206555

รหัสโครงการ: MRG4580046

ชื่อโครงการ: การตรวจหาเอนไซม์เบตาแลกตาเมสที่สลายยากลุ่ม carbapenems ในแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์

ชื่อนักวิจัย: อรุณวดี ชนะวงศ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: aroonwad@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: พ.ศ. 2545-2546 (2 ปี)

ปัจจุบันการดื้อยากลุ่ม carbapenems เช่น ยา imipenem และ meropenem ในแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* เป็นปัญหาในประเทศต่างๆทั่วโลก เนื่องจากทำให้แพทย์มีทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยน้อยลงหรือไม่มียารักษา กลไกหนึ่งในการดื้อยากลุ่มนี้คือเชื้อผลิตเอนไซม์ β-lactamases ที่สลายยากลุ่ม carbapenems ได้ (carbapenemases) เอนไซม์นี้จำแนกตามอณูชีวโมเลกุลเป็น class A, B (metallo-β-lactamases หรือ MBLs) และ D (oxacillinases หรือ OXA) ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์พบเชื้อดื้อยากลุ่มนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเช่นกัน ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงสำรวจเอนไซม์ carbapenemases ในเชื้อที่ดื้อต่อยา imipenem ที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายกันจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี ค.ศ. 2001-2003 เป็น *A. baumannii* 91 ตัวอย่าง *Acinetobacter* genomospecies 11 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *P. aeruginosa* 35 ตัวอย่าง จากการตรวจหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยา imipenem และ meropenem ของแบคทีเรียเหล่านี้พบว่าเชื้อไวปานกลางหรือดื้อต่อยาสองชนิดนี้ ผลการตรวจกรองเอนไซม์ carbapenemases โดยวิธี cloverleaf พบว่า *Acinetobacter* ทุกตัวอย่างและ *P. aeruginosa* จำนวน 2 ตัวอย่างผลิตเอนไซม์ carbapenemases ได้ จากการเปรียบเทียบค่า MIC ของยา imipenem ที่เติมและไม่เติม clavulanic acid แสดงว่าเชื้อทั้ง 127 ตัวอย่างไม่ได้ผลิตเอนไซม์ class A carbapenemases ผลการตรวจหาเอนไซม์ MBLs โดยใช้ EDTA เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ พบว่ามี *P. aeruginosa* (isolate P11) เพียงตัวอย่างเดียวที่ผลิตเอนไซม์ MBLs ได้ เมื่อตรวจหายีนของเอนไซม์ MBLs ได้แก่ bla_{IMP}, bla_{VIM} และ bla_{SPM} และยีนของเอนไซม์ OXA ได้แก่ กลุ่ม bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-51} โดยวิธี PCR และยืนยันโดยตรวจหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน พบว่าใน *P. aeruginosa* มีเฉพาะ isolate P11 ที่มียีน bla_{VIM-2} ซึ่งอยู่ใน class 1 integron และพบยีน $bla_{OXA-68-like}$ ในเชื้อ 5 ตัวอย่าง ส่วน *A. baumannii* มียีน $bla_{OXA-51-like}$ ทั้งหมด ยีน bla_{OXA-23} จำนวน 74 ตัวอย่าง และพบยีนชนิดใหม่ของกลุ่ม bla_{OXA-24} ซึ่งตั้งชื่อว่า bla_{OXA-72} จำนวน 12 ตัวอย่าง ในขณะที่ *Acinetobacter* genomospecies 11 มียีน bla_{OXA-72} เช่นกัน นอกจากนี้ไม่พบยีนของเอนไซม์ MBLs ใน *Acinetobacter* spp. เลย ผลการสกัดพลาสมิดและตรวจหายีนดื้อยาโดยวิธี Southern blot และ hybridization พบว่ายีน bla_{VIM-2} อยู่บนโครโมโซม ในขณะที่ยีน bla_{OXA-23} และ bla_{OXA-72} อยู่บนพลาสมิดหรือโครโมโซม การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี REP-PCR พบว่ามีทั้งสายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์ แสดงว่าอาจจะมีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยานี้ภายในโรงพยาบาล (clonal spread) รวมทั้งการแลกเปลี่ยนยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียเหล่านี้ รายงานนี้เป็นการพบเอนไซม์ VIM-2, OXA-23, OXA-72 และ OXA-68-like ครั้งแรกในประเทศไทย จากการศึกษานี้แสดงว่าการผลิตเอนไซม์ carbapenemases น่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems และยีนดื้อยาเหล่านี้อาจจะถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นๆได้โดยเฉพาะวงศ์ *Enterobacteriaceae* จึงควรมีมาตรการเพื่อควบคุมและเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาเหล่านี้ตลอดจนการใช้ยาเท่าที่จำเป็นเพื่อชะลอการดื้อยาของเชื้อ

Abstract

206555

Project Code: MRG4580046

Project Title: Detection of carbapenem-hydrolysing β-lactamases in Gram-negative bacilli isolated from patients in Srinagarind Hospital

Investigator: Aroonwadee Chanawong, Khon Kaen University

E-mail Address: aroonwad@kku.ac.th

Project Period: 2002-2003 (2 years)

Resistance to carbapenems such as imipenem and meropenem has emerged worldwide in Gram-negative bacteria particularly in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, leading to limitation of antimicrobial therapy. One of resistance mechanisms among these bacteria is production of carbapenem-hydrolysing β-lactamases or carbapenemases. These enzymes are divided to class A, B (metallo-β-lactamases or MBLs) and D (oxacillinases or OXA) based on molecular classification. Imipenem-resistant bacteria have also been detected increasingly in Srinagarind Hospital. The aim of the present study was to detect and characterize carbapenemases produced by imipenem-resistant isolates (91 *A. baumannii*, 1 *Acinetobacter* genomospecies 11 and 35 *P. aeruginosa*) collected from patients in Srinagarind Hospital, Khon Kaen University, between 2001 and 2003. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of imipenem and meropenem for all isolates revealed that they were resistant or intermediately susceptible to these agents. By a cloverleaf test, all *Acinetobacter* isolates and 2 isolates of *P. aeruginosa* produced carbapenemases. Comparison of the MIC of imipenem alone to that containing clavulanic acid for all isolates indicated that they did not produce class A carbapenemases. Using EDTA as an MBL inhibitor, only one isolate of *P. aeruginosa* (isolate P11) produced MBLs. Detection of MBL (bla_{IMP}, bla_{VIM} และ bla_{SPM}) and OXA genes (bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24} และ bla_{OXA-51} groups) by PCR techniques and nucleotide sequencing in the *P. aeruginosa* isolates revealed that only isolate P11 harbored bla_{VIM-2} associated with an integron, whereas 5 isolates carried $bla_{OXA-68-like}$. Among the *A. baumannii* isolates, all carried $bla_{OXA-51-like}$, 74 harbored bla_{OXA-23} and 12 contained a novel variant of bla_{OXA-24}, designated as bla_{OXA-72}. In addition, *Acinetobacter* genomospecies 11 harbored bla_{OXA-72}. Plasmid analysis followed by Southern blotting and hybridization showed that the bla_{VIM-2} was found on chromosome, whereas the bla_{OXA-23} and bla_{OXA-72} were either plasmid-mediated or chromosomally-located. Analysis of REP-PCR fingerprints of all *P. aeruginosa* or *A. baumannii* isolates revealed that they were of either indistinguishable or different strains, suggesting both clonal spread of the resistant strains within the hospital and the dissemination of these resistant determinants among these bacteria. This is the first report of VIM-2, OXA-23, OXA-72 and OXA-68-like in clinical isolates from Thailand. These findings indicate that carbapenemase production is one of resistance mechanisms to carbapenems among these bacteria. In addition, there may be a high potential for a spread of these resistant genes to other bacteria particularly family *Enterobacteriaceae*, suggesting the need for more detailed surveillance and the restricted clinical use of carbapenems to prevent the proliferation of carbapenem-resistant isolates in this hospital.