

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof David Livermore, Antibiotic Resistance Monitoring & Reference Laboratory, HPA Microbiology Services-Colindale Unit, London, UK และศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemases ขอขอบคุณหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณคุณวรวิทย์ ภาโสมน นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ช่วยเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ขอขอบคุณคุณเสกสิทธิ์ สังคีรี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

ยากลุ่ม carbapenems เป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบรวมทั้งแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- or AmpC β -lactamase (AmpC) อย่างไรก็ตามมีรายงานเชื้อวงศ์นี้ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems โดยเชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenemase จากทั่วโลก ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์อัตราความชุกของเอนไซม์ ESBL ใน *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* สูงถึงประมาณร้อยละ 50 การใช้ยากลุ่ม carbapenems เพิ่มขึ้นทำให้มีโอกาสเกิดการคัดเลือกเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ได้ การศึกษารังนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธีฟิโนไทป์และจีโนไทป์ โดยทำการศึกษาในเชื้อจำนวน 4,818 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2554 ผลการตรวจกรองเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี disc diffusion ด้วยยา ertapenem และ imipenem พบว่ามีเชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 104 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.2) เมื่อตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี modified Hodge, phenylboronic acid- และ EDTA-carbapenem combined disc พร้อมทั้งตรวจหายีน *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48} ด้วยวิธี multiplex PCR และตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน พบว่ามีเชื้อ 8 ตัวอย่างที่ผลิตเอนไซม์ metallo- β -lactamase (MBL) โดยพบเอนไซม์ NDM-1 ใน *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* ชนิดละ 2 ตัวอย่าง และเอนไซม์ IMP-14a ใน *K. pneumoniae* จำนวน 2 ตัวอย่าง จากนั้นตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อทั้ง 8 ตัวอย่างด้วยวิธี ERIC-PCR พบว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กันยกเว้น *C. freundii* 2 ตัวอย่างที่เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพต่างๆพบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ NDM-1 มีค่า MIC ต่อยากลุ่ม carbapenems สูงกว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ IMP-14a และเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL ทั้งหมดยังไวต่อยา colistin และ tigecycline จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการสำรวจเอนไซม์ carbapenemase โดยเฉพาะเอนไซม์ NDM-1 ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นงานที่จำเป็นและเร่งด่วนสำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเหล่านี้ในประเทศไทย การตรวจกรองด้วยวิธี ertapenem disc diffusion ร่วมกับการตรวจยืนยันด้วยวิธี EDTA combined disc เป็นวิธีที่เสนอแนะสำหรับการตรวจหาเอนไซม์ MBL ในงานประจำวัน

คำรหัส: metallo- β -lactamase, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae*

Abstract

Carbapenems are recommended for treatment of serious infections caused by Gram negative bacilli including extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- or AmpC β -lactamase (AmpC)-producing Enterobacteriaceae. However, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae by production of carbapenemases have emerged worldwide. In Srinagarind hospital, ESBL-producing isolates have been found with high prevalence rates in 2010 (approximately 50% for *E. coli* and *K. pneumoniae*). An increasing use of carbapenems may lead to selection of carbapenem-resistant strains. Therefore, this study aimed to investigate and characterise carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from Srinagarind Hospital by both phenotypic and genotypic methods. A total of 4,818 non-repetitive Enterobacteriaceae isolates collected from patients between October 2010 and August 2011 were screened for the presence of carbapenemases by ertapenem and imipenem disc diffusion test. Of the 4,818 isolates, 104 (2.2%) were carbapenemase screening-positive. Confirmatory tests for carbapenemase production by modified Hodge test, phenylboronic acid- and EDTA-carbapenems combined disc tests followed by two multiplex PCR of *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{SIM} and *bla*_{GIM}, and of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48} and nucleotide sequencing revealed that 8 of the 104 isolates produced metallo- β -lactamases (MBLs); NDM-1 in two isolates of each *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* and IMP-14a in other two isolates of *K. pneumoniae*. Strain typing by ERIC-PCR showed that all MBL-producing isolates were of different strains except clonal strains of *C. freundii*. Antimicrobial susceptibility testing revealed that the carbapenem MICs for the NDM-1 producers were higher than those for the IMP-14a producers. In addition, all MBL-producing isolates were susceptible to colistin and tigecycline. Laboratory-based surveillance of these carbapenemases particularly NDM-1 in Enterobacteriaceae is urgently needed to control and prevent the spread of these resistance determinants in our country. The ertapenem disc screening test together with the EDTA-carbapenem combined disc test are recommended for MBL detection in routine laboratory.

Keywords: metallo- β -lactamase, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	vii
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการ	7
ผลการทดลอง	12
วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา	28
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	34
หนังสือรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	35
การเผยแพร่ผลงาน	36
บทความวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียวงศ์ <i>Enterobacteriaceae</i> จำนวน 4,818 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2554	8
ตารางที่ 2.2 ไพรมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	10
ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจยืนยันการผลิตเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี modified Hodge และ combined disc และการตรวจชนิดของเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี multiplex PCR	14
ตารางที่ 3.2 ผลการตรวจคัดกรองเอนไซม์ carbapenemase, modified Hodge, EDTA combined disc และชนิดของยีน β -lactamase ในเชื้อ 8 ตัวอย่างที่ผลิตเอนไซม์ MBL	16
ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL	26

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 3.1	การตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีทางฟิโนไทป์ ได้แก่ วิธี modified Hodge และวิธี combined disc	15
รูปที่ 3.2	การเพิ่มขึ้นของขนาด inhibition zone ของ <i>Enterobacteriaceae</i> 104 ตัวอย่าง จากการทดสอบด้วยวิธี EDTA, phenylboronic acid (PBA) และ oxacillin (OX)-carbapenem combined disc	16
รูปที่ 3.3	ผลการตรวจหายีน <i>bla</i> _{IMP} และ <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{KPC} และ <i>bla</i> _{OXA-48} โดยวิธี multiplex PCR จากเชื้อวงศ์ <i>Enterobacteriaceae</i>	18
รูปที่ 3.4	ผลการตรวจหา integron ของเชื้อที่มียีน <i>bla</i> _{IMP-14a} (Kp-22 และ Kp-34) โดยใช้ไพรเมอร์ 5' CS คู่กับ 3' CS, 5'CS คู่กับ IMP-R และ IMP-F คู่กับ 3'CS	19
รูปที่ 3.5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>bla</i> _{IMP-14a} และ integron จาก <i>K. pneumoniae</i> isolates Kp-22 และ Kp-34 เปรียบเทียบกับของยีน <i>bla</i> _{IMP-14} ซึ่งรายงานโดย Tribuddharat และคณะ (2004) (GenBank accession no. AY553332)	20
รูปที่ 3.6	ยีน <i>bla</i> _{IMP-14a} และ integron จาก <i>K. pneumoniae</i> isolates Kp-22 และ Kp-34 เปรียบเทียบกับยีน <i>bla</i> _{IMP-14} และ integron ของ <i>P. aeruginosa</i> จากโรงพยาบาลศิริราช และ <i>P. aeruginosa</i> จากประเทศไทยไปประเทศนอร์เวย์ และยีน <i>bla</i> _{IMP-14-a} และ integron ของ <i>P. aeruginosa</i> จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์	22
รูปที่ 3.7	ผลการตรวจหายีนบริเวณรอบข้างของเชื้อที่มียีน <i>bla</i> _{NDM-1} จำนวน 6 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ IS125D-F คู่กับ NDM-R (a), NDM-F คู่กับ Ble-R (b) และ NDM-F คู่กับ TrpF-R	23
รูปที่ 3.8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>bla</i> _{NDM-1} จาก <i>E. coli</i> isolates Ec-148 เปรียบเทียบกับของยีน <i>bla</i> _{NDM-1} ซึ่งรายงานโดย Sole และคณะ (2011)	24
รูปที่ 3.9	DNA fingerprint ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL จำนวน 8 ตัวอย่างโดยเทคนิค ERIC-PCR	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	base pair
°C	Celsius degree
cAmpC	chromosomal AmpC β -lactamases
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESBLs	extended-spectrum β -lactamases
MIC	minimum inhibitory concentration
μ g	microgram
μ M	micromolar
ml	millilitre
mM	millimolar
OX	oxacillin
pAmpC	plasmid-mediated AmpC β -lactamases
PCR	polymerase chain reaction
PBA	phenylboronic acid
U	unit