

บทที่ 2

วัสดุและวิธีการศึกษา

2.1 ตัวอย่างแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* จากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 จนถึงเดือนสิงหาคม 2554 จำนวน 4,818 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่แยกได้จากปัสสาวะร้อยละ 42.7 เสมหะร้อยละ 22.0 หนองร้อยละ 17.7 สารน้ำจากร่างกายร้อยละ 10.5 และเลือดร้อยละ 7.2 ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 44.1 *K. pneumoniae* ร้อยละ 25.3 *Enterobacter* spp. ร้อยละ 10.7 และ *Proteus mirabilis* ร้อยละ 6.8 (ตารางที่ 2.1) โดยเก็บเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar หรือหลอดอาหาร triple sugar iron agar จากนั้นเก็บรักษาในหลอดอาหาร nutrient agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดสอบ เชื้อที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจกรองเอนไซม์ carbapenemase เก็บรักษาใน skimmed milk (Himedia, Mumbai, India) ที่เติมกลีเซอรอล (VWR International, Poole, England) ร้อยละ 15-20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

โครงการนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (ICU GCP) โครงการเลขที่ HE551092 เมื่อวันที่ 1 เมษายน 2556 (ภาคผนวก)

2.2 การตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี disc diffusion

ตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อทั้งหมด 4,818 ตัวอย่างโดยใช้แผ่นยา ertapenem 10 ไมโครกรัม หรือ imipenem 10 ไมโครกรัม (Oxoid) วางไว้ตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นป้ายเชื้อเป็นเส้นตรงห่างจากขอบแผ่นยาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จนถึงขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาด inhibition zone ถ้าขนาด inhibition zone ของยา ertapenem น้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 มิลลิเมตร (23) หรือ imipenem น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร (24) นำไปทดสอบยืนยันต่อไป เชื้อควบคุมการทดสอบ ได้แก่ *E. coli* ATCC25922

2.3 การตรวจหาเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีทางฟิโนไทป์

ตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีทางฟิโนไทป์ในเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase ทั้งหมดดังนี้

2.3.1 วิธี modified Hodge (MHT)

ปรับเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ป้ายเช็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร วางแผ่นยา imipenem หรือยา ertapenem 10 ไมโครกรัม ใช้ loop ชีตเชื้อที่ต้องการทดสอบจากขอบแผ่นยาจนถึงขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ้า inhibition zone ของ *E. coli* ATCC25922 รอบเชื้อที่ทดสอบเป็นรอยเว้าเข้าไปแสดงว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenemase ได้ (23)

2.3.2 วิธี combined disc

ใช้ยา imipenem หรือ ertapenem 10 ไมโครกรัมที่เติม β -lactamase inhibitor 3 ชนิด ได้แก่ phenylboronic acid (PBA) 300 ไมโครกรัมเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ class A carbapenemase และ AmpC β -lactamase (AmpC) ยา oxacillin (OX) 1000 ไมโครกรัมเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ AmpC และ EDTA 292 ไมโครกรัมเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ class B carbapenemase หรือ MBL อ่านผลบวกเมื่อให้ขนาดของ inhibition zone ต่อยา imipenem หรือ ertapenem ที่เติม inhibitor กว้างกว่ายาที่ไม่ได้เติมมากกว่าหรือ

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* จำนวน 4,818 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วย
โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2554

Organisms	No. of test isolates various specimens					Total (%)
	Urine	Sputum	Pus	Body fluid	Blood	
<i>E. coli</i>	1207	182	335	222	179	2125(44.1)
<i>Enterobacter</i> spp.	136	189	112	46	33	516(10.7)
<i>K. pneumoniae</i>	314	509	170	131	94	1218(25.3)
<i>Klebsiella</i> spp.	40	41	15	18	11	125(2.6)
<i>K. oxytoca</i>	17	5	13	7	0	42(0.9)
<i>S. marcescens</i>	5	22	5	2	1	35(0.7)
<i>Serratia</i> spp.	2	22	2	1	0	27(0.6)
<i>C. diversus</i>	29	13	10	10	3	65(1.3)
<i>C. freundii</i>	20	4	9	9	1	43(0.9)
<i>P. mirabilis</i>	157	42	97	25	5	326(6.8)
<i>P. vulgaris</i>	15	7	18	6	1	47(1.0)
<i>P. penneri</i>	1	0	3	1	0	5(0.1)
<i>P. rettgeri</i>	33	14	10	4	1	62(1.3)
<i>Providencia</i> spp.	9	4	1	3	0	17(0.4)
<i>M. morganii</i>	61	7	39	12	4	123(2.6)
<i>E. tarda</i>	1	0	7	0	0	8(0.2)
<i>Salmonella</i> gr.B	1	0	2	1	3	7(0.1)
<i>Salmonella</i> gr.C	3	0	1	0	0	4(0.1)
<i>Salmonella</i> gr.D	3	0	4	6	9	22(0.5)
<i>Salmonella</i> gr.E	1	0	0	0	0	1(0.1)
Total	2055(42.7)	1061(22.0)	853(17.7)	504(10.5)	345(7.2)	4818(100)

เท่ากับ 5 มิลลิเมตร โดยเชื้อที่ให้ผลบวกกับ PBA อย่างเดียวแปลผลว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ calss A carbapenemase เชื้อที่ให้ผลบวกกับ PBA และ OX แปลผลว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ AmpC และเชื้อที่ให้ผลบวกกับ EDTA อย่างเดียวแปลผลว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ MBL (24,25)

2.4 การตรวจชนิดของเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี multiplex PCR

ตรวจชนิดของเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองทั้งหมดโดยวิธี multiplex PCR ได้แก่ ชุดแรกตรวจหา *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SPM}* และ *bla_{SIM}* (26) และอีกหนึ่งชุดตรวจหา *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* และ *bla_{OXA-48}* (27) (ตารางที่ 2.2) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจากนั้นสกัด DNA โดยเชื้อเชื้อจำนวน 1 โคโลนีลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้เชื้อกระจายตัวไม่จับเป็นก้อน ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1XTaq DNA polymerase reaction buffer (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil) magnesium chloride ความเข้มข้น 2.0 mM, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (SibEnzyme, Novosibirsk, Russia) ความเข้มข้น 0.2 mM, ไพร์เมอร์ของ multiplex PCR ชุดแรกใช้ความเข้มข้นชนิดละ 0.8 μ M ยกเว้นไพร์เมอร์ VIMF และ VIMR ใช้ความเข้มข้นชนิดละ 0.4 μ M ส่วนอีกชุดใช้ไพร์เมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 0.125 μ M, Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.625 U และเติม DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที จำนวน 36 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที โดยใช้เครื่อง G-Strom Thermal cycler (Gene Technologies, Essex, England) แยก PCR product ที่ได้ในวัน (ISC BioExpress, Madrid, Spain) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ด้วยกระแสไฟฟ้า และใช้ 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) ในการเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอ จากนั้นย้อมวุ้นในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที นำวุ้นที่ย้อมแล้วไปดูด้วยเครื่อง UV illumination Gel DOC 1000 (Bio-Rad, CA, USA) และบันทึกภาพไว้

เชื้ออ้างอิงที่ใช้เป็นเชื้อควบคุมผลบวก ได้แก่ *P. aeruginosa* ที่มียีน *bla_{IMP-1}* (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. David Livermore, Antibiotic Resistance Monitoring & Reference Laboratory, HPA Microbiology Services-Colindale Unit, London, UK), *P. aeruginosa* ที่มียีน *bla_{VIM-2}* (12), *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705 ที่มียีน *bla_{KPC-1}*, *K. pneumoniae* ที่มียีน *bla_{OXA-48-like}* (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) และ *C. freundii* ที่มียีน *bla_{NDM-1}* (ได้จากการศึกษาครั้งนี้และตรวจยืนยันโดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว)

2.5 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla_{IMP}* และ integron

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla_{IMP}* และ integron ที่เกี่ยวข้องในเชื้อที่ให้ผลบวกทั้งหมดโดยใช้ไพร์เมอร์ 5'CS คู่กับ 3'CS, 5'CS คู่กับ IMP-R และ IMP-F คู่กับ 3'CS (28) (ตารางที่ 2.2) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1XTaq DNA polymerase reaction buffer, magnesium chloride ความเข้มข้น 2.5 mM, dNTPs ความเข้มข้น 0.2 mM, ไพร์เมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 0.3 μ M, Taq DNA polymerase (Invitrogen) 1.25 U และเติม DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย predenaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นทำให้ PCR product บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (NucleoSpin Extract II kit,

ตารางที่ 2.2 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Genes	Primer names	Oligonucleotide sequences (5' → 3')	Expected sizes of PCR product (bp)	References
<i>bla</i> _{IMP}	IMX-F	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	188	26
	IMX-R	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T		
<i>bla</i> _{VIM}	VMX-F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390	
	VMX-R	CGA ATG CGC AGC ACC AG		
<i>bla</i> _{GIM-1}	GMX-F	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA	477	
	GMX-R	AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC		
<i>bla</i> _{SIM-1}	SIMX-F	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	570	
	SIMX-R	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG		
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM1-F	CCA AGA TTG ATT CGG ACG TT	344	This study
	SPM1-R	TCG CTT CAG ATC CTC GTT TT		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48F	GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC	438	27
	OXA-48R	CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG		
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	621	
	NDM-R	CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG	798	
	KPC-R	CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG		
Class 1	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AGC		28
integron	3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GAT		
<i>IS125</i>	IS125D-F	GGC GTT AGA TTG GCT TAC ACC		This study
<i>Ble</i>	Ble-R	GAT CAG GTA GCC GAT CCT CA		This study
<i>TrpF</i>	TrpF-R	AGC TTG GCT GCC ACC AGT		This study
strain	ERIC-1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C		29
typing	ERIC-2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G		

GmbH & Co., Duren, Germany) และส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งใช้หลักการ dideoxy-chain termination ด้วยเครื่องวิเคราะห์หัตถ์อัตโนมัติ MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Champaign, USA) ไพร์เมอร์ที่ใช้ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ IMP-F, IMP-R, 5'CS และ 3'CS

2.6 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และยีนรอบข้างของยีน *bla_{NDM}*

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *bla_{NDM}* ทั้งยีนและยีนบริเวณข้างเคียงจากเชื้อที่ให้ผลบวกทั้งหมด โดยได้ออกแบบไพร์เมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla_{NDM}* ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ IS125D-F, Ble-R และ TrpF-R เตรียม PCR product โดยใช้ไพร์เมอร์ IS125D-F คู่กับ NDM-R, NDM-F คู่กับ Ble-R และ NDM-F คู่กับ TrpF-R ซึ่งให้ product ขนาด 942 bp, 1004 bp และ 1286 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X *Taq* DNA polymerase reaction buffer, magnesium chloride ความเข้มข้น 1.5 mM, dNTPs ความเข้มข้น 0.2 mM, ไพร์เมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 0.5 μ M, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) 1.25 U และเติม DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 36 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ทำให้ PCR product บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป และส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ไพร์เมอร์ที่ใช้ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ NDM-F, NDM-R, IS125D-F, Ble-R และ TrpF-R

2.7 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ

ทดสอบความไวของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ต่อสารต้านจุลชีพต่างๆ โดยวิธี disc diffusion (Oxoid) ได้แก่ 30- μ g amikacin, 10/10- μ g ampicillin/sulbactam, 30- μ g aztreonam, 30- μ g cefepime, 30- μ g cefpirome, 30- μ g cefotaxime, 75/30- μ g cefoperazone/sulbactam, 30- μ g ceftazidime, 30- μ g ciprofloxacin, 10- μ g colistin, 10- μ g ertapenem, 10- μ g gentamicin, 10- μ g imipenem, 5- μ g levofloxacin, 10- μ g meropenem, 30- μ g nalidixic acid, 30- μ g netilmicin, 10- μ g norfloxacin, 5- μ g ofloxacin, 100/10- μ g piperacillin/tazobactam, 1.25/23.75- μ g trimethoprim-sulfamethoxazole และ 15- μ g tigecycline และหาค่า MIC ต่อยา ertapenem (MSD, Paris, France), imipenem (MSD, NJ, USA) และ meropenem (Siam Bheasach, Bangkok, Thailand) (ความเข้มข้น 0.0625-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) โดยวิธี agar dilution เชื้อควบคุมผลไวต่อยา ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 อ่านและแปลผลการทดสอบตามเกณฑ์ของ CLSI (23)

2.8 การตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ดีอยา

แยกสายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค ERIC-PCR (29) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X *Taq* DNA polymerase reaction buffer, magnesium chloride ความเข้มข้น 2.0 mM, dNTPs ความเข้มข้น 0.2 mM, ไพร์เมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 0.5 μ M, *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, Ontario, Canada) 2 U และเติม DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย predenaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 7 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 8 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 16 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า ถ้าเชื้อให้แถบ DNA แตกต่างกัน 1 แถบขึ้นไปแปลผลเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน (30)