

ชนิดของ SHV β -lactamases ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ในปี พ.ศ. 2541-2542 และ พ.ศ. 2546

อรุณวดี ชนะวงศ์^{1*} อรุณลักษณ์ ลูติดานนท์¹ วัลลภ แก้วเกษ² อัทธนท์ สุกคำเมส³ อุไรวัลย์ บุรณะ³
วิระพงศ์ ลูติดานนท์² ปรีชา หอมจำปา¹

บทคัดย่อ

การดื้อต่อยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ของแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) เป็นปัญหาที่พบมากขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ตรวจพบเอนไซม์ ESBLs ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 และชนิดที่พบมากที่สุดคือเอนไซม์ SHV-12 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามชนิดของเอนไซม์ SHV ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยศึกษาในเชื้อจำนวน 100 ตัวอย่าง (isolates) ซึ่งแยกได้ในปี พ.ศ. 2541 และ 2542 จำนวน 48 ตัวอย่าง และ พ.ศ. 2546 จำนวน 52 ตัวอย่าง นำมาตรวจหา ยีน bla_{SHV} โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นแยกชนิดของยีนโดยตรวจหาการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 35 และ 238 โดยวิธี PCR-restriction fragment length polymorphism และตำแหน่งที่ 240 โดยวิธี restriction site insertion-PCR จากนั้นยืนยันชนิดของยีนโดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2541 และ 2542 มียีน bla_{SHV-12} ร้อยละ 58.3 และ bla_{SHV} ที่ยังระบุชนิดไม่ได้ร้อยละ 20.8 ส่วนเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2546 มียีน bla_{SHV-12} ร้อยละ 25.0, bla_{SHV-5} ร้อยละ 3.8, bla_{SHV-1} ร้อยละ 1.9 และ bla_{SHV} ที่ยังระบุชนิดไม่ได้ร้อยละ 5.8 สำหรับ bla_{SHV} ที่ยังระบุชนิดไม่ได้ น่าจะเกิดจากมียีน 2 ชนิดในตัวอย่างเดียวกัน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตระกูล SHV ที่พบบ่อยคือเอนไซม์ SHV-12 เช่นเดิมแต่อัตราการพบเอนไซม์ตระกูลนี้ลดลง

คำสำคัญ: เอนไซม์บีตาแลคตาเมสชนิดลูทธิซายา, แบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งวงศ์ *Enterobacteriaceae*

บทนำ

ยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 เช่น cefotaxime, ceftriaxone และ ceftazidime เป็นยากลุ่ม β -lactams ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งโดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการดื้อต่อยากลุ่มนี้ในแบคทีเรียโดย

เฉพาะวงศ์ *Enterobacteriaceae* มากขึ้น กลไกการดื้อยาที่สำคัญคือเชื้อผลิตเอนไซม์ที่สลายยากลุ่ม cephalosporins ทั้งที่เป็น narrow-spectrum (รุ่นที่ 1 และ 2) และ extended-spectrum (รุ่นที่ 3 และ 4) รวมทั้ง monobactams ได้ ซึ่งเรียกเอนไซม์นี้ว่า extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)⁽¹⁾ เอนไซม์ ESBLs

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

² ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบาดใหม่ คณะแพทยศาสตร์

³ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

บทความนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการครั้งที่ 20 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2547 วันที่ 12 - 15 ตุลาคม 2547

Identification of SHV β -lactamases in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from Srinagarind Hospital collected between 1998 and 1999 and in 2003

Aroonwadee Chanawong^{1*}, Aroonlug Lulitanond¹, Wanlop Kaewkes², Attanat Sookkhammay³,
Uraiwan Burana³, Viraphong Lulitanond², Preecha Homchampa¹

Abstract

Drug inactivation by extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) is the most important mechanism of resistance to the third generation cephalosporins in members of family *Enterobacteriaceae*. ESBL-producing bacteria have also been found in Srinagarind Hospital, Khon Kaen University, since 1994 and SHV-12 β -lactamase was the most common ESBL. The aim of this study was to detect and identify *bla*_{SHV} genes in 100 clinical isolates of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Srinagarind Hospital collected between 1998 and 1999 (48 isolates) and in 2003 (52 isolates). All isolates were screened for the presence of *bla*_{SHV} genes by polymerase chain reaction (PCR) technique. The *bla*_{SHV} genes were distinguished by detecting mutations at amino acid positions 35 and 238 by PCR-restriction fragment length polymorphism and position 240 by restriction site insertion-PCR techniques, and then confirmed by nucleotide sequence determination. Among the 48 clinical isolates collected between 1998 and 1999, 58.3% contained *bla*_{SHV-12} and 20.8% harbored unidentified *bla*_{SHV}. In the 52 clinical isolates collected in 2003, 37% harbored *bla*_{SHV}, which were *bla*_{SHV-12} (25.0%), *bla*_{SHV-5} (3.8%), *bla*_{SHV-1} (1.9%) and unidentified *bla*_{SHV} (5.8%). The *bla*_{SHV} genes that could not be identified by both techniques may be due to the presence of two different *bla*_{SHV} genes in single isolates. These findings indicate that SHV-12 is still a major type of SHV ESBLs in this hospital; however, its prevalence has decreased.

Key words: ESBLs, SHV β -lactamases, *Enterobacteriaceae*

ถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid⁽²⁾ และยีนของเอนไซม์นี้ มักพบอยู่บนพลาสมิดจึงมีโอกาสที่แบคทีเรียจะถ่ายทอด ยีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้⁽³⁾ ทำให้เกิดการแพร่ ระบาดของยีนดื้อยาเหล่านี้ในแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งในการรักษาผู้ป่วย⁽¹⁾ ห้องปฏิบัติกา

จำเป็นต้องตรวจหาเอนไซม์ ESBLs ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับแพทย์ใน การเลือกใช้ยารักษาผู้ป่วย รวมทั้งเป็นการเฝ้าระวังการ แพร่กระจายของเชื้อหรือยีนดื้อยาในโรงพยาบาลด้วย เอนไซม์ ESBLs ที่พบบ่อยในแบคทีเรียวงศ์

¹Center for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences,

²Research and Diagnostic Center of Emerging Infectious Diseases, Faculty of Medicine,

³Fourth year student, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

*Corresponding author (e-mail: aroonwad@kku.ac.th)

Enterobacteriaceae ได้แก่ ตระกูล TEM และ SHV ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของเอนไซม์ β -lactamase ชนิด TEM-1, TEM-2 และ SHV-1 ซึ่งเป็น narrow-spectrum β -lactamase หรือ non-ESBL การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียงหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตำแหน่งของเอนไซม์เหล่านี้ทำให้ได้เอนไซม์ชนิดใหม่ที่สลายยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ได้ นอกจากเอนไซม์ทั้งสองตระกูลนี้แล้วปัจจุบันมีรายงานการพบเอนไซม์ ESBLs ตระกูล CTX-M มากขึ้นจากประเทศต่างๆทั่วโลก⁽¹⁻³⁾ วิธีแยกชนิดของเอนไซม์ ESBLs มีอยู่หลายวิธี ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ เช่น การตรวจหาฮัยนของเอนไซม์ ESBLs โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นแยกชนิดของฮัยนโดยตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงหรือตรวจหาการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ โดยเทคนิคต่างๆ เช่น PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP)⁽⁴⁾, ligase chain reaction (LCR)⁽⁵⁻⁶⁾ PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)⁽⁷⁻⁸⁾ และ restriction site insertion-PCR (RSI-PCR)⁽⁹⁾ เป็นต้น

อรุณลักษณ์ ลูตตานนท์ และวัลลภ แก้วเกษ⁽¹⁰⁾ ได้สำรวจ ESBLs ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ในปี พ.ศ. 2538 พบเชื้อที่ผลิต ESBLs ร้อยละ 26 เมื่อแยกชนิดของ ESBLs ในแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ SHV-12 (ร้อยละ 60.5) และ SHV-5 (ร้อยละ 30.2)⁽¹¹⁾ ในขณะที่เดียวกันมีรายงาน ESBLs ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศิริราชในปี พ.ศ. 2542 ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ VEB-1 (ร้อยละ 60)⁽¹²⁾ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกชนิดของเอนไซม์ SHV ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ในปี พ.ศ. 2541-2542 และ 2546 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของฮัยนดื้อยาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ และเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิทยาการระบาดของแบคทีเรียดื้อยาต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา ได้แก่ แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2541 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2542 จำนวน 48 ตัวอย่าง และระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 จำนวน 52 ตัวอย่าง แบคทีเรียเหล่านี้แยกได้จากระบบทางเดินหายใจร้อยละ 39 ระบบทางเดินปัสสาวะร้อยละ 37 ท้องร้อยละ 16 สารน้ำต่างๆ ร้อยละ 4 และเลือดร้อยละ 4⁽¹³⁾ แบคทีเรียอ้างอิงในการแยกชนิดของฮัยน bla_{SHV} ได้แก่ *E. coli* C600 (R1010) ที่มีฮัยน $bla_{SHV-1}^{(14)}$, *E. coli* HB101 (pAFF611) ที่มีฮัยน $bla_{SHV-5}^{(14)}$ และ *K. pneumoniae* isolate 18 ที่มีฮัยน $bla_{SHV-12}^{(11)}$

น้ำยาและเครื่องมือสำหรับ PCR ประกอบด้วยไพรเมอร์ (Invitrogen Life Technologies, Brazil และ QIAGEN, Hilden, Germany), dNTPs (Boehringer Mannheim, Germany), $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies) และ Taq DNA polymerase พร้อมทั้ง 10x PCR buffer (Invitrogen Life Technologies) ปฏิบัติ PCR ทดสอบโดยเครื่อง Deltier thermal cycler PTC-200 (Roche, California, USA)

การเตรียม DNA เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบน Mueller Hinton agar (Merck, Darmstadt, Germany) และอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อเช็ดเชื้อจำนวน 1 โคโลนีลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้ออกกระจายตัวไม่จับกันเป็นก้อนและต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที ใช้เป็น DNA ต้นแบบ

การตรวจหาฮัยน bla_{SHV} โดยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์ S6 (5'-CTTTACTCGCCTTTATCG-3') คู่กับ S8 (5'-AGTCATATCGCCCGGCAC-3')⁽⁹⁾ ซึ่งให้ PCR product ขนาด 971 bp และ/หรือไพรเมอร์ S4 (5'-TCAGCGAAAAACACCTTGC-3') คู่กับ S5 (5'-TCCCGCAGATAAATCACCA-3')⁽⁴⁾ ซึ่งให้ PCR product ขนาด 475 bp

การจำแนกชนิดของยีน *bla_{SHV}* โดยวิธี PCR-RFLP และ RSI-PCR การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *bla_{SHV}* ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 35 และ 238 โดยวิธี PCR-RFLP⁽⁸⁾ ใช้ PCR product ขนาด 971 bp ตัดด้วยเอนไซม์ *DdeI* และ *NheI* ตามลำดับโดยทดสอบตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Promega, Madison, USA) ส่วนการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 240 โดยวิธี RSI-PCR⁽⁹⁾ ใช้ไพรเมอร์ F240 (5'-CCGATAAGACCGGAGTTCGC-3') คู่กับ S8 ซึ่งให้ PCR product ขนาด 244 bp ตัดด้วย

เอนไซม์ *NruI* จากนั้นแยกชิ้นส่วน DNA ในแผ่นวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (agarose, Promega, Madison, USA) ด้วยเครื่อง gel electrophoresis (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker (Promega) และทดสอบกับแบคทีเรียอ้างอิงควบคุมไปด้วยจากนั้นย้อมแผ่นวุ้นด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบของ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตโดยเครื่อง UV illuminator Gel DOC 1000 (Bio-Rad, CA, USA) และบันทึกภาพไว้ อ่านผลและแปลผลตาม ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแยกชนิดของยีน *bla_{SHV}* โดยวิธี PCR-RFLP⁽⁸⁾ และ RSI-PCR⁽⁹⁾

ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆของยีน <i>bla_{SHV}</i> โดยวิธี PCR-RFLP และ RSI-PCR			การแปลผล
35 (<i>DdeI</i>) ^a	238 (<i>NheI</i>) ^b	240 (<i>NruI</i>) ^c	
-	-	-	<i>bla_{SHV}-1</i>
-	+	-	<i>bla_{SHV}-2</i> , <i>bla_{SHV}-3</i>
+	+	-	<i>bla_{SHV}-2a</i>
-	+	+	<i>bla_{SHV}-4</i> , <i>bla_{SHV}-5</i>
+	-	-	<i>bla_{SHV}-11</i>
+	+	+	<i>bla_{SHV}-12</i>

^a(+) ให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 627 bp และ 344 bp และ (-) ให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 492 bp, 344 bp และ 135 bp

^b(+) ให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 744 bp และ 227 bp และ (-) ให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 971 bp

^c(+) ให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 244 bp และ (-) ให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 225 bp และ 19 bp

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla_{SHV}* เตรียม PCR product ของยีน *bla_{SHV}* ขนาด 971 bp โดยเลือกเชื้อที่ให้รูปแบบ PCR-RFLP และ RSI-PCR ของยีนที่แตกต่างกัน จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดนํ้ายาลำเร็จรูป (QIAGEN) และ

ส่งไปที่หน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ซึ่งตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง ABI PRISM (model 3100 version 3.7, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)

ผลการศึกษา

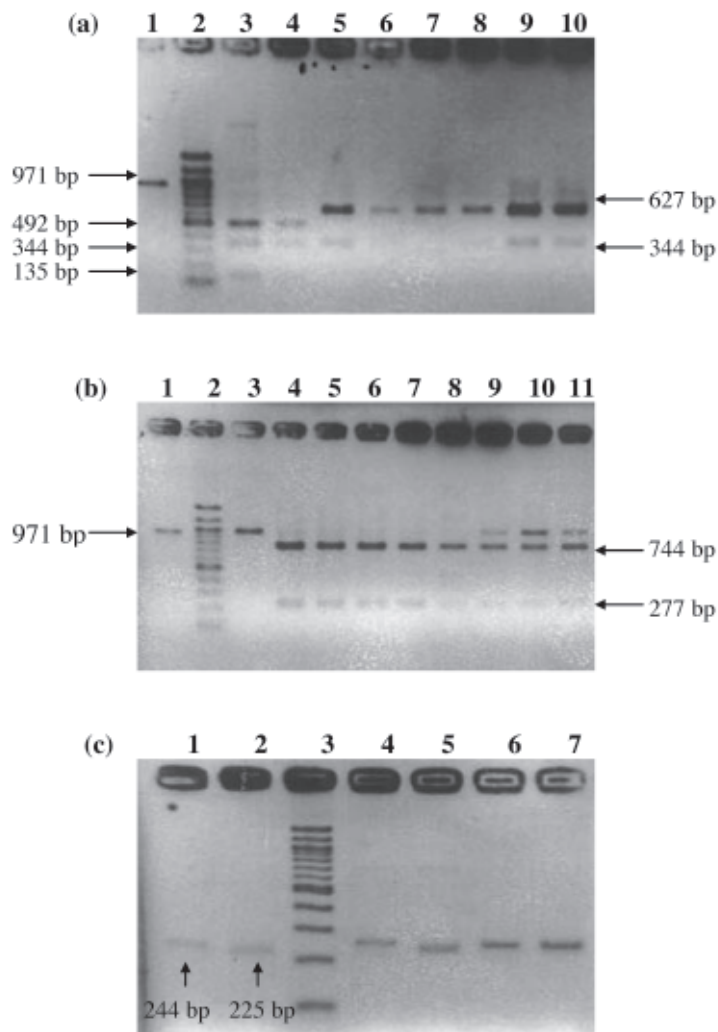
ผลการตรวจหายีน *bla*_{SHV} โดยวิธี PCR พบว่า เชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2541-2542 ให้ผลบวกจำนวน 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 79.2) และในปี พ.ศ. 2546 ให้ผลบวกจำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.5) โดยส่วนใหญ่พบยีนนี้ในจีโนม *Klebsiella* โดยเฉพาะ *K. pneumoniae* เมื่อจำแนกชนิดของยีนโดยวิธี PCR-RFLP และ RSI-PCR (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 1) พบว่ายีน *bla*_{SHV} จากเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2541-2542 ให้รูปแบบ PCR-RFLP และ RSI-PCR เป็น *bla*_{SHV-12-like} จำนวน 28 ตัวอย่าง (ร้อยละ 58.3) และยังมีชนิดไม่ได้จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20.8) ส่วนยีน *bla*_{SHV} จากเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2546 ให้รูปแบบ PCR-RFLP และ RSI-PCR เป็น *bla*_{SHV-12-like} จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.0) *bla*_{SHV-5-like} จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.8) *bla*_{SHV-1-like} จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.9) และยังมีชนิดไม่ได้จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.8)

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *bla*_{SHV} จากเชื้อที่คัดเลือกจำนวน 4 ตัวอย่างซึ่งให้รูปแบบของ PCR-RFLP และ RSI-PCR แตกต่างกัน ได้แก่ *bla*_{SHV-12-like} 2 ตัวอย่าง *bla*_{SHV-5-like} และ *bla*_{SHV-1-like} ชนิดละ 1 ตัวอย่าง พบว่ายีน *bla*_{SHV-12-like} จากทั้งสองตัวอย่างเป็นยีน *bla*_{SHV-12} แต่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 1 ตำแหน่งคือที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 240 เป็น AAA และ AAG ซึ่งเป็น codon ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันคือ lysine ส่วนยีน *bla*_{SHV-5-like} พบว่าเป็นยีน *bla*_{SHV-5} สำหรับยีน *bla*_{SHV-1-like} พบว่าเป็นยีน *bla*_{SHV-1} ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ *bla*_{SHV-1} จากการศึกษาของ Nüesch-Inderbilen และคณะ¹⁵ (GenBank accession no. X98100) พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3 ตำแหน่งคือที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 215 (CGG เป็น CGA), 240 (GAG เป็น GAA) และ 267 (ACG เป็น ACC) อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งสามตำแหน่งนี้ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน

ตารางที่ 2 ชนิดของยีน *bla*_{SHV} ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ในปี พ.ศ. 2541-2542 และ พ.ศ. 2546

ปีที่แยกเชื้อได้	แบคทีเรีย (n)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบยีน <i>bla</i> _{SHV} ชนิดต่างๆ				รวม
		<i>bla</i> _{SHV-12-like}	<i>bla</i> _{SHV-5-like}	<i>bla</i> _{SHV-1-like}	<i>bla</i> _{SHV} *	
พ.ศ.2541-2542	<i>K. pneumoniae</i> (27)	21	0	0	4	25
	<i>Klebsiella</i> spp. (11)	5	0	0	6	11
	<i>Enterobacter</i> spp. (4)	2	0	0	0	2
	<i>E. coli</i> (3)	0	0	0	0	0
	<i>Serratia</i> spp. (3)	0	0	0	0	0
	รวม (48)	28	0	0	10	38
พ.ศ.2546	<i>K. pneumoniae</i> (23)	12	2	1	2	17
	<i>E. coli</i> (19)	1	0	0	0	1
	<i>Enterobacter</i> spp. (5)	0	0	0	0	0
	<i>P. mirabilis</i> (2)	0	0	0	0	0
	<i>Providencia</i> (1)	0	0	0	0	0
	<i>K. oxytoca</i> (1)	0	0	0	0	0
	<i>Klebsiella</i> spp. (1)	0	0	0	1	1
	รวม (52)	13	2	1	3	19

* ไม่สามารถระบุชนิดของยีนได้



รูปที่ 1 การแยกชนิดยีน bla_{SHV} โดยตรวจหาการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 35 โดยวิธี PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ *DdeI* (a) ตำแหน่ง 238 โดยวิธี RSI-PCR ด้วยเอนไซม์ *NheI* (b) และตำแหน่ง 240 โดยวิธี RSI-PCR ด้วยเอนไซม์ *NruI* (c)

(a) lane 1, ยีน bla_{SHV} ก่อนตัดด้วยเอนไซม์; 2, 100 bp DNA ladder; 3-5, ยีน bla_{SHV-1} , bla_{SHV-5} และ bla_{SHV-12} ของ *E. coli* C600 (R1010), *E. coli* HB101 (pAFF611) และ *K. pneumoniae* isolate 18 หลังตัดด้วยเอนไซม์ตามลำดับ; 6-10, ยีน $bla_{SHV-12-like}$ หลังตัดด้วยเอนไซม์จาก *K. pneumoniae* 4 ตัวอย่าง และ *Klebsiella* spp. 1 ตัวอย่างตามลำดับ

(b) lane 1, ยีน bla_{SHV} ก่อนตัดด้วยเอนไซม์; 2, 100 bp DNA ladder; 3-5, ยีน bla_{SHV-1} , bla_{SHV-5} และ bla_{SHV-12} ของ *E. coli* C600 (R1010), *E. coli* HB101 (pAFF611) และ *K. pneumoniae* isolate 18 หลังตัดด้วยเอนไซม์ตามลำดับ; 6-11, ยีน $bla_{SHV-12-like}$ หลังตัดด้วยเอนไซม์จาก *Klebsiella* spp. 3 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 3 ตัวอย่างตามลำดับ

(c) lane 1-2, ยีน $bla_{SHV-1-like}$ ของ *K. pneumoniae* ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์; 3, 100 bp DNA ladder; 4-5, ยีน bla_{SHV-1} ของ *E. coli* C600 (R1010) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์; 6-7, ยีน bla_{SHV-5} ของ *E. coli* HB101 (pAFF611) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ปัจจุบันมีรายงานเอนไซม์ ESBLs ที่กลายพันธุ์มาจาก SHV-1 มากกว่า 50 ชนิดจากประเทศต่างๆทั้งในยุโรป อเมริกา แอฟริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์ SHV เพียงบางชนิดเท่านั้นที่พบได้บ่อย ได้แก่ SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-4, SHV-5 และ SHV-12^(1,3) ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกชนิดของยีน *bla*_{SHV} โดยวิธี PCR-RFLP และ RSI-PCR เนื่องจากมีเชื้อที่ตรวจพบยีน *bla*_{SHV} ทั้งหมด 57 ตัวอย่างซึ่งไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากทุกตัวอย่างได้และได้เลือกตรวจการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของเอนไซม์ SHV เพียง 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 35 (*DdeI*), 238 (*NheI*) และ 240 (*NruI*) เนื่องจากสามารถแยกชนิดของเอนไซม์ SHV ที่พบบ่อยได้ (ตารางที่ 1) จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่ให้อารมณ์ของ PCR-RFLP และ RSI-PCR ของยีน *bla*_{SHV} ที่แตกต่างกันไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ SHV-12 เป็น ESBLs ในตระกูล SHV ที่พบได้บ่อยเช่นเดียวกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2537-2539⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ยังตรวจพบเอนไซม์ SHV-5 เช่นกัน จากการศึกษาพบว่าวิธี PCR-RFLP และ RSI-PCR สามารถแยกชนิดของยีน *bla*_{SHV} ในกรณีที่มีจำนวนตัวอย่างมาก อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้สามารถตรวจได้เฉพาะการกลายพันธุ์ที่มีรายงานแล้วเท่านั้นและเนื่องจากไม่สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากเชื้อทุกตัวอย่างได้ ดังนั้นอาจมีเอนไซม์ SHV ชนิดอื่นหรือชนิดใหม่ในกลุ่มตัวอย่างนี้ สำหรับยีน *bla*_{SHV} ที่ยังระบุชนิดไม่ได้นั้นพบว่าผลการทดสอบ PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *NheI* พบทั้งชิ้นส่วน DNA ขนาด 971, 744 และ 227 bp (รูปที่ 1b, lane 9-11) ในเชื้อตัวอย่างเดียวกัน และผลการทดสอบ RSI-PCR ไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเกิดจากมียีน *bla*_{SHV} มากกว่า 1 ชนิดในเชื้อตัวอย่างเดียวกัน ดังนั้นในเชื้อเหล่านี้ควรทำ conjugation และแยกชนิดของยีน *bla*_{SHV} จาก transconjugant เปรียบเทียบกับเชื้อตัวให้ (donor) ต่อไป

แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะผลิตเอนไซม์ SHV แล้วยังผลิตเอนไซม์ตระกูล CTX-M และ VEB ด้วย⁽¹³⁾ เมื่อเปรียบเทียบชนิดของ ESBLs ในปี พ.ศ. 2541-2542 กับปี พ.ศ. 2537-2539¹¹ พบเอนไซม์ SHV-12 มากที่สุดเช่นกัน ส่วนในปี พ.ศ. 2546 พบเอนไซม์ตระกูล CTX-M มากที่สุด¹³ ในขณะที่เอนไซม์ตระกูล SHV พบน้อยลง ทั้งนี้อาจเกิดจากยีนของเอนไซม์ CTX-M เหล่านี้มี mobile genetic element คือ *ISEcp1* ช่วยในการแพร่กระจายของยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียอื่นๆ^(13,16,17) ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาแบคทีเรียดื้อยามากขึ้น การติดตามการเปลี่ยนแปลงของยีนดื้อยาน่าจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อดื้อยารวมทั้งการศึกษาวิทยาการระบาดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2547 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ คณะเทคนิคการแพทย์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Centre for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratories) มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นอย่างยิ่งที่ให้การสนับสนุน และอำนวยความสะดวกตลอดการวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ และขอขอบคุณ Professor G Jacoby ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ SHV-1 และ SHV-5 ที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.

2. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
3. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697-704.
4. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutation conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 797-802.
5. Kim J, Lee HJ. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1860-4.
6. Niederhauser C, Kaempf L, Heinzer I. Use of the ligase detection reaction-polymerase chain reaction to identify point mutations in extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 477-80.
7. Arlet G, Bami G, Decre D, Flippo A, Gaillet O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134: 203-8.
8. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterisation of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184: 85-9.
9. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Discrimination of SHV β -lactamase genes by restriction site insertion-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2110-4.
10. Lulitanond A, Kaewkes W. Prevalance of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) production in Gram-negative bacilli isolated from Srinagarind Hospital, Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 1999; 16: 115-9.
11. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 839-52.
12. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fannewald M, *et al.* Molecular epidemiology of the intergron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 175-82.
13. Chanawong A, Lulitanond A, Kaewkes W, Lulitanond V, Srigulbutr S, Homchampa P. CTX-M extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a Thai university hospital. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 493-500.
14. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1991; 33: 164-9.
15. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hühler H. Survey and molecular genetics of β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 943-9.
16. Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2938-45.
17. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 447-50.