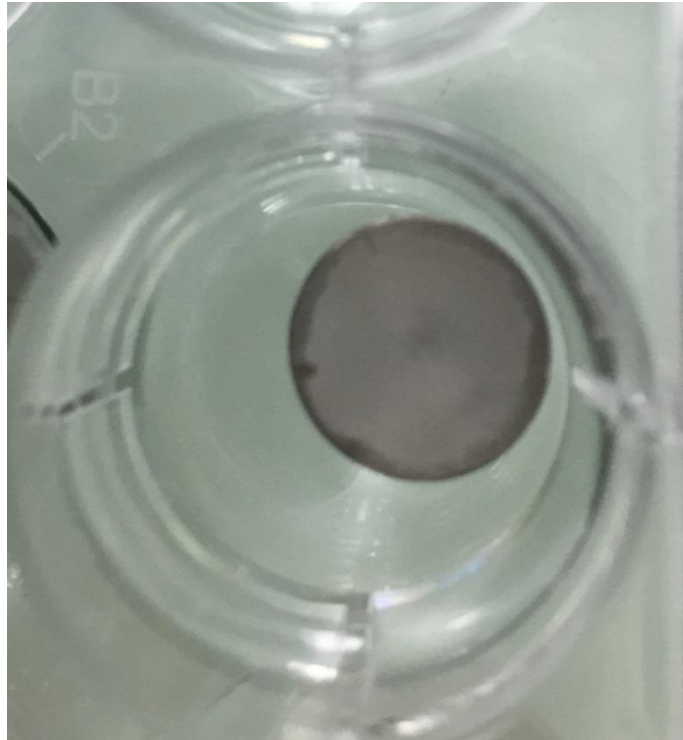
การศึกษานี้ใช้ 6-well plate ร่วมกับ 12-mm insert (Transwell[®], Corning Incorporated) โดยให้มี insert เพื่อใช้วาง coupons (BioSurface Technologies Corporation, USA) ดังรูปที่ 3.9 โดยใช้ coupons ที่ผลิตจาก Polycarbonate และ Stainless Steel ซึ่งทนทานต่อการ Autoclave ซึ่งจากรูปที่ 3.10 เป็นแผนภาพการทำงานของวิธีการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มที่พัฒนาขึ้นระหว่างการศึกษา โดยเห็นว่า coupon เป็น surface ที่สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพาะปมเชื้อในตู้บ่มร่วมกับการเขย่าที่ 40 รอบต่อนาที จะเกิด “flow” หรือ “shearing force” กระตุ้นให้เชื้อที่เกาะบน surface เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม รูปที่ 3.11 และรูปที่ 3.12 แสดงไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญบน Stainless Steel Coupon และ Polycarbonate Coupon ตามลำดับ เรียกโมเดลที่พัฒนาขึ้นมาในการศึกษานี้ว่า “Modified Coupon-Holder Biofilm Device”



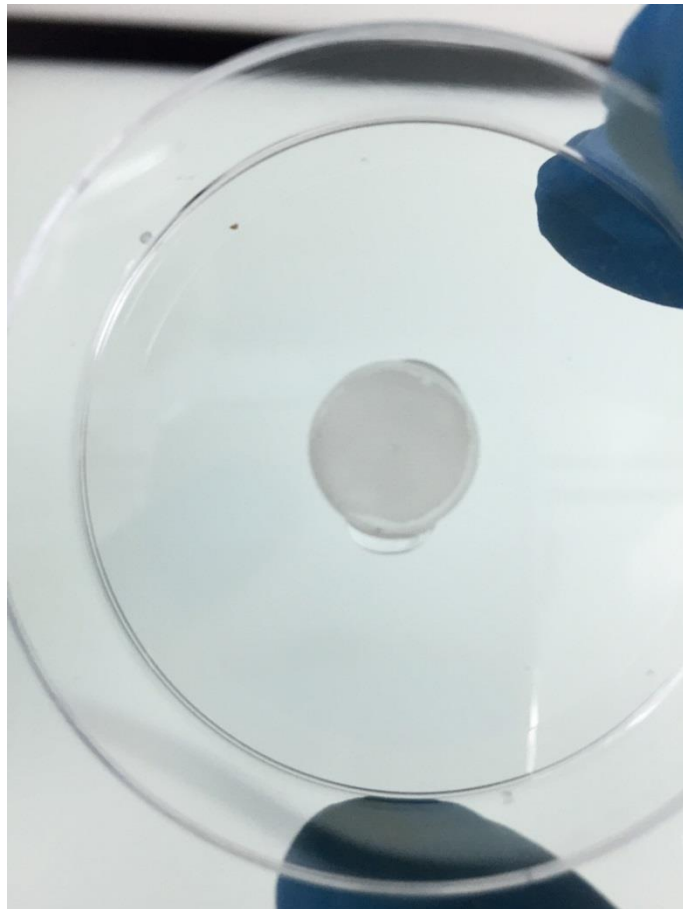
รูปที่ 3.9 Stainless Steel Coupon และ Coupon holder insert ใน 6-well plate



รูปที่ 3.10 แผนภาพแสดงการทำงานของวิธีการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มใน Modified Coupon Holder Biofilm Device



รูปที่ 3.11 ไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญบน Stainless Steel Coupon



รูปที่ 3.12 ไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญบน Polycarbonate Coupon

3.6 ผลการกำจัดไบโอฟิล์มด้วยการนึ่งด้วยหม้ออัดแรงดันไอน้ำ (Steam Sterilization or Autoclave)

Autoclave หรือหม้อนึ่งอัดแรงดันไอน้ำจัดว่าเป็นอุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทำลายเชื้อ โดยสามารถทำลายเชื้อในระดับสปอร์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการทำลายไบโอฟิล์ม การศึกษานี้ได้นำเชื้อมาเลี้ยงในรูปแบบไบโอฟิล์มโดยใช้ Modified Coupon Holder Biofilm Device ที่พัฒนาขึ้นโดยเลี้ยงไบโอฟิล์มบน Polycarbonate coupon และ Stainless Steel coupon ซึ่งสามารถทนความร้อนจาก steam sterilization ได้ โดยการศึกษานี้ได้ทดสอบไบโอฟิล์มด้วยการ Autoclave และผ่านการกำจัดด้วย Multi-Enzymes Biofilm Removal (3M™) ก่อนการ Autoclave หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาหา viability และย้อมดูปริมาณไบโอฟิล์มด้วย crystal violet ได้ผลดังรูปที่ 3.13 เมื่อนำมาวัดค่าความเข้มข้นแสงที่ OD595nm ตามวิธีในข้อ 2.10 โดยนำค่าที่ได้มาหักลบกับ negative control ซึ่งคือค่า OD595nm ของ crystal violet ที่ coupon ที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อ (ตารางที่ 3.8) ได้ผลเป็น adjusted OD595nm ดังตารางที่ 3.9 สำหรับ Polystyrene coupons และตารางที่ 3.10 สำหรับ Stainless steel coupons โดยพบว่า Steam sterilization ไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ แต่เมื่อนำมาแช่ด้วย Biofilm Removal Multi-Enzymes ที่ 45°C 3 ชั่วโมงก่อนนำไป autoclave พบว่าสามารถลดไบโอฟิล์มได้จนต่ำกว่าระดับของ negative control หรือลดไบโอฟิล์มได้สูงสุดถึง 100% (ตารางที่ 3.9 และ 3.10) เมื่อทำการเพาะเชื้อจากแต่ละขั้นตอน พบว่าการแช่ Biofilm Removal Enzyme ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ตารางที่ 3.11)

ตารางที่ 3.8 ค่า Optical Density ที่ 595 nm ของ crystal violet ที่ใช้ย้อม negative control ซึ่งคือ coupon ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Tested Media	Negative Control	
	Polystyrene	Stainless Steel
TSB	0.119	0.045
TSB with glucose supplement	0.145	0.02
MHB	0.157	0.04

Positive control		
Test Pathogen	Control	
	Polystyrene	Stainless Steel
<i>S. aureus</i>		
MRSA		
<i>S. epidermidis</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>A. baumannii</i>		
<i>P. aeruginosa</i>		

Autoclaved		
Test Pathogen	Autoclave	
	Polystyrene	Stainless Steel
<i>S. aureus</i>		
MRSA		
<i>S. epidermidis</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>A. baumannii</i>		
<i>P. aeruginosa</i>		

Biofilm removal enzyme + Autoclaved		
Test Pathogen	Biofilm Removal Enzymes (3M)	
	Polystyrene	Stainless Steel
<i>S. aureus</i>		
MRSA		
<i>S. epidermidis</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>A. baumannii</i>		
<i>P. aeruginosa</i>		

รูปที่ 3.13 ไบโอฟิล์มบน coupons เปรียบเทียบระหว่าง Positive control, Autoclaved coupons และ Biofilm removal enzyme + Autoclaved coupons

ตารางที่ 3.9 Adjusted OD595nm ของความเข้มข้นของ crystal violet ที่ย้อมติดไบโอฟิล์มบน Polystyrene coupons

Tested Pathogens	Biofilm on Polystyrene Coupons (OD595nm)		
	Control	Autoclave	Biofilm Removal Multi-Enzymes (% reduction)
<i>S. aureus</i>	0.385	3.262	-0.044 (100% ↓)
MRSA	0.246	0.538	-0.051 (100% ↓)
<i>S. epidermidis</i>	0.545	0.578	0.122 (77.6% ↓)
<i>E. coli</i>	0.259	0.191	-0.04 (100% ↓)
<i>A. baumannii</i>	0.278	0.421	-0.048 (100% ↓)
<i>P. aeruginosa</i>	2.905	1.613	0.211 (92.7% ↓)

ตารางที่ 3.10 Adjusted OD595nm ของความเข้มข้นของ crystal violet ที่ย้อมติดไบโอฟิล์มบน Stainless steel coupons

Tested Pathogens	Biofilm on Stainless Steel Coupons (OD595nm)		
	Control	Autoclave	Biofilm Removal Multi-Enzymes (% reduction)
<i>S. aureus</i>	0.098	3.28	-0.005 (100% ↓)
MRSA	0.074	0.098	0.008 (89.2% ↓)
<i>S. epidermidis</i>	0.148	0.113	0.005 (96.6% ↓)
<i>E. coli</i>	0.064	0.069	0.012 (81.2% ↓)
<i>A. baumannii</i>	0.046	0.08	0.004 (91.3% ↓)
<i>P. aeruginosa</i>	3.348	2.43	0.079 (97.6% ↓)

ตารางที่ 3.11 ผลการเพาะเชื้อหลังจาก Autoclave และ จาก Biofilm Removal Multi-Enzyme

Pathogens	Autoclave	Biofilm Removal Enzyme
<i>S. aureus</i>	No growth	Growth
MRSA	No growth	Growth
<i>S. epidermidis</i>	No growth	Growth
<i>E. coli</i>	No growth	Growth
<i>A. baumannii</i>	No growth	Growth
<i>P. aeruginosa</i>	No growth	Growth
<i>S. aureus</i>	No growth	Growth

4. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรเป็นจำนวนมาก การลดอุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นสิ่งสำคัญที่บุคลากรทางสาธารณสุขในทุกระดับจะต้องตระหนัก เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาล ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, เชื้อกลุ่ม coagulase-negative staphylococci, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* เป็นต้น⁶ โดยพบว่าเชื้อเหล่านี้มักเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมในรูปแบบไบโอฟิล์ม (Biofilms) ซึ่งคือการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อเชื้ออยู่ร่วมกันหลายเซลล์ โดยที่เซลล์บางส่วนจะยึดเกาะกับพื้นผิวและบางส่วนจะเจริญเป็นโครงสร้างจำเพาะ และโครงสร้างทั้งหมดจะถูกเคลือบด้วยสารโพลีเมอร์ที่เชื้อผลิตขึ้นมา²⁹ การเจริญเติบโตของเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มนี้ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั่วไปรวมทั้งในโรงพยาบาล เช่น ระบบท่อน้ำ อ่างล้างมือ หรือแม้กระทั่งพบในระบบท่อช่วยหายใจ (ventilator system) เป็นต้น¹⁷ ซึ่งนอกจากไบโอฟิล์มจะเป็นแหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญ ยังพบว่าเชื้อที่เจริญเติบโตในรูปแบบนี้มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสูงขึ้น และอาจทนทานต่อการถูกทำลายโดยน้ำยาฆ่าเชื้อ (antiseptics และ disinfectants) มากขึ้นด้วย¹⁴ จากการพบว่าเชื้อก่อโรคที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล การค้นหาวิธีการกำจัดไบโอฟิล์มอย่างมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญและเป็นอีกหนทางที่จะช่วยลดอุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อในโรงพยาบาล

ปัจจุบันรังสีอัลตราไวโอเลตหรือแสงยูวีได้ถูกนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมน้ำดื่ม³⁰ นอกจากนั้นเทคโนโลยี UV disinfection นี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ได้กับโรงพยาบาล ดังจะเห็นได้จากการในห้องผ่าตัด และห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา เป็นต้น²³ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการใช้ยูวีในการกำจัดเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะเชื้อที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มยังมีไม่เพียงพอ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของการใช้รังสียูวีต่อการกำจัดเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาล ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* โดยทดสอบกับเชื้อที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม

จากการศึกษาโดยใช้ 96-well microtiter plate ตามวิธีของ Stepanovic และคณะพบว่าเชื้อกลุ่ม Gram positive bacteria ได้แก่ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและ clinical isolates (ทั้งสายพันธุ์ Meticillin-sensitive และ Meticillin-resistant *S. aureus*) และเชื้อ *S. epidermidis* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดี เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม Gram negative bacteria โดยในกลุ่ม Gram negative bacteria พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้กับรายงานของ Sanchez และคณะ (2013)³¹

เมื่อทดสอบความสามารถในการดำรงชีวิตของเชื้อในสภาวะแห้ง ซึ่งอาจเป็นสภาวะแวดล้อมที่พบได้จริงบนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล พบว่าเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* สายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อ MSSA-1 และ MRSA-3 สามารถมีชีวิตได้ถึง 21 วันในสภาวะแห้งที่ไม่มีสารอาหารหรือน้ำ ในขณะที่เชื้อ Gram-negative bacteria เช่น *A. baumannii* มีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแห้งได้ 7 วัน ส่วนเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐานสามารถทนทานต่อสภาวะดังกล่าวได้เพียง 3 ชั่วโมงและ 3 วัน ตามลำดับ

จากการเลี้ยงเชื้อเพื่อวัดปริมาณไบโอฟิล์มโดยใช้ microtiter plate assay และ Calgary Biofilm Device (CBD) นั้น พบว่าเชื้อ *S. aureus* สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุดเมื่อทดสอบด้วย microtiter plate (รูปที่ 3.1) ในขณะที่ *P. aeruginosa* มีจำนวนเซลล์มากที่สุด ในไบโอฟิล์มที่เจริญบน peg (ตารางที่ 3.3) ทั้งนี้เป็นที่ทราบดีว่าเชื้อทั้งสองมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม แต่เนื่องจาก *S. aureus* เป็นเชื้อ non motile ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จึงสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่ก้นหลุมของ flat microtiter plate ซึ่งเมื่อเลี้ยงใน CBD พบว่ามีเพียงบางส่วนของเชื้อที่ยึดเกาะกับ peg แล้วเจริญเป็นไบโอฟิล์ม ในขณะที่เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อ motile เคลื่อนที่ได้ดี จึงสามารถเคลื่อนที่มายึดเกาะกับทั้งที่ peg และก้นหลุมของ microplate

เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อ clinical isolates ที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด (เชื้อ MRSA-3 สำหรับกลุ่ม Gram positive และเชื้อ ESBL-2 สำหรับกลุ่ม Gram negative) มาเลี้ยงใน Calgary Biofilm Device เพื่อให้เกิดไบโอฟิล์มเจริญบน pegs และนำ pegs มาทดสอบความทนทานต่อรังสี UV ภายใต้ตู้ UV sterilizer ซึ่งมีระยะห่างระหว่างเชื้อทดสอบและแหล่งกำเนิดแสงประมาณ 20 เซนติเมตร และ Biosafety cabinet (Class II) ซึ่งมีระยะห่างระหว่างเชื้อทดสอบและแหล่งกำเนิดแสงประมาณ 50 เซนติเมตร เป็นเวลาทั้งสิ้น 180 นาที พบว่าภายใต้การทดสอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตจากเครื่อง Biosafety cabinet with UV เชื้อ *A. baumannii* ถูกทำลายที่ 1 นาที เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, ESBL-producing *E. coli* ถูกทำลายที่ 5 นาที ในขณะที่ *E. coli* ถูกทำลายที่ 20 นาที และ ต้องใช้เวลาถึง 30 นาทีในการทำลายเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม ส่วนใน UV sterilizer เชื้อ *A. baumannii* และ MRSA ถูกทำลายที่ 1 นาที เชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, และ ESBL-producing *E. coli* ถูกทำลายที่ 5 นาที ในขณะที่ต้องใช้เวลาถึง 20 นาทีในการทำลายเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มได้หมด แสดงว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อถึงแม้เชื้อจะเจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Li และคณะ ที่พบว่า การฉายรังสียูวีด้วยเครื่อง UV-LED สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มได้³² อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีผลแตกต่างกันระหว่างปริมาณไบโอฟิล์ม

ฟิล์มจากการวัดด้วย crystal violet เปรียบเทียบจากตัวอย่างก่อนและหลังการได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต และลักษณะของไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนระหว่างตัวอย่างที่ได้รับการฉายรังสีไม่แตกต่างกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการฉายรังสี แสดงว่ารังสีอัลตราไวโอเลตถึงแม้จะฆ่าเชื้อได้แต่ไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์นำรังสีอัลตราไวโอเลตมาใช้ในการควบคุมเชื้อในสิ่งแวดล้อมโรงพยาบาล แต่อาจมีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในการลดปริมาณไบโอฟิล์ม เช่นการนำรังสีอัลตราไวโอเลตไปใช้กำจัดไบโอฟิล์มใน dental pipeline เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของแหล่งกำเนิดรังสียูวีภายในสิ่งแวดล้อมโรงพยาบาล เช่นภายในห้องผ่าตัดโดยตรง เนื่องจากข้อจำกัดด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ แต่ได้มีการศึกษาโดย Rutala และคณะพบว่า รังสียูวีสามารถกำจัดเชื้อ *S. aureus* (MRSA) ในห้องผู้ป่วยได้มากกว่า 99.9% เมื่อวัดปริมาณเชื้อภายหลังจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อดังกล่าวได้ออกจากห้องพัก³³

Steam sterilization หรือ Autoclave หรือหม้อนึ่งอัดแรงดันไอน้ำ จัดเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายเชื้อ โดยสามารถทำลายเชื้อในระดับสปอร์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการทำลายไบโอฟิล์ม การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า steam sterilization สามารถฆ่าเชื้อในรูปแบบไบโอฟิล์มได้ แต่ไม่สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มได้ การศึกษานี้ยังได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Multi-Enzymes Biofilm Removal (3MTM) พบว่า เมื่อนำตัวอย่างไบโอฟิล์มไปแช่ใน Biofilm removal enzymes เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนการ Autoclave สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มได้สูงสุดถึง 100% แต่การแช่น้ำยาดังกล่าวเพียงอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้

โดยสรุปจะเห็นว่า การควบคุมเชื้อในโรงพยาบาลทั้งโดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตหรือการใช้หม้อนึ่งอัดแรงดันไอน้ำ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีไม่สามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มได้ ถึงแม้ไบโอฟิล์มที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะไม่มีเชื้อแพร่กระจาย แต่โครงสร้างของไบโอฟิล์มที่มี EPS matrix สามารถเป็นแหล่งซ่อนของเชื้ออื่นได้ ดังที่มีการรายงานพบเชื้อ *Cryptosporidium parvum*³⁴ และ Human herpes virus และ Coxsackievirus³⁵ ในไบโอฟิล์มและสามารถติดต่อกับ

การศึกษานี้เป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อหาวิธีหรือมาตรการที่สามารถนำมาใช้เพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล การลดปริมาณเชื้อโดยใช้รังสียูวีและการกำจัดเชื้อบนเปื้อนโดยใช้หม้อนึ่งอัดแรงดันไอน้ำเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ การใช้สารเคมีเช่น Biofilm Removal Multi-Enzyme สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อและไบโอฟิล์มได้มากขึ้น

5. เอกสารอ้างอิง

1. Gamer J., Jarvis W, Emori T. et al. CDC/NHSN surveillance definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988;16:28-40
2. Klevens R., Edwards J., Richards C. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports* 2007; 122: 160-69
3. Plowman R., Graves N., Griffin M. et al. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed. *J Hosp Infect* 2001; 47: 198–209
4. Danchaivijitr S., Tepnimit J., Sripalakij S. et al. Prevalence of nosocomial infections in Thailand 2006. *J Med Assoc Thai* 2007;90: 1524-34
5. Anonymous. The management and control of hospital acquired infection in acute NHS trusts in England. Report by the Comptroller and Auditor General 2000.
6. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,719 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39: 309-17
7. กำธร มาลาธรรม. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล. ใน ตำราโรคติดเชื้อ. สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย 2548: 1344-1355
8. Garner J. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guidelines for isolation precaution in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17: 53-80
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22
10. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93
11. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998;30: 295-304
12. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108.
13. Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:2313-20

14. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8
15. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114-22
16. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley AP. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002;70:6339-45
17. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005;33:S41-916
18. Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani MC. The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch Intern Med* 2002;162:1483-9211
19. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:677-701
20. Coia J., Duckworth G., Edwards D. et al. Guidelines for the control and prevention of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hospital Infect* 2006;635: S1-S44
21. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-79
22. Tingpej P. Decontamination efficacy of vaporized hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on various surfaces. In: *Pseudomonas* 2011, 13th International Conference; 2011; Sydney, Australia; 2011. p. 80 (P98)
23. Rastogi V., Wallace L., Smith L. Disinfection of *Acinetobacter baumannii*-contaminated surfaces relevant to medical treatment facilities with ultraviolet C light. *Mil Med* 2007;172: 1166-1169
24. Stepanovic, S., Irkovic, I.C., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004;38, 428-432.
25. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2000;40, 175-179.
26. Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola,V., Bonaventura, G., Djukic, S., Irkovic, I.C., Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing

conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;71:687-690

27. Simoes L., Simoes M., Vieira M. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 2010; 98: 317-329

28. Ceri H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1771–1776.

29. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991;173:6558-67

30. Hijnen W., Beerendonk E., Medema G. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 2006;40: 3-22

31. Sanchez C., Mende K., Beckius M. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases* 2013;13: 47

32. Li J, Hirota K, Yumoto H, et al. Enhanced germicidal effects of pulsed UV-LED irradiation on biofilms. *J Appl Microbiol.* 2010;109: 2183-90

33. Rutala W., Gergen M., Weber D. Room decontamination with UV radiation. *Infect Control and Hospital Epidemiol* 2010;31: 1025-1029

34. Wolyniak DiCesare E., Hargreaves B., Jellison K. Biofilm roughness determines *Cryptosporidium parvum* retention in environmental biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:4187-4193

35. Mazaheritehrani E., Sala A., Orsi C, et al. Human pathogenic viruses are retained in and released by *Candida albicans* biofilm in vitro. *Virus Res* 2014;179:153-60

Output ที่ได้จากโครงการ

โครงการนี้ศึกษาวิธีการที่สามารถนำมาช่วยลดการเกิดอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในปัจจุบัน โดยเน้นการศึกษาวิธีการที่มีการใช้อยู่คือ การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต และการใช้หม้อนึ่งอัดแรงดันไอน้ำ โดยทดสอบต่อเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลที่ถูกเพาะเลี้ยงในรูปแบบไบโอฟิล์มซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญเติบโตที่พบได้จริงในสิ่งแวดล้อมและเป็นรูปแบบที่สามารถก่อให้เกิดการแพร่กระจายได้ การศึกษานี้พบว่า วิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ แต่ไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ การนำสารเคมีเช่น Multi-Enzymes Biofilm Removal (3M™) มาใช้จะเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดไบโอฟิล์มก่อนนำไปผ่านกระบวนการ steam sterilization โดยสามารถลดปริมาณไบโอฟิล์มได้สูงสุดถึง 100% แต่การใช้สารเคมีดังกล่าวอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้

นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังได้พัฒนาโมเดลสำหรับการศึกษาไบโอฟิล์ม ที่สะดวกและประหยัด โดยโมเดลนี้สามารถเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อต่างชนิดกันในเวลาเดียวกันได้ และสามารถนำไบโอฟิล์มที่เพาะเลี้ยงได้ไปทดสอบทางวิทยาศาสตร์ต่อไปได้

Decontamination Efficacy of Ultraviolet Radiation against Biofilms of Common Nosocomial Bacteria

Pholawat Tingpej MD, PhD*,
Rattana Tiengtip MS*, Sumalee Kondo PhD*

* Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

Background: Ultraviolet radiation (UV) is commonly used to destroy microorganisms in the health-care environment. However, the efficacy of UV radiation against bacteria growing within biofilms has never been studied.

Objective: To measure the sterilization effectiveness of UV radiation against common healthcare associated pathogens growing within biofilms.

Material and Method: *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, ESBL-producing *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were cultivated in the Calgary Biofilm Device. Their biofilms were placed 50 cm from the UV lamp within the Biosafety Cabinet. Viability test, crystal violet assay and a scanning electron microscope were used to evaluate the germicidal efficacy.

Results: Within 5 minutes, UV radiation could kill *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *A. baumannii* and ESBL-producing *E. coli* completely while it required 20 minutes and 30 minutes respectively to kill *E. coli* and *P. aeruginosa*. However, the amounts of biomass and the ultrastructure between UV-exposed biofilms and controls were not significantly different.

Conclusion: UV radiation is effective in inactivating nosocomial pathogens grown within biofilms, but not removing biofilms and EPS. The biofilm of *P. aeruginosa* was the most durable.

Keywords: Biofilms, Nosocomial infections, Ultraviolet radiation, Sterilization

J Med Assoc Thai 2015; 98 (6): 582-8

Full text. e-Journal: <http://www.jmatonline.com>

The growth of bacteria in nature is usually in the form of sessile microcolonies called "biofilms". This growth pattern is created when microorganisms attach to surfaces and aggregate in a self-produced extracellular polymeric substance (EPS)⁽¹⁾, offering protection from various environmental challenges ranging from heavy metal toxicity to host immune response and antimicrobial agents⁽²⁾. Bacteria growing within biofilms were found to be more resistant to treatment with antimicrobial agents than planktonic cells of the same species⁽³⁾.

Biofilms are ubiquitous and have several undesirable impacts in a number of areas. In the body, bacteria growing on biofilms have been recognized as an important cause of several conditions such as catheter-associated infections, infections of prostheses and heart valves, bacterial endocarditis, and infections in people with cystic fibrosis⁽⁴⁾. In healthcare facilities, bacteria can colonize and form biofilms on various areas such as water taps, hand-wash basins and

plumbing systems as well as respiratory ventilators and medical devices⁽⁵⁾. With nosocomial infections being a current global problem, an accumulation of data is beginning to point to the role that contaminated surfaces play in environment-to-patient transmission⁽⁶⁾. Several causative agents of nosocomial infections have been found to be associated with biofilms formation. These agents include *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Aeromonas* spp.^(7,8). Other common bacteria such as *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci have been found colonizing indwelling catheters and medical devices⁽⁹⁾. Such biofilms serve as a possible source of transmission, contributing to the increasing incidence of hospital-acquired infections.

As infection rates in healthcare facilities are a major patient safety concern, several methods have been suggested for minimizing environmental infection, and one of these is Ultraviolet (UV) radiation⁽¹⁰⁾. With its germicidal activity, UV radiation has been used for the control of microorganisms in operating rooms, patient isolation rooms and biosafety cabinets. Its application is usually for the destruction of airborne organisms or microorganisms on surfaces;

Correspondence to:

Tingpej P, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand.

Phone: +66-2-9269710

E-mail: mpholawat@hotmail.com

however, its germicidal effectiveness can be hindered by organic matter such as soil and, perhaps, biofilms⁽¹¹⁾.

While hospitals generally have sanitation protocols regarding surface bio-decontamination, they are not created specifically to deal with biofilms. This study is thus conducted to measure the efficacy of UV radiation against common pathogens associated with health-care infections when they grow within the biofilms.

Material and Method

Bacterial isolates and cultivation

Tested bacterial isolates included five standard strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 15305, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and two clinical isolates: methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli*. All standard strains were purchased from Department of Medical Sciences Thailand (DMST), Thailand, and the clinical isolates were from Thammasat Hospital. All isolates except *P. aeruginosa* were grown in tryptic soy broth supplemented with 2% glucose. *P. aeruginosa* isolate was grown in cation-adjusted Muller Hinton broth.

Biofilm cultivation

Bacterial biofilms were cultivated using the Calgary Biofilm Device (CBD) as previously described⁽¹²⁾. In brief, 200 μ L of each tested bacterial inoculum were suspended in a 96-well plate that was covered by a lid that had 96 pegs. Plates were incubated without shaking for one hour to allow bacterial cells to attach to the pegs' surface. They were then incubated at 37°C with shaking at 40 rpm for 24 hours. Pegs were washed with 0.9% saline solution to remove unattached cells prior to each experiment.

Assessment of UV efficacy

Viability plate count

Biofilms growing on pegs were placed in the Biosafety cabinet class II with UV lamp (SafeFast™) 50 centimeters away from the UV light source. Biofilms were tested against UV radiation at different time points including 1, 5, 10, 15, 20, 30 minutes and 1, 2 and 3 hours. After each time point, the viability of biofilms on each peg was assessed. Briefly, pegs were placed in a 96-well plate containing 0.9% saline solution, followed by 5-minute ultrasonication two times and shaking at 600 rpm for 5 minutes. Bacterial solution

was serially diluted and plated on nutrient agars. Parallel pegs with biofilms that were covered with aluminum foil were used as UV-non-exposed control.

Crystal violet assay

The biomass (both living and dead cells and extracellular polymeric matrix) of biofilms was assessed using a crystal violet (CV) assay. After being treated with UV for 30 minutes, pegs with biofilms were immersed in CV for 5 hours. After this, the unbound CV was removed by washing, and the biofilm-bound dye was released in acetone-ethanol solution. The absorbance was measured at OD 595 nm. UV-non-exposed biofilms were used as control. Tests were done in triplicate.

Scanning electron microscopy (SEM)

The ultra-structure of biofilms of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were visualized under SEM. After being exposed to UV for 30 minutes, each peg was fixed in 0.2M cacodylate buffer containing 3% glutaraldehyde and 0.15% alcian blue for 3 hours. Pegs were then washed out with buffer followed by dehydration in serial-dilution alcohol, and then immersed in hexamethyldisilazane (HMDS) for 5 minutes before being dried overnight in a desiccator. Each peg was then coated with gold film using a sputter coater (SC7640, Polaron-Fisons) before visualization under a SEM (JEOL, model JSM-5410LV).

Statistical analysis

A standard t-test was applied to analyze the amount of biomass as stained by CV between UV-exposed and non-exposed samples. The *p*-value of <0.05 were considered to be significant.

Results

Biofilm cultivation

The CBD created conditions favorable to the growth of bacteria in the biofilms mode. Pegs provided a surface for bacterial cells to attach to while surrounded by broth that continuously flowed around it. Within 24 hours, biofilms were observed as shown in Fig. 1.

UV efficacy against viability of biofilms

The germicidal efficacy of UV radiation against bacterial biofilms was measured using viability count. The average viable bacteria per peg before UV exposure was 6.5×10^5 cells. *P. aeruginosa* had the highest number of cells attaching to the peg surface

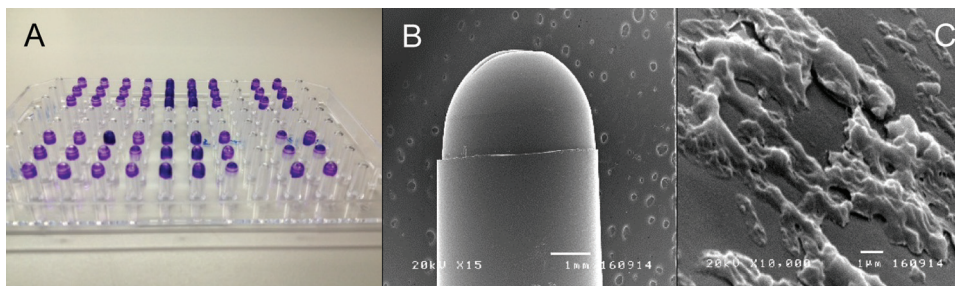


Fig. 1 Calgary Biofilm Device. (A) Biofilms grown on pegs and stained by crystal violet, (B) Scanning electron micrograph of a peg (original magnification x15), (C) Scanning electron micrograph of *P. aeruginosa* biofilms (original magnification x10,000). Note cells attached to surface and were covered by EPS.

(2.1×10^6 cells). Biofilms of *A. baumannii* showed no growth after 1 minute of UV exposure while biofilms of *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA and ESBL-producing *E. coli* took 5 minutes and biofilms of *E. coli* took 20 minutes (Fig. 2). *P. aeruginosa* had the highest number of cells recovered from peg-attached biofilms, which required up to 30 minutes of UV exposure to inhibit the growth completely of this isolate (Fig. 2).

Biomass quantification using CV assay

The total biomass, which included bacterial cells (both living and dead) and extracellular polymeric matrix, was measured from the peg samples obtained after 30 minutes of UV exposure. There was no significant difference between biomass of biofilms of each isolate at 0 minute and biofilms both exposed and not exposed to the UV light (Fig. 3).

Scanning electron microscopy

The detailed structure of biofilms was revealed under SEM (Fig. 4). All isolates showed biofilms in which cells attached to the surface. EPS appeared as a matrix supporting cellular attachment in *S. aureus* (Fig. 4A) and *S. epidermidis* (Fig. 4C) or covering bacterial cells as found in *E. coli* (Fig. 4E) and *P. aeruginosa* (Fig. 4G). *P. aeruginosa* appeared to produce more EPS than other isolates. Overall, the cellular structure of UV-treated and control samples appeared to be similar, but the amount of EPS seemed to be lesser in the UV-treated samples (especially in *S. epidermidis* and *E. coli*) than the control samples.

Discussion

An increasing body of evidence indicates that contamination of the environment contributes to hospital-associated infections⁽⁶⁾. This environment contamination can exist in air-borne form, be

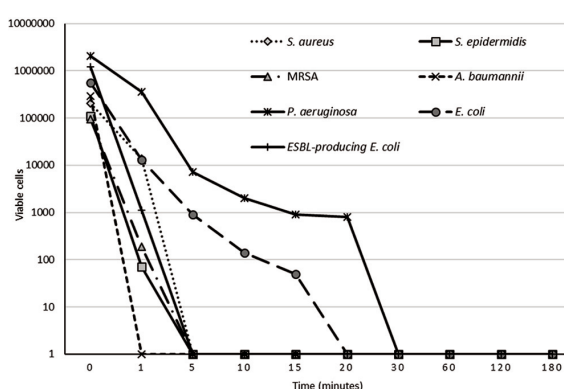


Fig. 2 UV efficacy against the viability of biofilms. Biofilms of *A. baumannii* showed no growth after 1 minute of UV exposure. *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, ESBL-producing *E. coli* showed no growth after 5 minutes of UV exposure. *E. coli* and *P. aeruginosa* showed no growth after 20 and 30 minutes of UV exposure, respectively. Each experiment was performed in duplicate on two separate occasions.

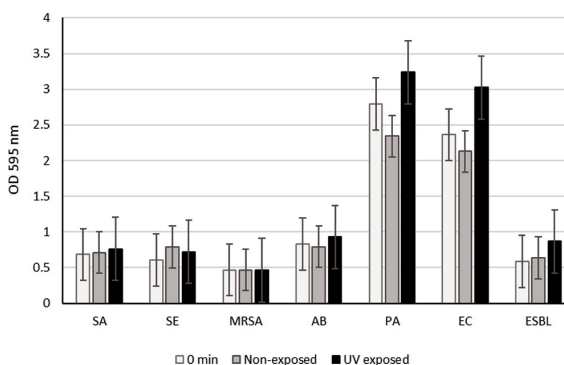


Fig. 3 Crystal-violet stained biomasses of UV-exposed and UV-non-exposed samples. Within each isolate, there was no significant difference among the total biomasses of biofilms measured at 0 minute and 30 minutes after UV exposure and non-exposure.

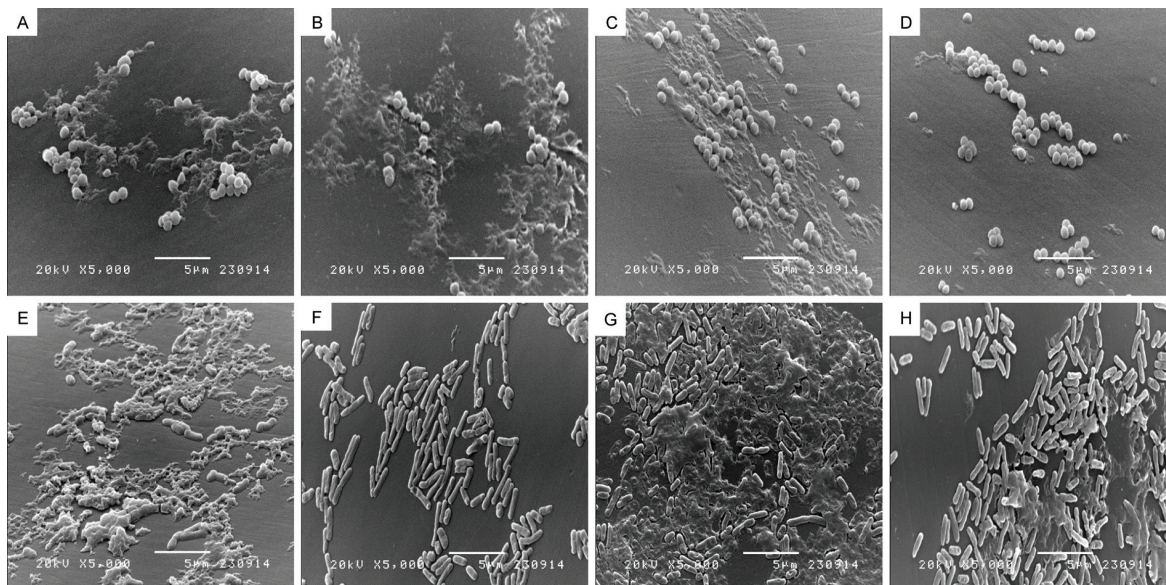


Fig. 4 Scanning electron micrographs of (A) *S. aureus* no-UV-exposure, (B) *S. aureus* with 30-minutes UV exposure, (C) *S. epidermidis* no-UV-exposure, (D) *S. epidermidis* with 30-minutes UV exposure, (E) *E. coli* no-UV-exposure, (F) *E. coli* with 30-minutes UV exposure, (G) *P. aeruginosa* no-UV-exposure, (H) *P. aeruginosa* with 30-minutes UV exposure. All images were x5,000 magnification. Biofilms can be seen as surface-attached cells which are surrounded by an EPS matrix. Overall, the cellular structure of UV-treated and control samples appeared to be similar, but the amount of EPS seemed to be less in the UV-treated samples (especially in *S. epidermidis* and *E. coli*) than in the control samples.

water-borne or manifest itself as contamination of the inanimate objects around patients. It has been suggested that surface contamination is likely to exist in the form of biofilms⁽¹³⁾. Indeed, a number of hospital items from one intensive care unit (including curtain, door, washbasin rubber and reagent bucket) were found to be colonized by biofilms that still contained viable pathogens⁽¹³⁾. Various pathogens such as *Legionella* spp., *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., and *Aeromonas* spp., have also been shown to be associated with biofilms in the hospital environments. Biofilms from one of the most common pathogens associated with healthcare infections, *P. aeruginosa*, found in water taps in hospitals, was recognized as an ideal reservoir for environment-to-patient transmission⁽¹⁴⁾.

Infection rates in healthcare facilities are a major patient safety concern. As biofilms contribute to hospital-associated infections, efforts to improve environmental hygiene should be encouraged, at the very least, effective cleaning and disinfecting surfaces in healthcare facilities. Currently, sterilants used for room decontamination include formaldehyde and hydrogen peroxide vapor⁽¹¹⁾. UV radiation has also

been suggested as an alternative method for the control of microorganisms^(10,11). It has several potential applications in the healthcare environments, including being used for controlling contamination within operation rooms and isolation rooms⁽¹⁵⁾. However, there are limited available data concerning its true efficacy against biofilms.

In the present study, the CBD was chosen for growing bacteria in the biofilm mode. The pegs (part of the CBD) were shown to support the biofilm proliferation. As seen in Fig. 1, *P. aeruginosa* cells irreversibly attached to the surface and were encased by EPS. The UV radiation was shown to be able to kill bacterial cells completely with a maximum exposure time of 30 minutes (Fig. 2). *P. aeruginosa* and *E. coli* were found to require longer periods of exposure (30 minutes and 20 minutes, respectively) compared to *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, *A. baumannii*, and ESBL-producing *E. coli*. This correlates with the amount of biofilms they produced: *P. aeruginosa* and *E. coli* produced the highest amount of biofilms compared to other isolates (Fig. 3). These findings suggest that biofilms may play role as a protection from destruction by UV.

The CV assay showed that there was no significant difference in the amount of biomass between UV-exposed or non-exposed samples. This is because the biomass contained both living and dead cells as well as EPS. As expected, although UV radiation can completely kill cells within the biofilms, it cannot remove the biofilms from surfaces. We further looked into the ultra-structure of biofilms after UV exposure, using SEM. Cellular structures of both samples were unchanged, although it could be noticed that in *S. epidermidis* and *E. coli*, the amount of EPS in UV-exposed samples was less than for UV-non-exposures. However, this SEM finding did not correlate with the amount of biomasses as stained by CV. The biomass of UV-exposed *E. coli* was lower (not statistically significant) than in the UV-non-exposed sample (Fig. 3). It is possible that EPS became dry and exfoliated during the sample preparation process for SEM.

The biofilm mode of growth is normally found in nature-in both the environment and the human body. In this study, we selected common bacterial pathogens associated with healthcare infections and grew them in biofilms, in order to represent the real contamination burden found in the hospital environment. Overall, the present study demonstrates that UV radiation is effective in destroying bacteria growing in the form of biofilms. It should be noted that all experiments were conducted within the biosafety cabinet, instead of in hospital rooms, as it is not possible to expose these notorious pathogens to the environment according to National Biosafety Regulation.

The application of UV radiation systems in a hospital setting has been previously reported⁽¹⁶⁾. Rutala et al showed that UV radiation could decontaminate more than 99.9% of MRSA within isolation rooms after they were occupied by an infected patient⁽¹⁶⁾. A study using a simulated health-care room also showed that UV radiation reduced up to 98% of aerosolized *Mycobacterium* spp. and up to 80% of *Bacillus subtilis* spores⁽¹⁷⁾. Moreover, in the water industry, UV disinfection technology has long been used to control water quality. It is effective against waterborne pathogens including bacteria (such as *E. coli*, *Salmonella* Typhi, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* and *L. pneumophila*), viruses (such as Hepatitis A virus, Calicivirus, Rotavirus, and Poliovirus) and protozoa (such as *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Acanthamoeba* spp.)⁽¹⁸⁾. Findings from this study emphasize the efficacy of UV radiation against common pathogens, which are the leading

causes of healthcare-associated infections. Although the present study and those mentioned in this paper show the benefit of UV radiation, the current view on its applicability indicates that UV germicidal irradiation cannot be applied as a primary intervention for infection control. However, it can be considered for use in conjunction with other well-established methods, such as appropriate heating, ventilating, and air-conditioning (HAVC) systems for air cleaning⁽¹⁹⁾ or the use of liquid chemical disinfectants for surface disinfection⁽²⁰⁾.

Conclusion

The present study shows that UV radiation is effective in destroying common nosocomial bacterial pathogens grown within biofilms, but not in removing biofilms from surfaces. Bacteria with greater biofilm-formation capacity (*P. aeruginosa* and *E. coli*) require longer periods of UV-exposure time. UV germicidal irradiation may provide an enhanced method of surface disinfection especially when used in combination with conventional cleaning methods.

What is already known on this topic?

Biofilms contaminating hospital environments are known as a potential source of transmission to patients. UV radiation has been used as one of the methods for control of hospital infections. However, there are limited available data concerning the true efficacy of this method against biofilms especially those of common pathogens causing healthcare-associated infections.

What this study adds?

This study shows that UV radiation can kill common nosocomial bacteria growing within biofilms, but not remove biofilms on surfaces. Up to 30 minutes were required to kill viable cells of bacteria (*P. aeruginosa*) completely, which produced the highest amount of biofilms.

Acknowledgement

This study was supported by Thailand Research Fund.

Potential conflict of interest

None.

References

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.

- Science 1999; 284: 1318-22.
2. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93.
 3. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001; 358: 135-8.
 4. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 95-108.
 5. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect 2006; 64: 313-25.
 6. Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. J Hosp Infect 2007; 65 (Suppl 2): 50-4.
 7. Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani MC. The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. Arch Intern Med 2002; 162: 1483-92.
 8. Exner M, Kramer A, Lajoie L, Gebel J, Engelhart S, Hartemann P. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. Am J Infect Control 2005; 33 (5 Suppl 1): S26-40.
 9. Silverstein A, Donatucci CF. Bacterial biofilms and implantable prosthetic devices. Int J Impot Res 2003; 15 (Suppl 5): S150-4.
 10. Rastogi VK, Wallace L, Smith LS. Disinfection of *Acinetobacter baumannii*-contaminated surfaces relevant to medical treatment facilities with ultraviolet C light. Mil Med 2007; 172: 1166-9.
 11. Rutala WA, Weber DJ. Are room decontamination units needed to prevent transmission of environmental pathogens? Infect Control Hosp Epidemiol 2011; 32: 743-7.
 12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1771-6.
 13. Vickery K, Deva A, Jacombs A, Allan J, Valente P, Gosbell IB. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. J Hosp Infect 2012; 80: 52-5.
 14. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. Am J Infect Control 2005; 33 (5 Suppl 1): S41-9.
 15. Riley R. Ultraviolet air disinfection: rationale for whole building irradiation. Infect Control Hosp Epidemiol 1994; 15: 324-8.
 16. Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Room decontamination with UV radiation. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31: 1025-9.
 17. Xu P, Peccia J, Fabian P, Martyny JW, Fennelly KP, Hernandez M, et al. Efficacy of ultraviolet germicidal irradiation of upper-room air in inactivating airborne bacterial spores and mycobacteria in full-scale studies. Atmos Environ 2003; 37: 405-19.
 18. Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Res 2006; 40: 3-22.
 19. Memarzadeh F, Olmsted RN, Bartley JM. Applications of ultraviolet germicidal irradiation disinfection in health care facilities: effective adjunct, but not stand-alone technology. Am J Infect Control 2010; 38 (5 Suppl 1): S13-24.
 20. Kac G, Podglajen I, Si-Mohamed A, Rodi A, Grataloup C, Meyer G. Evaluation of ultraviolet C for disinfection of endocavitary ultrasound transducers persistently contaminated despite probe covers. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31: 165-70.

ประสิทธิภาพของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยในโรงพยาบาลซึ่งเจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม

พลวัฒน์ ดิ่งเพชร, รัตนา เตียงทิพย์, สุมาลี คอนโด

ภูมิหลัง: รังสีอัลตราไวโอเลตถูกนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาล อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อการทำลายเชื้อที่เจริญในไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญของเชื้อที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์: เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในการกำจัดเชื้อที่เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์ม โดยทดสอบในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของภาวะการติดเชื้อในโรงพยาบาล

วัสดุและวิธีการ: เพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA), *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *ESBL-producing E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* ให้เจริญในรูปแบบไบโอฟิล์มใน Calgary Biofilm Device แล้วทำการทดสอบไบโอฟิล์มกับรังสีอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ กัน เพื่อวัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิต นอกจากนั้นไบโอฟิล์มที่ผ่านการฉายรังสีเป็นเวลา 30 นาที ได้ถูกนำมาวัดปริมาณโดยการย้อมด้วย crystal violet และตรวจดูโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เปรียบเทียบกับไบโอฟิล์มที่ไม่ได้รับการฉายรังสี

ผลการศึกษา: เชื้อ *A. baumannii* ถูกทำลายทั้งหมดที่ 1 นาที และเชื้อ *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *ESBL-producing E. coli* ถูกทำลายทั้งหมดที่ 5 นาที ส่วนเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ต้องใช้เวลาถึง 20 และ 30 นาที จึงจะถูกทำลายทั้งหมด อย่างไรก็ตามปริมาณไบโอฟิล์มจากการวัดด้วย crystal violet และลักษณะของไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนระหว่างตัวอย่างที่ได้รับการฉายรังสีไม่แตกต่างกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการฉายรังสี

สรุป: รังสีอัลตราไวโอเลตมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อในไบโอฟิล์ม แต่ไม่ได้กำจัดไบโอฟิล์มให้หมดไป ไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* มีความทนทานต่อการทำลายมากที่สุด
