

การประเมินการตรวจหาเอนไซม์ metallo- β -lactamase โดยวิธีฟิโนไทป์ ใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์

สวิตา โสภาศรี^{1,2}, อรุณวดี ชนะวงศ์*, อรุณลักษณ์ ลูลิตานนท์,
พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์², โชติชนะ วิไลลักษณ์²

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีรายงาน *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems โดยผลิตเอนไซม์ class B carbapenemase หรือ metallo- β -lactamase (MBL) เพิ่มขึ้นจากทั่วโลก อย่างไรก็ตาม Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ยังไม่ได้กำหนดวิธีมาตรฐานในการตรวจกรองและตรวจยืนยันเอนไซม์ MBL ในแบคทีเรีย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธีฟิโนไทป์ใน *P. aeruginosa* ที่ดื้อหรือไวปานกลางต่อยา imipenem ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยทดสอบในแบคทีเรียจำนวน 79 ตัวอย่าง ได้แก่ แบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ MBL ชนิด IMP-1, IMP-4, IMP-9, VIM-1 และ VIM-2 ชนิดละ 1 ตัวอย่าง และ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 74 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธี combined-disk test (CDT) ร่วมกับวิธี double-disk synergy test (DDST) โดยใช้แผ่นยา imipenem (IPM 10 ไมโครกรัม) และ meropenem (MEM 10 ไมโครกรัม) กับ EDTA 292 ไมโครกรัม การทดสอบทั้งหมดทำบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน การศึกษานี้ใช้การตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธี multiplex-PCR เป็นวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า *P. aeruginosa* 74 ตัวอย่างพบเอนไซม์ MBL 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.2) เป็นชนิด *bla*_{VIM} 6 ตัวอย่างและ *bla*_{IMP} 3 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธีฟิโนไทป์กับวิธี multiplex PCR พบว่าวิธี CDT โดยใช้ IPM+EDTA/IPM ให้ผลบวกกับเชื้อทั้ง 14 ตัวอย่างที่มีเอนไซม์ MBL (ความไวร้อยละ 100) แต่มีผลบวกปลอม 3 ตัวอย่าง (ความจำเพาะร้อยละ 95.4) ในขณะที่การใช้ MEM+EDTA/MEM มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 92.9 และ 92.3 ตามลำดับ ส่วนวิธี DDST โดยใช้ยา IPM หรือ MEM ให้ผลตรงกันทุกตัวอย่างโดยมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 92.9 และ 96.9 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีฟิโนไทป์เหล่านี้เป็นวิธีที่ง่ายและให้ผลดีสำหรับการตรวจหาเอนไซม์ MBL ใน *P. aeruginosa* ที่ดื้อหรือไวปานกลางต่อยา IPM จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ การทดสอบเอนไซม์ MBL ได้ในระยะแรกและการควบคุมการติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาเหล่านี้อย่างเข้มงวดจะช่วยป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อที่มีเอนไซม์ดื้อยาเหล่านี้ได้

คำห้ส: การดื้อยากลุ่ม carbapenems, เอนไซม์ metallo- β -lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*

¹บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

นำเสนอในการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 32 สมาคมเทคนิคการแพทย์ เรื่อง เทคนิคการแพทย์กับการเสริมสร้างสุขภาพ วันที่ 6 - 9 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ซิตี้ จอมเทียน พัทยา จ.ชลบุรี

Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Srinagarind Hospital

Sawita Sopasri^{1,2}, Aroonwadee Chanawong^{2*}, Aroonlug Lulitanond²,
Pipat Sribenjalux², Chotechana Wilailuckana²

Abstract

Carbapenem resistance mediated by acquired carbapenemase genes has been increasingly reported in *Pseudomonas aeruginosa*. Class B carbapenemases or metallo- β -lactamases (MBLs) are the most clinical concern. Currently, there is no recommendation available from the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) for MBL detection. In this study, we attempted to evaluate the performance for phenotypic detection of MBLs in imipenem-nonsusceptible clinical isolates of *P. aeruginosa* from Srinagarind Hospital. Five MBL-positive control strains, each producing IMP-1, IMP-4, IMP-9, VIM-1, or VIM-2 enzyme, and 74 clinical isolates of *P. aeruginosa* were screened for the presence of MBLs by combined-disk test (CDT) and double-disk synergy test (DDST) on a single agar plate using imipenem (10 μ g IPM) and meropenem (10 μ g MEM) disks as substrates and 292 μ g of EDTA as an MBL inhibitor. Multiplex PCR for detection of MBL genes was used as a gold standard. Genotypic confirmation revealed that 9 of the 74 clinical isolates (12.2%) carried MBL genes, *bla*_{VIM} (6 isolates) and *bla*_{IMP} (3 isolates). Comparison of the MBL phenotypic tests to the multiplex PCR revealed that the CDT using IPM+EDTA/IPM correctly differentiated all MBL-producing isolates (sensitivity of 100%) but gave three false-positive isolates (specificity of 95.4%), whereas that with MEM+EDTA/MEM showed sensitivity and specificity of 92.9% and 92.3% respectively. In addition, the DDST using either IPM or MEM with EDTA gave the same result for all isolates with sensitivity and specificity of 92.9% and 96.9% respectively. These methods are simple and accurate for detection of MBLs in imipenem-nonsusceptible *P. aeruginosa* isolates from this hospital. Early detection of MBL producers and strict infection control will contribute to prevent further spread of these resistant strains.

Key words: Carbapenem resistance, Metallo- β -lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*

¹ Graduate School, Khon Kaen University

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

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

บทนำ

ยาในกลุ่ม carbapenems เช่น imipenem และ meropenem เป็นยาในกลุ่ม β -lactams ที่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้กว้างที่สุด จึงเป็นยาในกลุ่มแรกหรือยาทางเลือก (drug of choice) สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจาก *Pseudomonas aeruginosa* หรือ *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multi-drug resistant) ตลอดจนแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* กลไกหนึ่งของการดื้อยาคือเชื้อผลิตเอนไซม์ β -lactamase ที่สลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้โดยตรงเรียกว่าเอนไซม์ carbapenemase โดยเฉพาะอย่างยิ่ง class B carbapenemase หรือ metallo- β -lactamase (MBL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางคลินิกและมีรายงานเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ MBL คือสามารถสลายยาในกลุ่ม β -lactams ได้ทุกชนิดยกเว้นยาในกลุ่ม monobactams เช่น aztreonam เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งได้โดย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid ปัจจุบันมีรายงานพบเอนไซม์ MBL ทั้งหมด 5 ตระกูล ได้แก่ ตระกูล IMP, VIM, SPM, GIM และ SIM โดยตระกูลที่พบบ่อยที่สุดคือ IMP และ VIM ซึ่งมีรายงานจากประเทศต่างๆ โดยเฉพาะแถบเอเชียและยุโรป⁽¹⁾ เนื่องจากยีนที่กำกับเอนไซม์เหล่านี้มักพบอยู่บน integron ซึ่งเป็น mobile genetic element ทำให้มีโอกาสถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียวงศ์เดียวกันหรือต่างวงศ์กันได้ เอนไซม์ MBL จึงพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งหลายชนิดทั้งพวกที่ไม่หมักย่อยน้ำตาล (non-fermentative Gram-negative bacilli หรือ NFB) เช่น *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* และแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* อย่างไรก็ตามแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ MBL ยังพบในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ^(1,2) เนื่องจากปัจจุบันมีการใช้ยาในกลุ่ม carbapenems มากขึ้นทำให้มี

โอกาสพบเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้น จึงจำเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะต้องตรวจหาเอนไซม์ MBL ในแบคทีเรียเหล่านี้เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาหรือยีนดื้อยาต่อไป

ปัจจุบัน Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ยังไม่ได้กำหนดวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจหาเอนไซม์ MBL อย่างไรก็ตามมีคณะผู้วิจัยหลายกลุ่มได้คิดค้นวิธีตรวจหาเอนไซม์ MBL ทางฟิโนไทป์โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ MBL ที่ถูกยับยั้งโดย EDTA และ 2-mercaptopropionic acid ซึ่งทดสอบได้หลายวิธี เช่น วิธี double-disk synergy test (DDST) โดยใช้ 2-mercaptopropionic acid กับแผ่นยา imipenem (IPM) หรือ ceftazidime (CAZ)⁽³⁾ หรือใช้ EDTA 750 ไมโครกรัมกับแผ่นยา IPM หรือ CAZ⁽⁴⁻⁶⁾ วิธี combined disk test (CDT) ใช้ EDTA 750 ไมโครกรัม^(6,7) หรือ 930 ไมโครกรัม⁽⁸⁾ กับแผ่นยา IPM หรือ CAZ และวิธี Etest ใช้ยา IPM ในความเข้มข้นต่างๆ กับ EDTA 320 ไมโครกรัม⁽⁹⁾ จากการศึกษาของ Pitout และคณะ⁽⁸⁾ พบว่าการตรวจหาเอนไซม์ MBL ใน *P. aeruginosa* โดยใช้ EDTA 930 ไมโครกรัมกับยา meropenem (MEM) ให้ความไวสูงถึงร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 97 อย่างไรก็ตามมีรายงานพบ *P. aeruginosa* ที่ไวต่อ EDTA และให้ผลบวกปลอมเมื่อตรวจหาเอนไซม์ MBL ด้วยวิธี Etest และวิธี CDT ซึ่งใช้ยา IPM และ EDTA 750 ไมโครกรัม⁽¹⁰⁾ ได้มีการศึกษาพบว่า EDTA มีผลทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* มี membrane permeability เพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อไวต่อสารต้านจุลชีพต่างๆ มากขึ้น⁽¹¹⁾ นอกจากนี้มีรายงานว่า zinc มีผลทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* มีการแสดงออกของ outer membrane protein (OprD) ซึ่งเป็นทางผ่านของยา imipenem ลดลง ทำให้เชื้อดื้อต่อยา imipenem⁽¹²⁾ ดังนั้น EDTA อาจมีผลยับยั้ง zinc ทำให้มีการแสดงออกของ OprD ของเชื้อ ยาจึงผ่านเข้าสู่เซลล์และออกฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ ซึ่งอาจทำให้ inhibition zone ต่อยากว้างขึ้นหรือเกิดผลบวกปลอมได้ ต่อมา Franklin และคณะ⁽¹³⁾ ได้ตรวจหาเอนไซม์ MBL ทั้งในกลุ่ม NFB และวงศ์ *Enterobacteriaceae* ด้วยวิธี CDT ร่วมกับวิธี DDST โดยใช้แผ่นยา IPM และลด

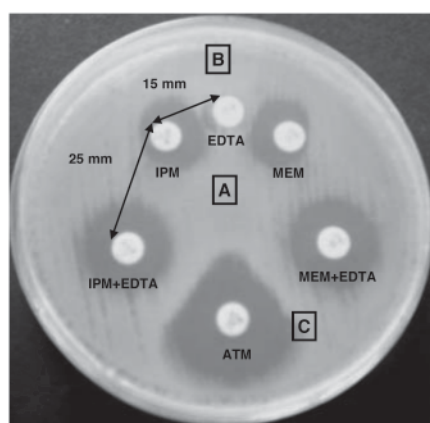
ปริมาณของ EDTA เป็น 292 ไมโครกรัมเพื่อลดผลบวกปลอม นอกจากนี้ยังทดสอบความไวของเชื้อต่อยา aztreonam โดยทำการทดสอบทั้งหมดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่ามีความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 98 ปัจจุบันมีการตรวจหาเอ็น MBL โดยวิธี multiplex-PCR^(14,15) พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ยังจำกัดอยู่ในงานวิจัยเท่านั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตรวจหาเอ็น MBL ใน *P. aeruginosa* ที่ดื้อหรือไวปานกลางต่อยา imipenem จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์โดยวิธี CDT ร่วมกับวิธี DDST โดยใช้ทั้งยา IPM และ MEM กับ EDTA 292 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับวิธี multiplex-PCR

วัสดุและวิธีการ

แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา เป็นแบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอ็น MBL จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ *P. aeruginosa* ที่ผลิตเอ็น MBL IMP-1, IMP-9⁽¹⁶⁾ และ VIM-2⁽¹⁷⁾ *P. putida* ที่ผลิตเอ็น MBL VIM-1⁽¹⁸⁾ และ *Citrobacter youngae* ที่ผลิตเอ็น MBL IMP-4⁽¹⁹⁾ และ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ไม่ซ้ำราย ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ค.ศ. 2006 จำนวน 74 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลดื้อต่อยา IPM (Oxoid,

Basingstoke, Hampshire, England) โดยวิธี disk diffusion จำนวน 64 ตัวอย่าง และไวปานกลางจำนวน 10 ตัวอย่าง เชื้อเหล่านี้เก็บรักษาในอาหาร skimmed milk (Oxoid) ที่เติม glycerol (VWR International, Poole, England) ร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

การตรวจหาเอ็น MBL โดยวิธีฟิโนไทป์ ทดสอบโดยวิธี CDT และ DDST ตามวิธีของ Pitout และคณะ⁽⁸⁾ ร่วมกับวิธีของ Franklin และคณะ⁽¹³⁾ โดยทดสอบทั้งยา IPM และ MEM (10 ไมโครกรัม, Oxoid) กับ EDTA (Amresco, Solon, Ohio) 292 ไมโครกรัม (0.1 M EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) และทดสอบความไวของเชื้อต่อยา aztreonam (ATM 30 ไมโครกรัม, Oxoid) การทดสอบทั้งหมดทำบนจานอาหารเดียวกัน (**รูปที่ 1**) การอ่านผลวิธี CDT หากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone รอบแผ่นยา IPM หรือ MEM ที่เติม EDTA กว้างกว่ายาที่ไม่ได้เติม EDTA มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แปลผลว่าเชื้อผลิตเอ็น MBL ได้ ส่วนวิธี DDST หากเชื้อผลิตเอ็น MBL ได้จะเห็นการเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ระหว่างยา IPM หรือ MEM กับ EDTA การอ่านผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา ATM หากขนาดของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 22 มิลลิเมตรแปลผลว่าไวต่อยา



รูปที่ 1 การตรวจหาเอ็น metallo- β -lactamase โดยวิธี combined-disk (A), double-disk synergy (B) และการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา aztreonam (C) ATM, aztreonam 30 ไมโครกรัม; EDTA, 0.1 M EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร; IPM, imipenem 10 ไมโครกรัม และ MEM, meropenem 10 ไมโครกรัม

การตรวจหา ยีน MBL โดยวิธี multiplex-PCR
สกัด DNA จากโคลนของแบคทีเรียซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (Oxoid) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อเช็ดเช็ดจำนวน 1-2 โคลนลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้เชื้อกระจายตัวไม่จับเป็นก้อน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5-10 นาที จากนั้นตรวจหา ยีนของเอนไซม์ MBL ได้แก่ *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{GIM}* และ *bla_{SIM}* โดยวิธี multiplex-PCR⁽¹⁴⁾ ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตรประกอบด้วยไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.8 μ M ยกเว้นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ยีน *bla_{VIM}* ใช้ 0.4 μ M และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 16s-rDNA ซึ่งเป็น internal control (16s rDNA-F: 5'-GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3' คู่กับ 16s rDNA-R: 5'-CGC ACA TCA GCG TCA G-3')⁽²⁰⁾ ใช้ 0.1 μ M (ไพรเมอร์เหล่านี้สังเคราะห์โดย BioBasic Inc., Canada) deoxynucleotide triphosphate (Promega, Madison, WI, USA) ชนิดละ 200 μ M 1x PCR buffer ที่มี $MgCl_2$ 2 mM (New England Biolabs, Ontario, Canada) *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs) 1.25 U และ DNA 2 ไมโครลิตร สภาวะของปฏิกิริยา PCR ตามวิธีของ Ellington และคณะ⁽¹⁴⁾ โดยใช้เครื่อง Thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) จากนั้นแยกชิ้นส่วนของ DNA ในแผ่นวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 2 (agarose, Promega) หรือวุ้นทรานนาเงือก (Bangkok, Thailand) ด้วยเครื่อง gel electrophoresis (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder (New England Biolabs) ย้อมด้วย ethidium bromide (Boehringer Mannheim, Germany) และตรวจดูแถบของ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้เครื่อง UV illumination Gel DOC 1000 (Bio-Rad, CA, USA) หลังจากนั้นตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MBL โดยเตรียม PCR product และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาลำเลียงรูป (QIAgen, Hilden, Germany) และตรวจวิเคราะห์ โดย

เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ (MegaBACE 1000, Amersham Biosciences, Champaign, USA)

ผลการศึกษา

การตรวจหา ยีน MBL ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์จำนวน 74 ตัวอย่าง โดยวิธี multiplex-PCR พบว่าให้ผลบวกจำนวน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.2) เป็นยีน *bla_{VIM}* จำนวน 6 ตัวอย่าง และ *bla_{IMP}* จำนวน 3 ตัวอย่าง (**รูปที่ 2**) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีเชื้อที่ตรวจพบยีน MBL ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง (**ตารางที่ 1**) เมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธีพีโนไทป์กับวิธี multiplex PCR ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในแบคทีเรียทั้งหมด 79 ตัวอย่างพบว่าวิธี CDT (**รูปที่ 3 และตารางที่ 1**) โดยใช้ IPM+EDTA/IPM ให้ผลบวกกับเชื้อที่ตรวจพบยีนทั้ง 14 ตัวอย่าง (ความไวร้อยละ 100) แต่ให้ผลบวกปลอมจำนวน 3 ตัวอย่าง (ความจำเพาะร้อยละ 95.4) ส่วนการใช้ MEM+EDTA/MEM ให้ผลบวกกับเชื้อที่ตรวจพบยีนเพียง 13 ตัวอย่าง (ความไวร้อยละ 92.9) และให้ผลบวกปลอมจำนวน 5 ตัวอย่าง (ความจำเพาะร้อยละ 92.3) การใช้ยาทั้งสองชนิดร่วมกันพบว่ามีทั้งความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และ 90.8 ตามลำดับ ส่วนวิธี DDST (**ตารางที่ 1**) พบว่าการใช้ยา IPM หรือยา MEM ให้ผลการทดสอบตรงกันทุกตัวอย่าง โดยให้ผลบวกกับเชื้อที่ตรวจพบยีนเพียง 13 ตัวอย่าง (ความไวร้อยละ 92.9) และให้ผลบวกปลอมจำนวน 2 ตัวอย่าง (ความจำเพาะร้อยละ 96.9) ทั้งวิธี CDT และ DDST ให้ผลบวกกับแบคทีเรียอ้างอิงทั้ง 5 ตัวอย่าง ผลลบปลอมจำนวน 1 ตัวอย่างจากวิธี MEM+EDTA/MEM และ DDST เป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจและเป็นตัวอย่างเดียวกันส่วนผลบวกปลอมทั้งวิธี CDT และ DDST รวมกันเป็น 7 ตัวอย่างจาก 79 ตัวอย่าง โดยให้ผลบวกทั้งวิธี IPM+EDTA/IPM, MEM+EDTA/MEM และ DDST จำนวน 1 ตัวอย่าง ให้ผลบวกเฉพาะวิธี IPM+EDTA/IPM และ MEM+EDTA/MEM จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนอีก 5 ตัวอย่าง

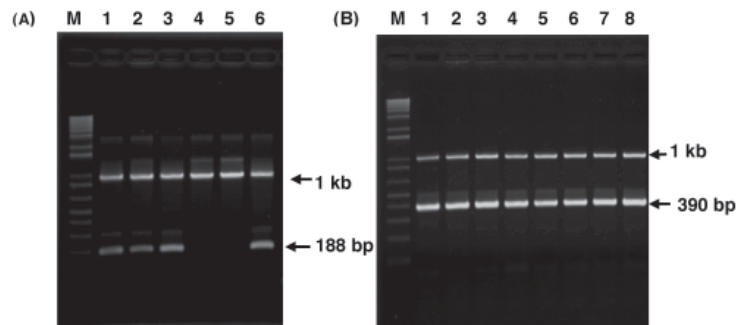
ให้ผลบวกกับวิธีใดวิธีหนึ่งอย่างเดียว สำหรับการทดสอบ ร้อยละ 71.4 และ 76.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)
ความไวของเชื้อต่อยา ATM มีความไวและความจำเพาะ

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธี combined-disk, double-disk synergy และการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา aztreonam เปรียบเทียบกับวิธี multiplex-PCR ในแบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ MBL และ *P. aeruginosa* ที่ให้ผลดีหรือไวปานกลางต่อยา imipenem จำนวน 79 ตัวอย่าง

Phenotypic tests			Multiplex-PCR			Sensitivity (%)	Specificity (%)
			MBL gene		total		
			+	-			
Combined-disk test ^a	IPM+EDTA/IPM	MBL +	14	3	17	100.0	95.4
		MBL -	0	62	62		
		total	14	65	79		
	MEM+EDTA/MEM	MBL +	13	5	18	92.9	92.3
		MBL -	1	60	61		
		total	14	65	79		
	IPM+EDTA/IPM & MEM+EDTA/MEM	MBL +	14	6	20	100	90.8
		MBL -	0	59	59		
		total	14	65	79		
Double-disk synergy test ^a	IPM/EDTA or MEM/EDTA or both disks	MBL +	13	2	15	92.9	96.9
	MBL -	1	63	64			
	total	14	65	79			
Susceptibility to aztreonam ^b	S		10	15	25	71.4	76.9
	I or R		4	50	54		
	total		14	65	79		

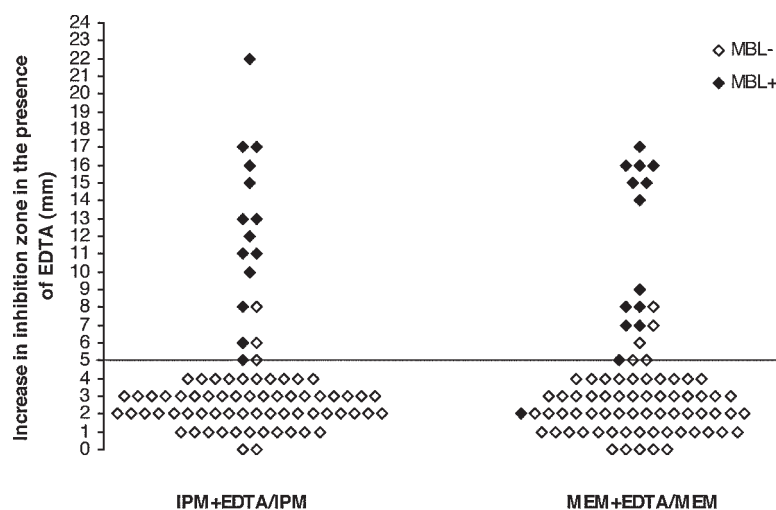
^aEDTA, 0.1 M EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร; IPM, imipenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และ MEM, meropenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม

^bS, susceptible; I, intermediate และ R, resistant



รูปที่ 2 ผลการเพิ่มชิ้นส่วน DNA ของยีน *bla*_{IMP} (A) และ *bla*_{VIM} (B) พร้อมทั้ง 16s rDNA (PCR product ขนาดประมาณ 1 kb) โดยวิธี multiplex PCR ในแบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ MBL และ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

- (A) Lane M, 1 kb DNA ladder; 1-5, *P. aeruginosa* จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย; และ 6, *P. aeruginosa* ที่มียีน *bla*_{IMP-1} (PCR product ขนาด 188 bp)
- (B) Lane M, 1 kb DNA ladder; 1-7, *P. aeruginosa* จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย; และ 8, *P. aeruginosa* ที่มียีน *bla*_{VIM-2} (PCR product ขนาด 390 bp)



รูปที่ 3 ขนาดของ inhibition zone ต่อยา imipenem และ meropenem ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเติม EDTA ลงไปในการตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธี combined-disk ในแบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ MBL และ *P. aeruginosa* จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง EDTA, 0.1 M EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร; IPM, imipenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และ MEM, meropenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้ทดสอบเอนไซม์ MBL ใน *P. aeruginosa* ด้วยวิธีพีโนไทป์โดยใช้ทั้งยา IPM และยา MEM เพราะยาทั้งสองชนิดให้ความไวและความจำเพาะสูง^(8,13) ส่วน EDTA เลือกใช้ 292 ไมโครกรัมตามวิธีของ Franklin และคณะ⁽¹³⁾ เนื่องจากมีรายงานว่า EDTA ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้⁽¹⁰⁾ ส่วนวิธี DDST วางยา IPM หรือ MEM ห่างจาก EDTA 15 มิลลิเมตรแทน 20 มิลลิเมตร⁽¹³⁾ เนื่องจากเชื่อที่ใช้ในการศึกษานี้ให้ inhibition zone ต่อยา IPM หรือ MEM แคบหรือไม่มี inhibition zone จึงลดระยะห่างของยากับ EDTA เพื่อให้อ่านผลชัดเจนยิ่งขึ้น⁽²¹⁾

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบเอนไซม์ MBL ด้วยวิธีพีโนไทป์กับวิธี multiplex-PCR⁽¹⁴⁾ พบว่าวิธี CDT โดยใช้ IPM+EDTA/IPM ให้ความไวและความจำเพาะสอดคล้องกับการศึกษาของ Franklin และคณะ⁽¹³⁾ ซึ่งทดสอบกับ *P. aeruginosa* จำนวน 35 ตัวอย่างให้ความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 93.3 ส่วนการใช้ MEM+EDTA/MEM มีความไวและความจำเพาะต่ำกว่าการศึกษาของ Pitout และคณะ⁽⁸⁾ ซึ่งทดสอบใน *P. aeruginosa* จำนวน 241 ตัวอย่างให้ความไวสูงถึงร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 97 ทั้งนี้ อาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาน้นน้อยกว่า โดยเฉพาะจำนวนตัวอย่างที่ผลิตเอนไซม์ MBL ได้ หรือเกิดจากปริมาณของ EDTA ที่ใช้ในการทดสอบซึ่งวิธีของ Pitout และคณะใช้ EDTA 930 ไมโครกรัมและอ่านผลบวกเมื่อขนาดของ inhibition zone ของยาที่เติม EDTA กว้างขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตร⁽⁸⁾ ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ EDTA 292 ไมโครกรัมและอ่านผลบวกเมื่อกว้างขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เชื่อที่ตรวจพบเอนไซม์ MBL จำนวน 14 ตัวอย่าง มี 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85.7) ที่ให้ขนาดของ inhibition zone เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตรทั้งวิธี IPM+EDTA/IPM และ MEM+EDTA/MEM และมี 1 ตัวอย่างที่ขนาดของ inhibition zone ของยา MEM (9 มิลลิเมตร) เพิ่มขึ้นมากกว่ายา IPM (5 มิลลิเมตร) ดังนั้นวิธี CDT เป็นวิธีที่สะดวก

และอ่านผลง่าย นอกจากนี้การใช้ยา 2 ชนิดในการทดสอบ อาจจะช่วยยืนยันผลการทดสอบในกรณีที่ขนาดของ inhibition เพิ่มขึ้นเพียง 5 มิลลิเมตรซึ่งเป็นค่า cut off

จากการศึกษาวิธี DDST ทั้งยา IPM และ MEM ให้ผลการทดสอบเหมือนกันทุกตัวอย่าง มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 92.9 และ 96.9 ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Franklin และคณะ⁽¹³⁾ วิธี DDST ด้วยยา IPM มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 79 และ 98 ตามลำดับ ความไวที่แตกต่างกันอาจเกิดจากระยะห่างของแผ่นยา IPM กับแผ่น EDTA ซึ่งวางใกล้กว่าการศึกษาของ Franklin และคณะ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ทดสอบกับ *P. aeruginosa* เท่านั้น ในขณะที่การศึกษาของ Franklin และคณะทดสอบกับเชื้อทั้งกลุ่ม NFB และวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยไม่ได้แสดงผลแยกตามชนิดของเชื้อเช่นที่แสดงโดยวิธี CDT

ผลการศึกษาพบเชื้อจำนวน 7 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี CDT และ/หรือ DDST แต่เมื่อตรวจเอนไซม์ MBL ทั้งโดยวิธี multiplex PCR หรือแยกตรวจโดยใช้ไพรเมอร์แต่ละคู่พบว่าให้ผลลบทั้งหมด ทั้งนี้อาจเป็นผลบวกปลอมเนื่องจาก EDTA มีผลทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* ไวต่อยา imipenem มากขึ้น⁽¹⁰⁻¹²⁾ หรือเชื้ออาจจะผลิตเอนไซม์ MBL ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

การตรวจกรองเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL โดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา aztreonam พบว่ามีความไวและความจำเพาะต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Franklin และคณะ⁽¹³⁾ ซึ่งให้ความไวร้อยละ 63 ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL อาจจะมีเอนไซม์ β -lactamase ชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น เอนไซม์ ESBL และ AmpC- β -lactamase เอนไซม์เหล่านี้สลายยา aztreonam ได้ ทำให้เชื้อดื้อต่อยา aztreonam ซึ่งจากผลการศึกษา มีเชื้อ 1 ตัวอย่างที่ผลิตเอนไซม์ MBL ร่วมกับ ESBL และให้ผลดื้อต่อยา aztreonam ดังนั้นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา aztreonam จึงไม่เหมาะสำหรับการตรวจกรองเอนไซม์ MBL เช่นเดียวกับการศึกษาของ Franklin และคณะ⁽¹³⁾

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเอนไซม์ MBL โดยวิธี CDT และ DDST เป็นวิธีที่ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง และเหมาะสมสำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ การตรวจหาเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL ได้รวดเร็วจะช่วยในการวางแผนป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาไปยังผู้ป่วยอื่นรวมทั้งป้องกันการแพร่กระจายของยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียอื่นๆด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และทุนบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2550 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Dr David Livermore และ Dr Jianhui Xiong ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียอ้างอิงที่ผลิตเอนไซม์ MBL เจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นางสาวเพ็ญภา เขตจตุรัส และนางสาววิพร วัฒนาวงศ์ดอน นักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 ที่รวบรวมข้อมูลของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา และคณะเทคนิคการแพทย์ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18: 306-25.
- Bush K. Metallo- β -lactamases: a class apart. Clin Infect Dis 1998; 27 (Suppl 1): S 48-53.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 2000; 38: 40-3.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 88-91.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41: 4623-9.
- Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49: 5-11.
- Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002; 40: 3798-801.
- Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005; 43: 3129-35.
- Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002; 40: 2755-9.
- Chu YW, Cheung TK, Ngan JY, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. Int J Antimicrob Agents 2005; 26: 340-1.

11. Ayres HM, Furr JR, Russell AD. Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol 1999; 28: 13-6.
12. Conejo MC, García I, Martínez-Martínez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2313-5.
13. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006; 44: 3139-44.
14. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 321-2.
15. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol 2007; 45: 544-7.
16. Xiong J, Hynes MF, Ye H, Chen H, Yang Y, M'Zali F, et al. *Bla*_{IMP-9} and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 355-8.
17. Songsri J. Detection of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases produced by carbapenem-resistant Gram-negative bacilli from Srinagarind Hospital. [Thesis]. Khon Kaen: Khon Kaen University; 2005.
18. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Colí A, et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. J Clin Microbiol 2002; 40: 4051-5.
19. Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M'Zali FH. Occurrence of a new metallo- β -lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. FEMS Microbiol Lett 2001; 194: 53-7.
20. Wilailuckana C. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. [Thesis]. Bangkok: Mahidol University; 2005.
21. Ruppe E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler Class C1 AmpC β -lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double disc synergy test. J Clin Microbiol 2005; 44: 4204-7.