



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมส ที่ออกฤทธิ์กว้างของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* อย่างรวดเร็วโดยวิธี loop-mediated isothermal amplification

โดย ดร. กฤษณ์ ธีรพันธุ์เมธี

มิถุนายน พ.ศ. 2556

สัญญาเลขที่ MRG5380022

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมส ที่ออก
ฤทธิ์กว้างของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae*
อย่างรวดเร็วโดยวิธี loop-mediated isothermal amplification

ดร. กฤษณ์ ธิรพันธุ์เมธี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Contents

Abstract	i
บทคัดย่อ	ii
Executive summary	iii
Introduction	1
Objective	10
Materials and Methods	11
Results	23
Discussion	45
Conclusion	48
References	49
Output of Research	56

Abstract

Project Code : MRG-5380022

Project Title : Rapid detection of extended-spectrum β -lactamase gene from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification

Investigator : Krit Thirapanmethee Faculty of Pharmacy Mahidol University

E-mail Address : krit.thi@mahidol.ac.th

Project Period : 15 June 2010 – 14 June 2012

The objective of this study was to develop a rapid, sensitive, specific and inexpensive technique for detecting the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. ESBLs are a group of β -lactamase enzyme which is produced by Enterobacteriaceae. ESBLs are one of the important mechanisms causing multiple-resistance to most of beta-lactam antibiotics. The detection of ESBL-producing bacteria is necessary for identification, protection and treatment. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification method which can amplify DNA at an isothermal condition. The ESBLs-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* was isolated from Ramathibodi Hospital and confirmed by double-disk synergy test (DDST). Then, a set of specific oligonucleotide primers of LAMP for detection of *bla*_{CTX-M9} gene were designed based on *bla*_{CTX-M9} from *E. coli* (GenBank accession number AJ416345). The reaction was performed under isothermal temperature at 63°C for 60 mins. The amplicon showed ladder-like pattern of band sizes from 226bp of *bla*_{CTX-M9} DNA target. The LAMP was more sensitive than the PCR by 10,000 fold. The specificity of LAMP primers for *bla*_{CTX-M9} detection was observed. The LAMP product was confirmed by restriction digestion with appropriate restriction enzymes. The sizes of the DNA fragments generated were 168, 177 and 250 bp for *Mbol* digestion and 165, 193, 229, 281 and 314 bp for *TaqI* digestion in good agreement with the predicted size. Moreover, amplification can be visualized by addition of SYBR Green I. The solution mixture turned green in the presence of LAMP amplicon. On the other hand, the solution still remained orange when LAMP amplicon was absent.

In conclusion, the LAMP technique is a rapid procedure with high sensitivity and specificity for detecting ESBLs.

Keywords: extended-spectrum β -lactamases, *E. coli*, *K. pneumoniae*, ESBLs, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG-5380022

ชื่อโครงการ: การตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเอสที่ออกฤทธิ์กว้างของเชื้อ

Escherichia coli และ *Klebsiella pneumoniae* อย่างรวดเร็วโดยวิธี loop-mediated isothermal amplification

ชื่อนักวิจัย: ดร. กฤษณ์ ธิรพันธุ์เมธี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : krit.thi@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน 2553 – 14 มิถุนายน 2555

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ความไว ความจำเพาะสูง และประหยัด เพื่อใช้ตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ extended-spectrum β -lactamase (ESBL) ใน *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เอนไซม์ชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลคแตมซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก การพัฒนาวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญในการจำแนก ป้องกัน และรักษา วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ ที่รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะสูง เทคนิคนี้ถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs งานวิจัยนี้ได้แยกเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBLs จากโรงพยาบาลรามารับดีและยืนยันการสร้าง ESBLs ด้วยวิธี double disk synergy test (DDST) จากนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์ของ LAMP ที่จำเพาะกับยีน *bla*_{CTX-M9} โดยใช้ลำดับเบสของยีน *bla*_{CTX-M9} จากเชื้อ *E. coli* (GenBank accession number AJ416345) เป็นต้นแบบ ผลิตภัณฑ์ของ LAMP ที่ได้ ภายใต้ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที มีลักษณะเป็น ladder ขนาด 226 คู่เบส เทคนิค LAMP มีความไวสูงกว่าเทคนิค PCR ถึง 10,000 เท่า ไพรเมอร์ของ LAMP มีความจำเพาะในการตรวจหายีนที่สร้าง CTX-M9 ได้ดี ผลิตภัณฑ์ของ LAMP ถูกยืนยันด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีขนาด 168 177 และ 250 คู่เบส สำหรับ *MboI* และ 165 193 229 281 และ 381 คู่เบส สำหรับ *TaqI* นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยสังเกตการเปลี่ยนของสี SYBR green I ที่เติมลงไปภายหลังปฏิกิริยา โดยจะเปลี่ยนสีของ SYBR green I จากสีส้มเป็นสีเขียวเมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่จะยังคงเป็นสีส้มหากไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะสูงราคาไม่แพงและสามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ได้ภายในเวลา รวดเร็ว ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมต่อการตรวจหายีนที่สร้าง ESBL

คำหลัก: extended-spectrum β -lactamases, *E. coli*, *K. pneumoniae*, ESBLs, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Executive Summary

ปัจจุบันปัญหาเชื้อจุลชีพที่ดื้อยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก กลไกที่สำคัญคือการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ขึ้นมาทำลายยาในกลุ่ม β -lactam ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อที่สร้าง ESBL สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ phenotypic detection ซึ่งจะใช้วิธี non-molecular ในการตรวจ โดยจะดูความสามารถของ ESBL ในการทำลายยา cephalosporin ชนิดต่างๆ วิธีนี้เป็นที่นิยมในการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไป เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก และราคาไม่แพง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดของ ESBL ได้ อีกกลุ่มหนึ่งได้แก่ genotypic detection ซึ่งจะใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจ โดยจะทำการตรวจหายีนที่สร้าง ESBL วิธีนี้ใช้กันมากในงานวิจัยและห้องปฏิบัติการมาตรฐานในการจำแนกยีนที่สร้าง ESBL ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถตรวจพบในกรณีที่เชื้อยังดื้อยาไม่มากไม่สามารถตรวจด้วยวิธี phenotypic ได้ วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นการเพิ่มจำนวนสาย DNA เป้าหมายแบบขั้นเดียวที่มีความไวและความจำเพาะสูง งานวิจัยชิ้นนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้าง CTX-M9 ที่สร้างจากเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* โดยใช้เทคนิค LAMP โดยจะทำการออกแบบชุด primer 4 เส้น ที่จำเพาะกับยีน CTX-M9 ซึ่งจำเพาะกับ 6 ตำแหน่งบน DNA เป้าหมาย จากนั้นทำการ เพิ่มจำนวนสาย DNA ที่ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็น ladder ขนาด 226 คู่เบส แล้วทำการตรวจสอบความจำเพาะโดยการย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* และ *TaqI* พบว่าขนาดของชิ้น DNA ที่ได้มีขนาดตรงกับที่คาดหมายจาก โครงสร้างที่ 15 ของผลิตภัณฑ์ และเมื่อทดสอบความจำเพาะและความไวของวิธี LAMP เทียบกับ PCR พบว่ามีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ CTX-M9 (*bla*_{CTX-M9}) และวิธี LAMP มีความไวต่อปริมาณของ DNA ตั้งต้นมากกว่าวิธี PCR ถึงอย่างน้อย 10,000 เท่า นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยสังเกตการเปลี่ยนของสี SYBR green I ที่เติมลงไปภายหลังปฏิกิริยา โดยจะเปลี่ยนสีของ SYBR green I จากสีส้มเป็นสีเขียวเมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่จะยังคงเป็นสีส้มหากไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะสูง นอกจากนี้การที่ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปภายใต้อุณหภูมิคงที่ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler ที่มีราคาแพง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมต่อการตรวจหายีนที่สร้าง ESBL สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้าง ในห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไปเป็นประจำได้

Introduction

1. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)

เอนไซม์ β -lactamase เป็นกลไกที่สำคัญในการป้องกันตัวเองของเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β -lactam คือ penicillins และ cephalosporins นับตั้งแต่มีการนำยาทั้ง 2 กลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาทางคลินิก เชื้อจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ก็มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ส่วนมากยีนที่สร้างเอนไซม์ ESBL นี้พบอยู่บน plasmid ซึ่งเป็น extrachromosomal DNA ที่สามารถถ่ายทอดจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่ง ไปสู่อีกเซลล์หนึ่งทั้งใน species เดียวกันหรือต่าง species ก็ได้ มีรายงานการพบเอนไซม์ β -lactamase ที่สร้างโดยยีนที่อยู่บน plasmid ครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* เมื่อช่วงต้นทศวรรษที่ 1960 โดยแยกได้จากผู้ป่วยชาวกรีซชื่อ Temoniera จึงตั้งชื่อเอนไซม์ที่พบว่า TEM-1 (1) จากวันที่ค้นพบครั้งแรกจนถึงปัจจุบัน มีรายงานการแพร่กระจายของเอนไซม์ชนิดนี้ในแบคทีเรียหลายชนิด และส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เช่น แบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae *Pseudomonas aeruginosa* *Haemophilus influenzae* และ *Neisseria gonorrhoeae* (1, 6) นอกจาก TEM แล้วยังมีรายงานการพบเอนไซม์ β -lactamase ชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ ชนิด SHV ที่พบมากในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และชนิด CTX-M ที่พบมากในเชื้อ *E. coli*

ตั้งแต่มีรายงานการค้นพบ β -lactamase ได้มีความพยายามคิดค้นและพัฒนาในในกลุ่ม β -lactam ชนิดใหม่เพื่อป้องกันกรถูกทำลายโดยเอนไซม์นี้ แต่ยาชนิดใหม่ๆ นี้เอง ทำให้เกิด selective pressure ในการอยู่รอดของเชื้อ ทำให้มีการพัฒนาของเอนไซม์ β -lactamase ตามมาอย่างรวดเร็ว เกิดเป็น β -lactamase ชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์กว้างกว่าเก่าซึ่งมีรายงานครั้งแรกในช่วงกลางทศวรรษที่ 1980 การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียงไม่กี่ตำแหน่งใน TEM-1 และ SHV-1 ทำให้ขอบเขตการออกฤทธิ์ของ β -lactamase เพิ่มขึ้น โดยสามารถออกฤทธิ์ต่อ cephalosporins รุ่นที่ 3 โดยเฉพาะต่อ oxyimino cephalosporin เนื่องจากความสามารถในการทำลายยาได้อย่างกว้างขวางนี้เองทำให้มีการตั้งชื่อเอนไซม์ชนิดนี้ว่า extended-spectrum β -lactamase (ESBL) (1,6) และเช่นเดียวกับ β -lactamase ชนิดอื่น ๆ ยีนที่สร้าง ESBL นี้ อยู่บน plasmid ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนนี้ในวงกว้าง (1, 2, 4, 6, 7)

การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ β -lactamase สามารถทำได้ 2 วิธีใหญ่ๆ คือ Ambler molecular classification และ Bush-Jacoby-Medeiros functional classification (ตารางที่ 1) (21) ในวิธีแรกจะแบ่ง β -lactamase ออกเป็น 4 กลุ่ม A – D ตามลำดับความเหมือนกันของกรดอะมิโน โดยในกลุ่ม A C และ D เป็น serine β -lactamase คือจะมีกรดอะมิโน serine อยู่บริเวณ active site ส่วนกลุ่ม B เป็น metallo β -lactamase ที่ต้องอาศัย zinc ในการทำงาน ESBL ส่วนมากจัดอยู่ในกลุ่ม A ส่วนระบบ Bush-Jacoby-Medeiros จะแบ่งกลุ่มของ ESBL ตามการทำงานซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ 1-4 และกลุ่มย่อยอีกหลายกลุ่ม (1, 2, 7)

ESBL จัดอยู่ในกลุ่ม 2be (ส่วนมากเป็นชนิด TEM และ SHV) และกลุ่ม 2d (ชนิด OXA) โดยการแบ่งกลุ่มทั้ง 2 วิธี แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของเอนไซม์ β -lactamase (21)

Class/ group	Type	Examples
Ambler classification	Penicillinases	TEM SHV PC1 CTX-M
Class A	Metallo-beta-lactamases	IMP-1 VIM-1
Class B	Cephalosporinases	AmpCs CMY-2
Class C	Oxacillinases	OXA-1
Class D		
Bush-Jacoby-Mandeiros		
Group 1	Cephalosporinases Hydrolyze extended spectrum cephalosporins; clavulanic resistant	AmpCs CMY-2
Group 2	All clavulanic acid susceptible	
2a	Penicillinases	PC-1 from <i>S.aureus</i>
2b	Broad-spectrum penicillinases	TEM-1 SHV-1
2be	ESBLs	SHV-2 TEM-10 CTC-Ms
2br	Inhibitor resistant	
2c	Carbenicillin hydrolyzing	TEM IRT
2d	Oxacillin hydrolyzing	PSE-1
2e	Cephalosporinase inhibited by clavulanate	OXA-10 OXA-1
2f		FEC-1
Group 3	Carbapenemases Metallo-beta-lactamases Hydrolyzing imipenem, inhibited by EDTA, resistant to clavulanate	KPC-1 SME-1 IMP-1 VIM-1
Group 4	Miscellaneous	

ESBL ถูกจัดกลุ่มตามจำนวนของกรดอะมิโนที่ถูกแทนที่ (1-7) ซึ่งทำให้ configuration และคุณสมบัติบริเวณ active site เปลี่ยนแปลงไป การเปลี่ยนแปลงของ active site ทำให้ความสามารถในการทำลายยาเพิ่มมากขึ้น โดยคำนยามแล้ว ESBL ควรจะมีลักษณะดังนี้

1. สามารถทำลายยา penicillins และ cephalosporins รุ่นที่ 1 2 และ 3 รวมทั้ง aztreonam แต่ไม่ทำลาย cephamycins หรือ carbapenams
2. มีกรดอะมิโน serine ที่ active site
3. ถูกยับยั้งโดย β -lactamase inhibitors เช่น clavulanate sulbactam และ tazobactam

ESBL ส่วนมากมีพัฒนาการมาจาก TEM หรือ SHV แต่เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานการค้นพบESBL กลุ่มใหม่ซึ่งเป็น non-TEM non-SHV เช่น CTX-M และ PER ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบ ESBL มากกว่า 700 ชนิดและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก (3) อุบัติการณ์ของ ESBL และชนิดของ ESBL ที่พบจะแตกต่างกันในแต่ละประเทศ โดย TEM และ SHV จะพบได้ทั่วโลกแต่ CTX-M มีรายงานว่าพบมากใน 3 พื้นที่เท่านั้น คือ อเมริกาใต้ ประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนรวมยุโรปตะวันออกและเอเชียตะวันออก และล่าสุดคือ อเมริกาเหนือ (22, 23) มีรายงานการระบาดของ ESBL ชนิด CTX-M เช่น อินเดีย (2) จีน (24 – 26) ญี่ปุ่น (27 – 29) เกาหลี (30 – 32) เวียดนาม (33) และสิงคโปร์ (34) ทำให้เกิดข้อสงสัยว่า CTX-M จะเป็น ESBL ที่พบส่วนมากในเอเชีย (2)

ในประเทศไทยมีรายงานการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่สร้าง ESBL หลายรายงาน ดังนี้ Lulitanond และคณะทำการแยกเชื้อ *Enterobacteriaceae* 200 ตัวอย่างและ *Pseudomonadaceae* 100 ตัวอย่างจาก ร.พ. ศรีนครินทร์ ระหว่างปี 1994 – 1996 พบว่าร้อยละ 26 ของ *Enterobacteriaceae* สร้าง ESBL เชื้อส่วนใหญ่ที่พบว่าสร้างคือ *K. pneumoniae* และ *Enterobacter* spp. ร้อยละ 28 ของ *Pseudomonadaceae* สร้าง ESBL ส่วนมากคือเชื้อ *P. aeruginosa* และ *Stenotrophomonas maltophilia* (8)

Biedenbach และคณะได้แยกเชื้อจากผู้ป่วยจากโรงพยาบาล 8 แห่งเมื่อปี 1998 พบว่า *E.coli* ร้อยละ 15.7 และ *K. pneumoniae* ร้อยละ 45.6 สร้าง ESBL (9) Girlich และคณะศึกษาอุบัติการณ์และ subtype ของ ESBL จากเชื้อ *Enterobacteriaceae* และ *P. aeruginosa* ที่แยกจาก ร.พ. ศิริราช 2 ช่วง ช่วงแรกระหว่าง เดือนมิถุนายน ถึง สิงหาคม 1999 พบว่า *E. coli* ร้อยละ 4.5 *K. pneumoniae* ร้อยละ 9.6 และ *Enterobacter* spp. ร้อยละ 26 สร้าง ESBL (10) ช่วงที่ 2 ระหว่างมิถุนายน ถึง ตุลาคม 1999 พบว่า ร้อยละ 24 ของเชื้อ *P. aeruginosa* สร้าง ESBL (11)

Chanawong และคณะทำการแยกเชื้อที่สร้าง ESBL 61 สายพันธุ์ แล้วทำการศึกษานิตของESBLที่เชื้อสร้างโดยแบ่งเป็น *Enterobacteriaceae* 43 สายพันธุ์ และ *Pseudomonadaceae* 18 สายพันธุ์ ที่แยกจาก ร.พ. ศรีนครินทร์ ระหว่างปี 1994 – 1996 พบว่า *Enterobacteriaceae* สร้าง ESBL ชนิด SHV มากที่สุด (ร้อยละ 95.4) ขณะที่ *Pseudomonadaceae* พบชนิด VEB มากที่สุด (ร้อยละ 94.4) (12) Ingviya และคณะแยกเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* อย่างละ

400 และ 500 ตัวอย่างตามลำดับจาก ร.พ. สงขลานครินทร์ เมื่อปี 2002 พบว่า *K. pneumoniae* ร้อยละ 32 และ *E. coli* ร้อยละ 19 สร้าง ESBL (13) Kiratisin และคณะได้ทำการศึกษา *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL แยกจากผู้ป่วยที่ ร.พ. มหาวิทยาลัย 2 แห่ง 362 ราย ระหว่าง ธันวาคม 2004 ถึง พฤษภาคม 2005 พบว่าร้อยละ 99.6 ของ ESBL ที่พบจาก *E. coli* เป็นชนิด CTX-M และร้อยละ 87.4 ของ ESBL ที่ *K. pneumoniae* สร้างเป็นชนิด SHV (35) Niumsup และคณะแยกเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ cephalosporin รุ่นที่ 3 พบว่าทุกตัวอย่างสร้าง ESBL และเป็นชนิด CTX-M และ SHV มากที่สุดใน *E. coli* และ *K. pneumoniae* ตามลำดับ(15)

Nathisuwan และคณะได้ทำการแยกเชื้อ *E. coli* 27 สายพันธุ์และ *K. pneumoniae* 9 สายพันธุ์จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลรามารับดีในระหว่างเดือนเมษายน ถึง มิถุนายน 2005 และเดือนมีนาคม 2006พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่แยกได้สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้างและชนิดของเอนไซม์ที่พบมากที่สุดคือ CTX-M ร้อยละ 86 ตามด้วย VEB และ SHV พบร้อยละ 58 และ 14 ตามลำดับ (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่)

ในประเทศไทยการติดเชื้อที่สร้าง ESBL มีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในทุกๆภาคของประเทศ การติดเชื้อเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายที่สูงขึ้น ระยะเลาที่ต้องอยู่โรงพยาบาลนานขึ้น รวมถึงค่าใช้จ่ายที่เพิ่มมากขึ้นด้วย (36) นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาก็มีจำกัดเนื่องจากการตอบสนองต่อ cephalosporins รุ่นที่ 3 ก็ได้ผลไม่ดี โดยมีโอกาสล้มเหลวสูงถึงร้อยละ 54 (37) ปัจจุบันใช้ carbapenem เป็น drug of choice ในการรักษาผู้ติดเชื้อตระกูล Enterobacteriaceae ที่สร้าง ESBL (38 – 41)

เนื่องจากความเสี่ยงต่อความล้มเหลวในการรักษาด้วย cephalosporin รุ่นที่ 3 หรือ aztreonam (42) การตรวจสอบว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL หรือไม่จึงมีความสำคัญในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ การตรวจหาเชื้อที่สร้าง ESBL ในปัจจุบันแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ phenotypic detection และ genotypic detection การตรวจในวิธีแรกเริ่มมีการพัฒนาขึ้นในทศวรรษที่ 1980 และใช้วิธี non-molecular เป็นหลักซึ่ง Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) ของสหรัฐอเมริกาและ Health Protection Agency (HPA) ของสหราชอาณาจักรได้เผยแพร่แนวทางในการตรวจหา ESBL ใน Enterobacteriaceae เน้น *E. coli* *Klebsiella* sp. และ *Proteus* sp. เป็นหลัก (43) โดยจะดูความสามารถของเชื้อที่ติดต่อยา cephalosporin รุ่นที่ 3 เช่น cefotaxime และ ceftriaxone ร่วมกับการใช้ β -lactamase inhibitors คือ clavulanate การแปลผลจะดูจากค่า MIC ของยาที่ลดลงหลังจากให้ clavulanate ตัวอย่างของวิธี phenotypic detection เช่น double-disk synergy test ESBL Etest combination disk method ซึ่งการตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไปส่วนมากนิยมใช้วิธีนี้เนื่องจากทำได้ง่าย และราคาไม่แพง รวมทั้งยังสามารถใช้ร่วมกับเครื่องมืออัตโนมัติได้ เช่น VITEK 2 ESBL test หรือ Phoenix ESBL test อย่างไรก็ตามวิธีตรวจแบบ phenotypic detection นี้ ไม่สามารถบอกชนิดที่แน่นอนของ ESBL (SHV TEM หรือ CTX-M) ได้

ส่วนการตรวจแบบ genotypic detection จะใช้วิธีทางอนุชีววิทยาตรวจหาเอ็นที่สร้าง ESBL ซึ่งจะสามารถระบุชนิดของ ESBL ที่แน่นอนได้ วิธีที่นิยมใช้กันคือการเพิ่มจำนวนเอ็นที่สร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นนำเอ็นที่ได้ไปทำการหาลำดับเบสเพื่อยืนยันผลและจำแนกชนิดของเอนไซม์ (1) วิธีนี้สามารถตรวจพบเอ็นได้แม้มีปริมาณน้อยซึ่งอาจตรวจไม่พบโดยวิธี phenotypic (16) และยังสามารถตรวจจากสิ่งส่งตรวจได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ซึ่งเป็นการประหยัดเวลา (1) ได้มีการพัฒนาวิธีตรวจทาง genotypic เพื่อไม่ต้องนำเอ็นที่ได้ไปหาลำดับเบสเพื่อลดเวลาในการแปรผล วิธีเหล่านั้นได้แก่ PCR with RFLP PCR with single-strand conformation polymorphism Ligase chain reaction Restriction site insertion PCR และ real-time PCR ซึ่งวิธีต่างๆเหล่านี้ต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและมีราคาแพงทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจเป็นประจำได้ ส่วนมากจะใช้นักวิจัยหรือในห้องปฏิบัติการอ้างอิง (reference laboratory) เท่านั้น

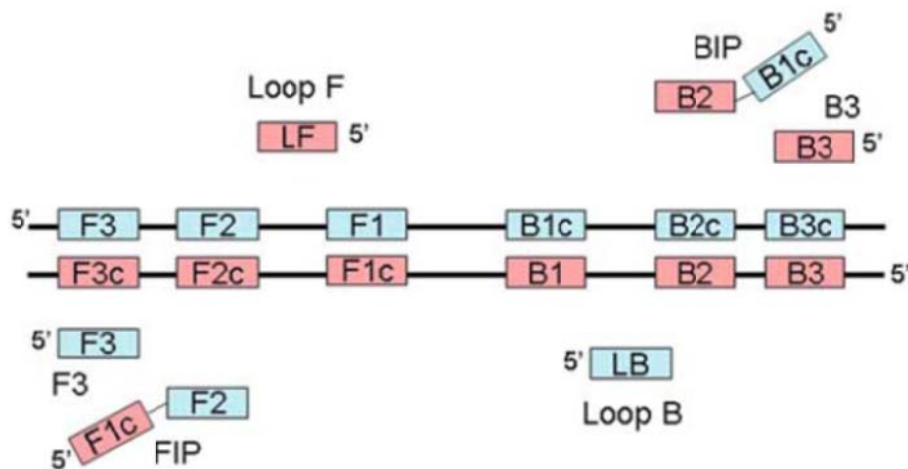
จะเห็นได้ว่าการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีความสำคัญในการค้นหาและรายงานผลเมื่อพบเชื้อที่สร้าง ESBL ทำให้การเลือกใช้ยาเป็นไปอย่างเหมาะสมเพื่อป้องกันความล้มเหลวในการรักษาและยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้ด้วย (2)

2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

LAMP เป็นวิธีเพิ่มจำนวน DNA แบบหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Notomi และคณะ ในปี 2000 (18) มีข้อดีคือมีความรวดเร็ว แม่นยำ ถูกต้อง และราคาไม่แพง ในอดีตการตรวจและจำแนกเชื้อก่อโรค จะใช้การแยกเชื้อจากผู้ป่วยแล้วทำให้เชื้อก่อโรคเพียงชนิดเดียวเป็นหลัก วิธีนี้จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับตัวเชื้อก่อโรคและความไวต่อยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษา (44) แต่เชื้อบางชนิดโตช้าในหลอดทดลองและเชื้อบางชนิดไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ เป็นข้อจำกัดที่สำคัญของวิธีนี้ (45) ใน 2 ถึง 3 ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีทางอนุชีววิทยาเพื่อนำมาใช้แทนวิธีดั้งเดิมโดยเฉพาะวิธีเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคในหลอดทดลอง (46) วิธีนี้ทำให้การตรวจสอบเชื้อก่อโรคเป็นไปด้วยความรวดเร็วรวมทั้งมีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเทียบกับวิธีเดิม วิธีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหลายวิธีได้แก่ polymerase chain reaction (PCR) Ligase chain reaction Nucleic acid sequence based amplification และ Strand displacement amplification ได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปและมีวางจำหน่ายทั่วไป (20, 47) นอกจากความรวดเร็วแล้ว การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมยังมีข้อดีอื่นๆ อีก เช่น สามารถ standardized และบอกถึง species ของเชื้อรวมทั้งการดื้อยาได้ด้วย (48) แต่วิธีต่างๆ เหล่านี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำสูงและมีราคาแพงทำให้ไม่สามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไปได้ LAMP จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรด้านเครื่องมือที่จำกัดโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาซึ่งเป็นแหล่งระบาดของโรคติดเชื้อที่สำคัญหลายชนิด

LAMP เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA แบบขั้นเดียวที่มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้อุณหภูมิคงที่ในการเกิดปฏิกิริยา กลไกของปฏิกิริยา สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนย่อย คือ

ขั้นเริ่มต้น (initiation step) ขั้นเพิ่มจำนวนแบบเป็นรอบ (cycling amplification step) และขั้นต่อสายให้ยาว (elongation step) ในการเกิดปฏิกิริยาต้องอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่มี strand-replacement activity ร่วมกับ specific oligonucleotide primer ด้านใน (inner primer) 2 เส้น (FIP, BIP) และ primer ด้านนอก (outer primer) 2 เส้น (F3, B3) ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสบน DNA เป้าหมาย 6 ตำแหน่ง ต่างๆกัน (รูปที่ 1.1) DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนและ primer ทั้ง 4 เส้นจะถูก denature โดยความร้อนแล้วทำให้เย็นลงทันที ปฏิกิริยาจะเกิดเมื่อเติมเอนไซม์ DNA polymerase แล้วให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 30 – 60 นาที ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม



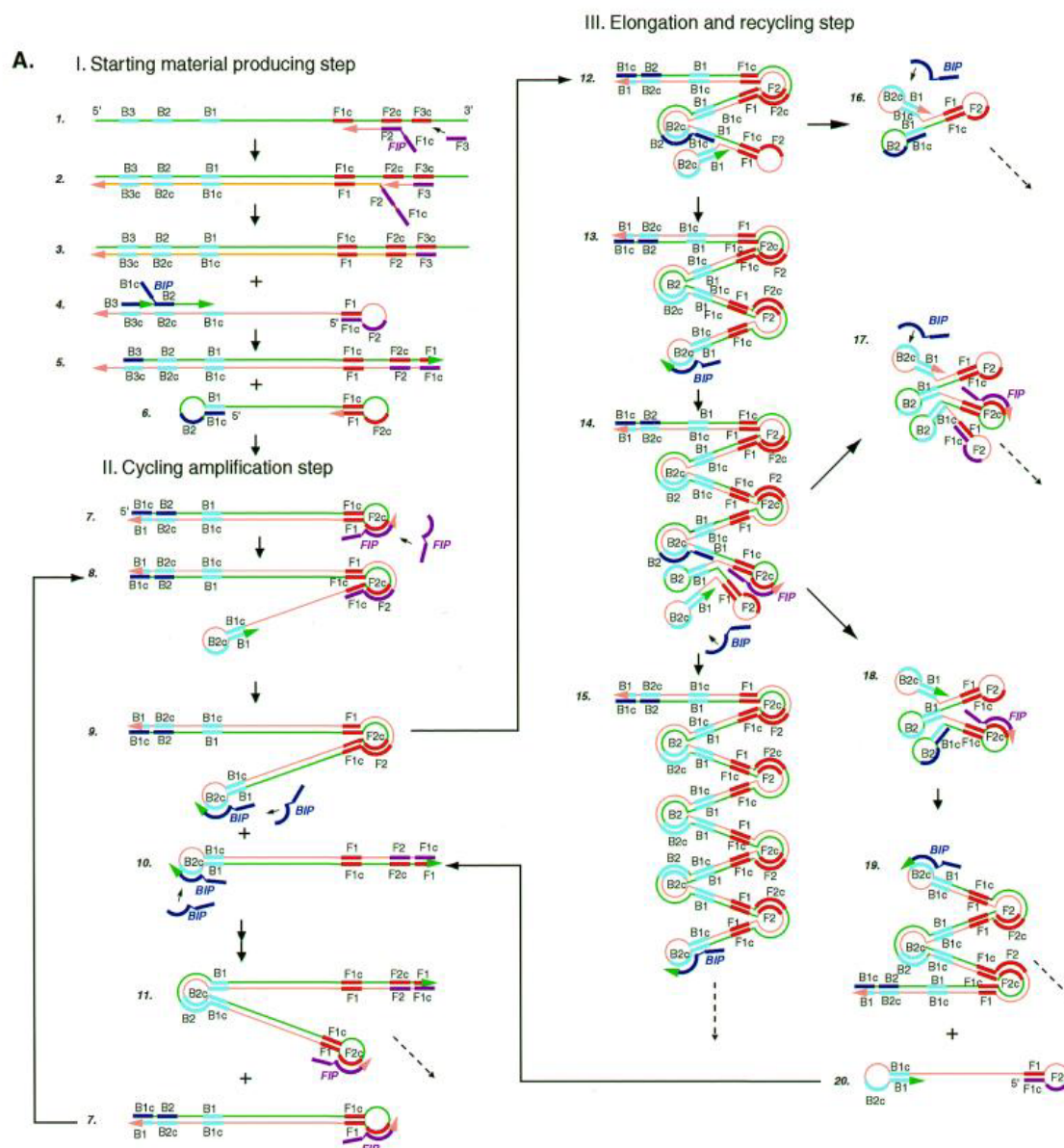
รูป 1.1. ไดอะแกรมแสดง primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP primer คู่ใน (FIP และ BIP) ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ (F2 และ F1c B2 และ B1c) ส่วน primer คู่นอกจะจำเพาะกับ F3 และ B3 ส่วนที่เป็น loop primer จะออกแบบให้อยู่ระหว่าง F1c กับ F2c และ B1c กับ B2c (20)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 1.2 (18) inner primer FIP จะจับกับตำแหน่ง F2c บน DNA เป้าหมายและเริ่มทำการสร้าง DNA คู่สม (รูป 2A) outer primer F3 จะจับกับตำแหน่ง F3c บนเส้น DNA เป้าหมายแล้วเริ่มสังเคราะห์ DNA แบบ strand replacement ปลดปล่อย FIP linked complementary strand ซึ่งจะฟอร์ม loop ที่ปลายด้านหนึ่ง DNA สายเดี่ยวเส้นนี้จะทำหน้าที่เป็น template ของ reverse primer BIP และ B3 ในการสังเคราะห์ DNA เส้นต่อไปซึ่งจะเกิดเป็น dumb-bell shape (structure 6) แล้วจึงเปลี่ยนรูปร่างเป็น stem-loop DNA (structure 7) ทั้งนี้โดย stem-loop DNA นี้จะทำหน้าที่เป็น template ในปฏิกิริยารอบต่อไป จนครบเวลา เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ส่วนผสมของ DNA รูปร่างต่างๆ คือ stem-loop

DNA DNA สายสั้นๆ ความยาวต่างๆกัน และ DNA ที่มีรูปร่างคล้ายดอกไม้มะ (cauliflower DNA) ที่มีการฟอร์ม loop หลายๆ loop ใน DNA สายเดียวกัน (รูปที่ 2 structure 16-18)

การเพิ่มจำนวน DNA โดย LAMP มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการตรวจหา DNA ที่อาจปะปนอยู่ในตัวอย่างส่งตรวจหลายข้อ ได้แก่

- Loop primer สามารถเร่งปฏิกิริยาและเพิ่มความไวของปฏิกิริยาได้ (รูปที่ 1)
- สามารถวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้แบบ real time โดยดูจากความขุ่นที่เกิด เนื่องจากระหว่างเกิดปฏิกิริยาจะมีการสร้าง magnesium pyrophosphate ซึ่งไม่ละลายน้ำ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และมีรายงานว่าความขุ่นที่เกิด สามารถนำมาใช้หาปริมาณ DNA เริ่มต้นในตัวอย่างได้ (49)
- เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนาการหา end point อย่างมีประสิทธิภาพโดย Tomita และคณะ โดยการใช้สารเรืองแสงทำให้สามารถสังเกตการเกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น (50)
- มีรายงานว่า LAMP มีความไวต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่อาจปนเปื้อนในตัวอย่างส่งตรวจจากสิ่งมีชีวิตน้อยกว่า PCR (19) และ LAMP มีความไวมากกว่า PCR (~2.2 cfu/test) (51)



รูป 1.2. กลไกการเกิด LAMP การเกิด LAMP แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนย่อยคือ initiation step cycling amplification step และ elongation step (18)

จากคุณสมบัติดังกล่าวของ LAMP ทำให้มีการพัฒนาวิธีนี้เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในอาหาร (52) โดยได้มีการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* *Legionella* *Listeria* verotoxin-produced *E. coli* และ *Campylobacter* sp. ออกจำหน่ายแล้ว ไม่เฉพาะเชื้อแบคทีเรียเท่านั้นได้มีการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสอหิวาต์จำหน่ายเช่นกัน ได้แก่ ชุดตรวจ Norovirus SARS CoV และ Influenza virus นอกจากนี้ปัจจุบันยังมีการพัฒนา LAMP เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อชนิดต่างๆ มากมาย เช่น Measles virus Mumps virus human papilloma virus

Vibrio cholerae *Mycobacterium tuberculosis* *Plasmodium falciparum* และ Human immunodeficiency virus (20)

จะเห็นได้ว่าวิธี LAMP มีข้อดีกว่าวิธีการเพิ่มจำนวนยีนแบบเดิมคือ มีความจำเพาะเจาะจงสูง มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่เร็วกว่าเนื่องจาก loop primer สามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยาได้ และสามารถสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษหรือเสียเวลาแยกผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis นอกจากนี้การที่ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปภายใต้อุณหภูมิคงที่ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler ที่มีราคาแพง ทำให้สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้าง ในห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไปเป็นประจำได้

งานวิจัยชิ้นนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้าง CTX-M9 ที่สร้างจากเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* โดยใช้เทคนิค LAMP โดยทำการออกแบบชุด primer 4 เส้น ที่จำเพาะกับยีน CTX-M9 ซึ่งจำเพาะกับ 6 ตำแหน่งบน DNA เป้าหมาย จากนั้นทำการ เพิ่มจำนวนสาย DNA ที่ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็น ladder ขนาด 226 คู่เบส แล้วทำการตรวจสอบความจำเพาะโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI* และ *TaqI* พบว่าขนาดของชิ้น DNA ที่ได้มีขนาดตรงกับที่คาดหมายจากโครงสร้างที่ 15 ของผลิตภัณฑ์ และเมื่อทดสอบความจำเพาะและความไวของวิธี LAMP เทียบกับ PCR พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อที่สร้างเอนไซม์ CTX-M9 (*bla*CTX-M9) และวิธี LAMP มีความไวต่อปริมาณของ DNA ตั้งต้นมากกว่าวิธี PCR ถึงอย่างน้อย 10,000 เท่า นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยสังเกตการเปลี่ยนของสี SYBR green I ที่เติมลงไปภายหลังก่อปฏิกิริยา โดยจะเปลี่ยนสีของ SYBR green I จากสีส้มเป็นสีเขียวเมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่จะยังคงเป็นสีส้มหากไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะสูง นอกจากนี้การที่ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปภายใต้อุณหภูมิคงที่ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler ที่มีราคาแพง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อที่สร้าง ESBL สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้าง ในห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไปเป็นประจำได้

Objective

เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาป็นที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้างอย่าง
เฉพาะเจาะจงและรวดเร็วโดยใช้เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Materials and Methods

3.1. สารเคมี

3.1.1 DNA amplification

- Deoxyribonucleotide triphosphates(dNTPs)	Roche, Germany
- 50 mM Magnesium chloride	Finnzymes, Finland
- 10x amplification buffer, Magnesium chloride-free	Finnzymes, Finland
- 10x Thermopol [®] buffer	NEB, England
- 1M Magnesium sulfate	Sigma-Aldrich, Germany
- 5M Betaine	Sigma-Aldrich, Germany

3.1.2 Culture media and antibiotics

- Agar agar	ScharlauChemie S.A., EU
- Mueller-Hinton agar (MHA)	Difco Laboratories, USA
- Mueller-Hinton broth (MHB)	Difco Laboratories, USA
- Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
- Tryptone (casein tryptic peptone)	ScharlauChemie S.A., EU
- Yeast extract	ScharlauChemie S.A., EU
- Ampicillin	USB Corporation, USA

3.1.3 Antimicrobial disk for double disk synergy tests

- Amoxycillin/calvulanic acid(20 µg/ 10 µg)	Oxoid, England
- Cefotaxime(30 µg)	Oxoid, England
- Ceftazidime(30 µg)	Oxoid, England

3.1.4 Enzymes

- Ribonuclease A	Amresco, USA
- <i>Bst</i> DNA polymerase	NEB, England
- <i>Mbol</i>	Fermentas, USA
- <i>Taq</i>	Fermentas, USA
- <i>Taq</i> DNA polymerase	Finnzymes, Finland

3.1.5 Synthetic Oligonucleotides

Oligonucleotides primers สำหรับ PCR and LAMP ในงานวิจัยนี้สังเคราะห์จาก บริษัท Bio Basic Inc. (Canada).

3.1.6 Bacterial strains

เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* รวม 35 สายพันธุ์ ที่สร้างเอนไซม์เบต้าแลคแตมเมสซินโดออกฤทธิ์กว้าง ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. สุรกิจ นาทีสุวรรณ ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เชื้อทั้ง 35 สายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลรามารับดี ระหว่างเดือนเมษายน ถึง มิถุนายน 2548 และเดือน มีนาคม 2549 โดยผ่านการพิจารณาของ Committee on Human Rights Related to Researches Involving Human Subjects ของคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามารับดี มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อวันที่ 15 กรกฎาคม 2549 เลขที่ 0609/2005 โดยแบ่งเป็นเชื้อ *E. coli* 27 สายพันธุ์ และ *K. pneumoniae* 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1)

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังใช้ *E. coli* สายพันธุ์ K12 ที่มีพลาสมิดที่ดื้อต่อ nalidixic acid (*nalA*), *Salmonella krefeld* ที่มีพลาสมิดที่ดื้อ ampicillin (*amp^R*), pGEM® T Easy vector

ที่มีพลาสมิดที่ดีคือ ampicillin (amp^R), และ pBluescript® SK vector ที่มีพลาสมิดที่ดีคือ ampicillin (amp^R)

ตาราง 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้

No.	Organism	Date collected	Ward	Specimen
1	<i>E.coli</i>	June, 05	Surgery	Wound
2	<i>E. coli</i>	June, 05	Emergency	Urine
3	<i>E. coli</i>	June, 05	Pediatric	Urine
4	<i>E. coli</i>	June, 05	Medicine	Urine
5	<i>E. coli</i>	June, 05	Emergency	Urine
6	<i>E. coli</i>	June, 05	Pediatric	Urine
7	<i>E. coli</i>	June, 05	OPD ^a Medicine	Urine
8	<i>K. pneumoniae</i>	June, 05	Medicine	Urine
10	<i>E. coli</i>	June, 05	Obstetrics	Vagina
11	<i>E. coli</i>	June, 05	OPD ^a Medicine	Urine
12	<i>K. pneumoniae</i>	June, 05	Emergency	Urine
13	<i>E. coli</i>	June, 05	Surgery	Urine
14	<i>E. coli</i>	June, 05	Medicine	Urine
15	<i>E. coli</i>	June, 05	OPD ^a Surgery	Bile
16	<i>E. coli</i>	June, 05	Orthopedics	Urine
17	<i>E. coli</i>	June, 05	Critical care	Sputum

ตาราง 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ต่อ.)

No.	Organism	Date collected	Ward	Specimen
18	<i>E. coli</i>	June, 05	Observational Medicine	Wound
19	<i>E. coli</i>	June, 05	Emergency	Urine
20	<i>K. pneumoniae</i>	June, 05	Surgery	Bile
21	<i>E. coli</i>	June, 05	OPD ^a Medicine	Urine
22	<i>K. pneumoniae</i>	June, 05	SICU ^b	Urine
23	<i>K. pneumoniae</i>	June, 05	Critical care	Gastostomy
24	<i>E. coli</i>	June, 05	Medicine	Urine
25	<i>E. coli</i>	June, 05	OPD ^a Medicine	NA ^f
26	<i>K. pneumoniae</i>	June, 05	ENT ^c	Wound
27	<i>K. pneumoniae</i>	April, 05	Medicine	Tracheal
28	<i>K. pneumoniae</i>	April, 05	ICU ^d	Leg
29	<i>E. coli</i>	April, 05	Surgery	Wound
30	<i>E. coli</i>	March, 06	Emergency	Urine
31	<i>E. coli</i>	March, 06	Emergency	Urine
32	<i>E. coli</i>	March, 06	PICU ^e	Urine
33	<i>E. coli</i>	March, 06	Medicine	Urine
34	<i>E. coli</i>	March, 06	Medicine	Urine
35	<i>E. coli</i>	March, 06	OPD ^a Medicine	Urine

^a Outpatient department, ^b Surgical intensive care unit, ^c Ear-nose-throat, ^d Intensive care unit, ^e Pediatric intensive care unit, ^f Not available.

3.2. Methods

3.2.1 Double-disk synergy method

นำเชื้อที่แยกได้มา swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MH agar แล้ววางแผ่นยา cefotaxime (30 µg) ceftazidime (30 µg) และแผ่นยาที่มีส่วนผสมของ amoxicillin/clavulanic acid (20µg/10 µg) ลงบนเชื้อโดยให้จุดศูนย์กลางของแผ่นยาทั้งสามห่างกัน 20 มิลลิเมตร. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง ทำการสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น.

3.3.2 การสกัดพลาสมิด

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ที่มี ampicillin 100 µg/ml ที่ 37°C พร้อมกับเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดโดยวิธี alkaline lysis ดังนี้

ทำการแยกเชื้อออกจากอาหารโดยการปั่น 10000xg 1 นาที ทำการ resuspend pellet ที่ได้ใน solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 and 10 mM EDTA pH 8.0) 100 µl เติม solution II (0.2 N NaOH and 1% w/v SDS) 200 µl แล้วเขย่าเบาๆ โดยการกลับหลอด เติม solution III (potassium acetate solution) 150 µl ตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform แล้วนำไปปั่นที่ 10000xg 10 นาที ตกตะกอน DNA ที่อยู่ในส่วนใสด้วย absolute ethanol แล้วจึงล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง ละลายพลาสมิดด้วย TE buffer ที่ผสม RNaseA. 1 mg/ml แล้วนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.3.3 Polymerase chain reaction (PCR)

การออกแบบ Primer

ออกแบบ primer สำหรับ PCR โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่สร้างเอนไซม์ CTX-M9 (*bla*_{CTX-M9}) โดยใช้โปรแกรม DNAsis for Windows v. 2.1 และ โปรแกรม GeneFisher (ตารางที่ 3.2)

ตาราง 3.2 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ CTX-M9 (*bla*_{CTX-M9}) โดยวิธี PCR

Primer	Annealing	Nucleotide sequence (5'→3')	Expected	Reference
	temperature (°C)		Amplicon size (bp)	(GenBank accession No.)
CTX-M-9-F	50	CGT ATT GGG AGT TTG AGA TG	539	AJ416345
CTX-M-9-R		GGT ATT CAG CGT AGG TTC		(<i>E.coli</i>)

PCR amplification

นำพลาสมิด DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 20mM Tris-HCl (pH 8.4); 50mM KCl; 0.2mM each of deoxynucleoside triphosphate; 2mM MgCl₂; 0.4μM primers of each forward and reward; 4U of *Taq* DNA polymerase และ DNA template ทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้เครื่อง GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems, CA, USA) ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ pre-heat at 94°C for 1 min, แล้วตามด้วย denaturation at 94°C 1 min, primer annealing at 50°C 30 sec, extension at 72°C 1 min จำนวน 30 รอบ และ final extension at 72°C 5

min ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100-bp DNA ladder plus™ เป็น DNA มาตรฐาน (marker)

3.3.4 การหาลำดับ DNA และการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ NucleoSpin Extract II® kit (Macherey-Nagel, Germany) ตามวิธีที่ผู้ผลิตระบุแล้วจึงหาลำดับ DNA โดยบริษัท Bio Basic Inc, Pacific Science, Thailand นำลำดับ nucleotide ที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Bioedit version 7.0.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับที่ได้กับลำดับ nucleotide ที่มีรายงานใน GenBank และ EMBL โดยโปรแกรม BLAST บน website ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3.3.5 การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ใช้ primer 4 เส้นที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งบน DNA เป้าหมาย 6 ตำแหน่ง (FIP, BIP, F3 and B3) forward inner primer (FIP) ประกอบด้วย F1C sequence, TTTT spacer และ F2 sequence ส่วน backward inner primer (BIP) ประกอบด้วย B1C sequence, TTTT spacer และ B2 sequence ในงานวิจัยนี้ทำการออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer V4 software program (<http://primerexplorer.jp/e/>) primer ที่ได้แสดงในตารางที่ 3.3

ปฏิกิริยา LAMP ประกอบด้วย 0.8 μ M each FIP and BIP, 0.2 μ M each F3 and B3, 200 μ M each dNTPs, 0.8 M betaine, 1X thermopol buffer, 2 mM $MgSO_4$, 4U *Bst* DNA polymerase. ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 60-65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis

ตาราง 3.3 Oligonucleotide LAMP primers for detection of CTX-M9 β -lactamase gene (*bla*_{CTX-M9})

Primer	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Length (mer)	Amplicon Size (bp)	Target
<i>bla</i> _{CTX-M9}			226	CTX-M9
CTX-M9 F3	GAGTGAAACGCAAAAGCAGC	20		
CTX-M9 B3	CCAGACGAAACGTCCTCATCG	20		
CTX-M9 FIP	GCCGTTGACGTGTTTTTCGGC-TTTT- CAGCCTGTCGAGATCAAGC	44, (F1C:21, TTTT F2:19)		
CTX-M9 BIP	CGCGTTGCAGTACAGCGACA-TTTT- AAAAGCCGTCACGCCTC	41, (B1C:20, TTTT B2:17)		

Figure 3.1 Position of LAMP primers on *bla_{CTX-M9}* gene. The recognition sites of primers are indicated by bold letters and the recognition sites of the *Mbol* (GATC) and *TaqI* (TCGA) restriction enzymes are underlined.

3.3.6 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จาก LAMP

3.3.6.1 ตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ 5 μ l มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose 1.5% ที่ความต่างศักย์ 100 volt 35 นาที ใน Tris-borate buffer แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบภายใต้แสง UV

3.3.6.2 ตรวจสอบโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า (naked-eye visualization)

หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดทำการเติม SYBR Green I (Cambrex Bio Science, USA) 1.0 μ l ลงในหลอดที่ทำปฏิกิริยาแล้วสังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น ถ้ามีการเพิ่มจำนวน DNA สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวภายใน 1 นาที แต่ถ้าไม่มีการเพิ่มจำนวน DNA สารละลายจะยังคงเป็นสีส้มเหมือนเดิม

3.3.7 การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะระหว่างวิธี LAMP และ PCR

ทำการเปรียบเทียบความจำเพาะของปฏิกิริยาโดยใช้เชื้อ 4 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาชนิดต่างๆ แต่ไม่มีเอนไซม์ CTX-M9 เปรียบเทียบกับเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย 2 สายพันธุ์ คือ *E. coli* (No.10) และ *E. coli* (No.12) เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มี ดังนี้ *E. coli* (K12), *Salmonella krefeld*, *E. coli* (pGEM), *E. coli* (pBluescriptSK).

เปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาโดยการทำ serial 10-fold dilutions ของ DNA template โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 3.185 μ g/ μ l แล้วเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.3.8 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก LAMP

3.3.8.1 Restriction Digestion Analysis

ทำการย่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbol* และ *TaqI* ขนาดของ DNA ที่ถูกตัดที่คำนวณจากโครงสร้างที่ 15 แสดงในตารางที่ 3.4

ตาราง 3.5 ขนาด DNA ที่คำนวณได้หลังจากทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *bla*_{CTX-M9}

LAMP amplification

Target Gene	Restriction Enzyme	Prediction Size of digested products (bp)
<i>bla</i> _{CTX-M9}	<i>Mbol</i>	168, 177 and 250
	<i>TaqI</i>	165, 193, 229, 281 and 314

3.3.8.2 Southern blot DNA-DNA hybridization

3.3.8.2.1 การเตรียม DNAs

นำ DNA ที่ได้จาก LAMP มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแล้วทำการตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 50 bp DNA ladder plus™ เป็น markers

3.3.8.2.2 Southern transfer to nylon membrane

ทำการกำจัด purine บนสาย DNA ในเจลโดยล้างด้วย 0.25 N HCl 15 นาที แล้ว denatured โดยการแช่ใน 0.5 N NaOH 30 นาที ทำการย้าย DNA จากเจลสู่ไนลอนเมมเบรนด้วยเครื่อง vacuum blotter (Bio-Rad) 90 min ล้างไนลอนเมมเบรนด้วย SSC buffer (0.15 M NaCl, 0.015 M Sodium citrate pH 7) ทั้งไว้ให้แห้ง แล้วทำการตรึง DNA ให้อยู่บนเมมเบรนด้วย UV-crosslink โดย GS-linker (Bio-Rad, CA, USA).

3.3.8.2.3 การเตรียม digoxigenin-11-dUTP-labelled DNA probe

ทำการ labeled ชิ้นส่วนของ PCR product ที่ทราบลำดับ nucleotide ของ *bla*_{CTX-M9} ด้วย digoxigenin-11-dUTP โดยวิธี random primer method (BoehringerMannhaeim, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต ตกตะกอน labeled DNA ด้วย 2 volumes of absolute ethanol และ redissolved ใน 20 µl TE buffer

3.3.8.2.4 Prehybridization and hybridization with the digoxigenin-11-

dUTP DNA probe

นำในลอนเมมเบรนที่มี DNA อยู่มาแช่ใน prehybridization solution ที่ประกอบด้วย 5X SSC, 50% (w/v) formamide, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS and 2% (w/v) blocking reagent นำไปบ่มใน prehybridization solutions 37°C 30 นาที แล้วเติม DIG labeled probe hybridization mixture ผสมให้เข้ากันโดยระวังไม่ให้เกิดฟอง แล้วทำการบ่มค้างคืน

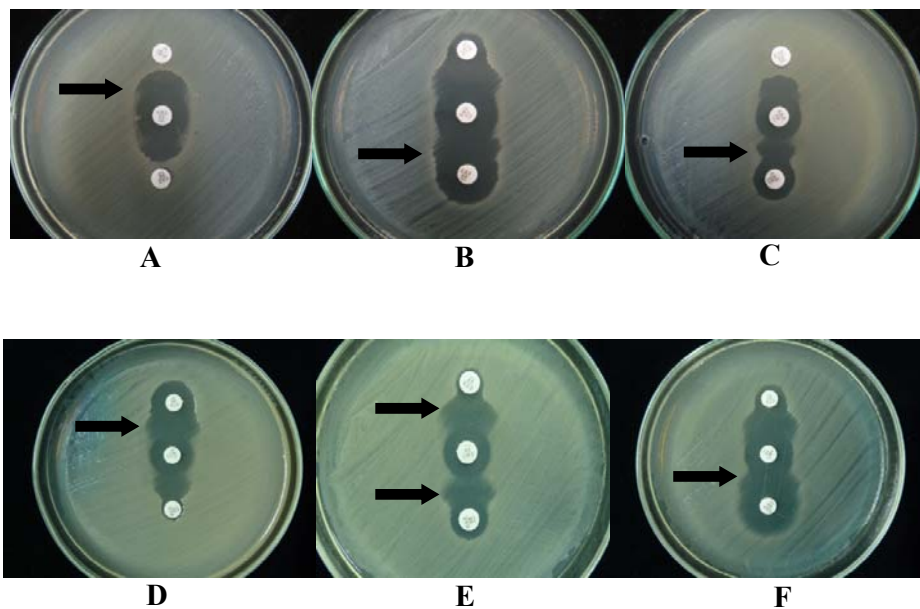
3.3.8.2.5 Detection by colorimetric method

ล้างเมมเบรนด้วย 2X SSC, 0.1% (w/v) SDS ที่อุณหภูมิห้องสองครั้ง ตามด้วย 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS 15 นาที ที่ 68°C พร้อมเขย่า แล้วล้างอีกรอบด้วย washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5 plus 0.3% (w/v) tween 20) 15 นาที แล้วบ่มเป็นเวลา 30 นาทีใน 1X blocking solution เติม diluted antibody conjugate solution (anti-DIG) 20 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเมมเบรนด้วย washing buffer สองครั้ง แล้วทำการ equilibrated ใน detection buffer 20 ml (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50mM MgCl₂ pH 9.5) เติมสารก่อก่อกสีที่เตรียมใหม่ ๆ (45 µl of nitrobluetetrazoliumsalt (NBT) and 35 µl of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate) solution in 10 ml of detection buffer) แล้วทำการบ่มในที่มืด 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดสี หยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการแช่ในน้ำ 50 ml

Results

4.1. ยืนยันการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้างของ เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยวิธี double disc synergy test

นำเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* รวม 35 สายพันธุ์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาทำการตรวจสอบเบื้องต้นว่ามีการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้างจริงด้วยวิธี double disc synergy test ซึ่งทำโดยใช้ disc ที่มียา cefotaxime หรือ ceftazidime ปริมาณ 30 ไมโครกรัม วางห่างจาก disc ที่มียา amoxicillin 30 ไมโครกรัมและclavulanic acid 20 ไมโครกรัม โดยให้มีระยะห่างวัดจากศูนย์กลางแผ่นยาทั้งสอง 20 มิลลิเมตรแล้วสังเกตดูขนาด inhibition zone ที่เกิดขึ้น โดย inhibition zone รอบๆแผ่นยา cefotaxime (CTX) หรือ ceftazidime (CAZ) จะมีขนาดลดลง แต่รอบแผ่นยาที่มี clavulanate จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีรูปร่างคล้าย champagne cork หรือ keyhole ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อทั้ง 35 สายพันธุ์ให้ผลบวกต่อการทดสอบนี้แสดงว่ามีการสร้าง ESBLs จริง

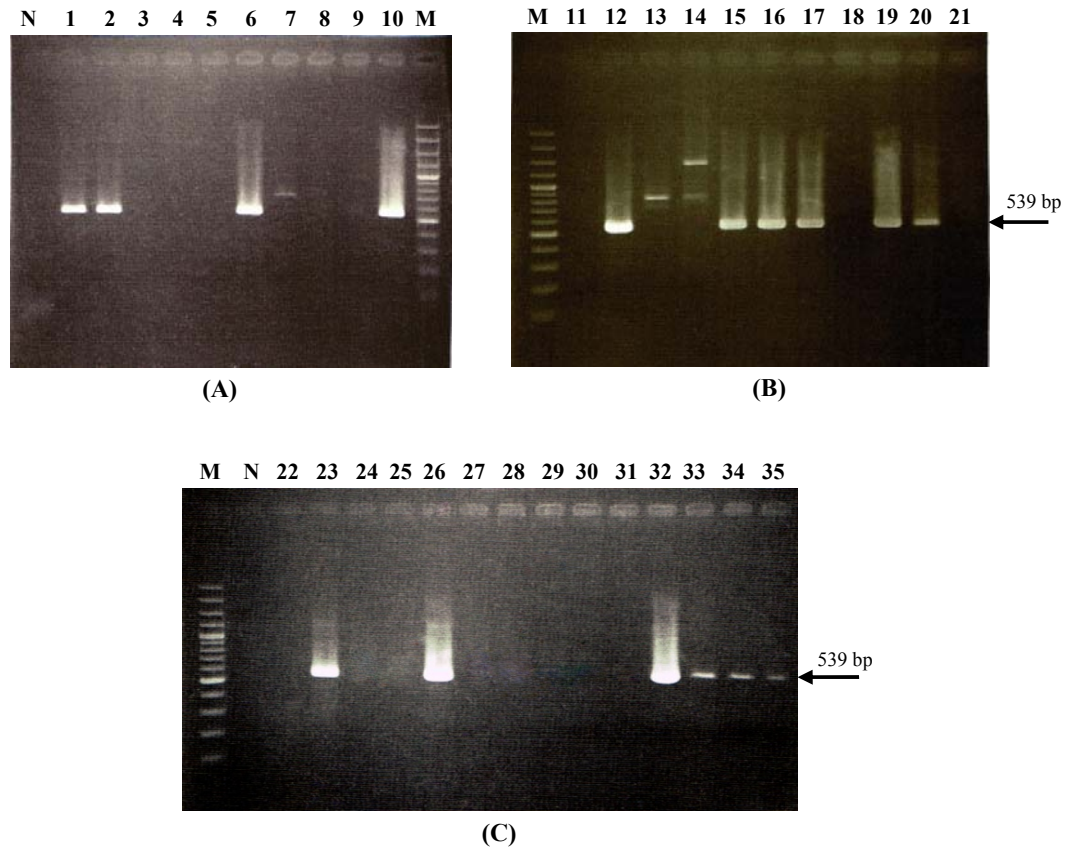


รูป 4.1 A positive double-disc synergy test as described in chapter II. Synergy between cefotaxime (CTX) or ceftazidime (CAZ) and amoxicillin-clavulanate (AMC) is indicated by arrows. (A) *E. coli* (No.11) CTX-M1. (B) *E. coli* (No.13) TEM. (C) *E. coli* (No.14) TEM. (D) *E. coli* (No.21) CTX-M1. (E) *E. coli* (33) CTX-M9. (F) *S. enterica* serovar Typhimurium CTX-M1 (Positive control).

จากผลการทดลองนี้แสดงว่าวิธี double disk synergy test สามารถใช้ทดสอบเบื้องต้นได้ว่าเชื้อที่แยกได้มีการสร้างเอนไซม์ ESBLs หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกชนิดของ ESBLs ที่เชื้อสร้างขึ้นได้

4.2. ยืนยันการสร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้างของ เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

นำเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์มาทำการตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M9 (*bla*_{CTX-M9}) เนื่องจากยีนที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* จะอยู่บนพลาสมิด จึงทำการสกัดพลาสมิดโดยวิธี alkaline lysis ก่อน แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจหายีน *bla*_{CTX-M9} ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธีนี้จะมีขนาดสั้น DNA ยาว 539 คู่เบส จากการตรวจสอบโดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *bla*_{CTX-M9} พบว่าเชื้อ 16 จาก 35 สายพันธุ์มียีน *bla*_{CTX-M9} ได้แก่เชื้อ หมายเลข 1 2 6 10 12 15 16 17 19 20 23 26 32 33 34 และ 35 โดยพบใน *E. coli* ร้อยละ 44.44 (12 จาก 27 สายพันธุ์) และพบใน *K. pneumoniae* ร้อยละ 62.5 (5 จาก 8 สายพันธุ์) ผลของวิธี PCR ในการตรวจสอบยีน *bla*_{CTX-M9} แสดงในรูปที่ 4.2 และ ตารางที่ 4.1



ပုံ ၄.၂ The PCR amplification result of *bla*_{CTX-M9} group gene.

(A) The sample number 1-10, lane 1 is negative control, lane 2-11 are the sample number 1-10, respectively, lane M is 100 bp DNA ladder plus.

(B) The sample number 11-21, lane M is 100 bp DNA ladder plus, lane 1-11 are the sample number 11-21, respectively.

(C) The sample number 22-35, lane M is 100 bp DNA ladder plus, lane 1 is negative control, lane 2-15 are the sample number 22-35, respectively.

ตาราง 4.1 ผลการตรวจหา ยีน bla_{CTX-M9} ด้วยวิธี PCR

No.	Organisms	bla_{CTX-M9}	No.	Organisms	bla_{CTX-M9}
1	<i>E. coli</i>	+	19	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	20	<i>K. pneumoniae</i>	+
3	<i>E. coli</i>	-	21	<i>E. coli</i>	-
4	<i>E. coli</i>	-	22	<i>K. pneumoniae</i>	-
5	<i>E. coli</i>	-	23	<i>K. pneumoniae</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	24	<i>E. coli</i>	-
7	<i>E. coli</i>	-	25	<i>E. coli</i>	-
8	<i>K. pneumoniae</i>	-	26	<i>K. pneumoniae</i>	+
9	<i>E. coli</i>	-	27	<i>K. pneumoniae</i>	-
10	<i>E. coli</i>	+	28	<i>K. pneumoniae</i>	-
11	<i>E. coli</i>	-	29	<i>E. coli</i>	-
12	<i>K. pneumoniae</i>	+	30	<i>E. coli</i>	-
13	<i>E. coli</i>	-	31	<i>E. coli</i>	-
14	<i>E. coli</i>	-	32	<i>E. coli</i>	+
15	<i>E. coli</i>	+	33	<i>E. coli</i>	+
16	<i>E. coli</i>	+	34	<i>E. coli</i>	+
17	<i>E. coli</i>	+	35	<i>E. coli</i>	+
18	<i>E. coli</i>	-			

+ = product of bla_{CTX-M9} ; - = no product of bla_{CTX-M9}

4.3. การวิเคราะห์ลำดับ nucleotide

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตรวจสอบโดยวิธี PCR มาทำการเปรียบเทียบกับยีนที่สร้าง ESBLs ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม basic local alignment search tool (BLAST) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR มีความเหมือนกับยีนที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม CTX-M9 ถึงร้อยละ 99 ผลการเปรียบเทียบบางตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4.2

ตาราง 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับ nucleotide ของเชื้อตัวอย่างหมายเลข 6

GenBank					
accession No.	Source	Length	Score	Identity%	E0
KC121029.1	<i>Proteus mirabilis</i> strain A12 beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M-14) gene, complete cds	875	854	99	0.0
JX896165.1	<i>Escherichia coli</i> strain 226588X beta-lactamase CTX-M-134 (blaCTX-M-134) gene, complete cds	876	854	99	0.0
JX268672.1	<i>Escherichia coli</i> strain AKH11/14 beta-lactamase CTX-M-27 (CTX- M-27) gene, partial cds	852	854	99	0.0
JX268671.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain AKH11/7 beta-lactamase CTX-M- 38 (CTX-M-38) gene, partial cds	852	854	99	0.0
EU418918.1	<i>Escherichia coli</i> isolate JIE 216 CTX-M-24 extended-spectrum beta-lactamase (blaCTX-M-24e) gene, complete cds	875	854	99	0.0
FJ214367.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica serovar Derby strain s1266 extended spectrum CTX- M-84 beta-lactamase gene, complete cds	876	854	99	0.0

4.4 การตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase โดยวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

4.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบ

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี LAMP ผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ในปฏิกิริยา ดังนี้

4.4.1.1 ผลของความเข้มข้นของ Mg^{2+}

ความเข้มข้นของ Mg^{2+} อิสระในปฏิกิริยามีผลต่อการจับของ primer และการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ถึง 6 mM โดยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 63°C 60 นาที พบว่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ที่มีลักษณะเป็น ladder เกิดขึ้นที่ความเข้มข้น 0.5 mM โดยแถบของผลิตภัณฑ์จะมีความเข้มที่มากที่สุดที่ความเข้มข้น 1 mM แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น Mg^{2+} ถึง 2 mM พบว่าผลิตภัณฑ์มีปริมาณลดลงจนถึงไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดลอง คือ 6 mM ดังนั้นความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่ 1 mM จึงจัดเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และความเข้มข้นนี้ถูกใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

4.4.1.2 ผลของอุณหภูมิ

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 65°C แต่มีรายงานว่าสามารถทำงานที่อุณหภูมิต่ำกว่านั้นได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิตั้งแต่ 60°C ถึง 65°C โดยใช้ความเข้มข้นของ Mg^{2+} 1 mM เป็นเวลา 60 นาที พบว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่ทดสอบคือ 60°C ก็สามารถพบการเพิ่มจำนวนของ DNA ได้โดยความเข้มของแถบ DNA จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 61°C หลังจากนั้น ความเข้มของผลิตภัณฑ์จะไม่สามารถสังเกตความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่า แต่ที่อุณหภูมิ 63°C พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ DNA แบบไม่เฉพาะเจาะจงน้อยที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกอุณหภูมิ 63°C เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.1.3 ผลของเวลา

โดยทั่วไปการเกิดปฏิกิริยา LAMP สามารถสังเกตเห็นได้ใน 30 – 60 นาที ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่ 30 – 60 นาที โดยใช้ความเข้มข้น Mg^{2+} 1 mM ที่อุณหภูมิ 63°C จากผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 30 และ 40 นาที ไม่พบการเพิ่ม

จำนวนของ DNA เป้าหมาย แต่จะสามารถพบแถบ DNA ได้เมื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 60 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.5

จากผลของพารามิเตอร์ทั้ง 3 ต่อการเกิดปฏิกิริยา LAMP พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับงานวิจัยนี้คือ Mg^{2+} ที่ 1 mM อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 60 นาทีและได้ใช้สภาวะนี้ในการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M9} จากเชื้อตัวอย่างทุกสายพันธุ์ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็น ladder ขนาด 226 คู่เบส ผลการตรวจหายีน *bla*_{CTX-M9} ด้วยวิธี LAMP แสดงในรูปที่ 4.6 และตารางที่ 3

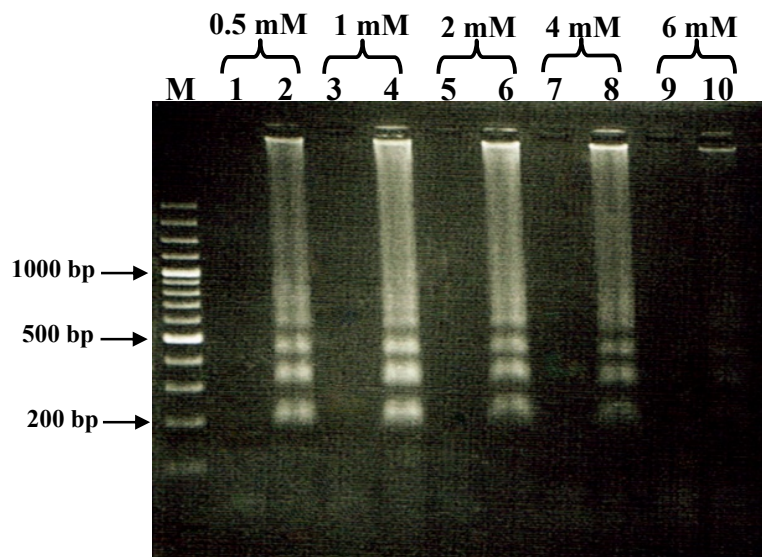


Figure 4.3 DNA patterns of the LAMP products for detection of *bla*_{CTX-M9} gene from *E. coli*, presents *bla*_{CTX-M9} gene in PCR, amplified at various Mg^{2+} concentrations. Negative control is nuclease free water.

Lane M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus marker

Lane 1 : Negative control amplified at 0.5 mM Mg^{2+} concentration

Lane 2 : *E. coli* amplified at 0.5 mM Mg^{2+} concentration

Lane 3 : Negative control amplified at 1.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 4 : *E. coli* amplified at 1.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 5 : Negative control amplified at 2.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 6 : *E. coli* amplified at 2.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 7 : Negative control amplified at 4.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 8 : *E. coli* amplified at 4.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 9 : Negative control amplified at 6.0 mM Mg^{2+} concentration

Lane 10: *E. coli* amplified at 6.0 mM Mg^{2+} concentration

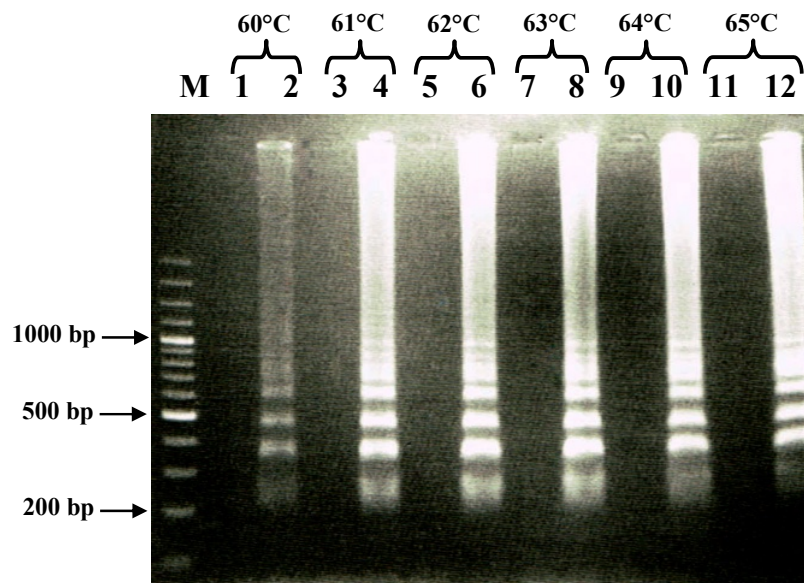


Figure 4.4 DNA patterns of the LAMP products for detection of *bla*_{CTX-M9} gene from *E. coli*, presents *bla*_{CTX-M9} gene in PCR, amplified at various temperatures. Negative control is nuclease free water.

Lane M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus marker

Lane 1 : Negative control amplified at 60°C

Lane 2 : *E. coli* amplified at 60°C

Lane 3 : Negative control amplified at 61°C

Lane 4 : *E. coli* amplified at 61°C

Lane 5 : Negative control amplified at 62°C

Lane 6 : *E. coli* amplified at 62°C

Lane 7 : Negative control amplified at 63°C

Lane 8 : *E. coli* amplified at 63°C

Lane 9 : Negative control amplified at 64°C

Lane 10: *E. coli* amplified at 64°C

Lane 11: Negative control amplified at 65°C

Lane 12: *E. coli* amplified at 65°C

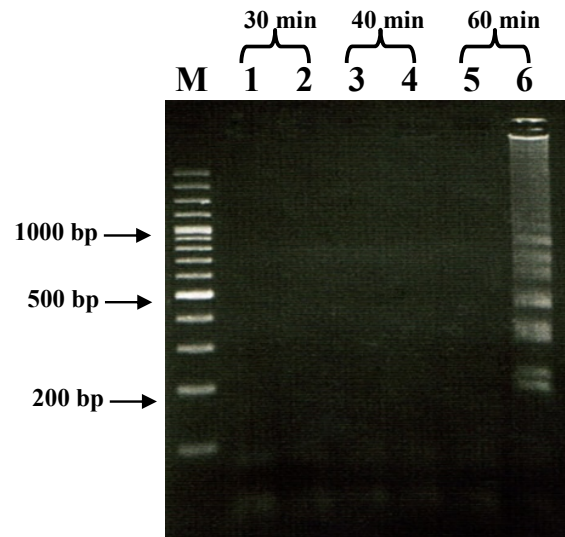


Figure 4.5 DNA patterns of the LAMP products for detection of *bla*_{CTX-M9} gene from *E. coli*, presents *bla*_{CTX-M9} gene in PCR, amplified at various times. Negative control is nuclease free water.

Lane M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus marker

Lane 1: Negative control amplified at 30 min

Lane 2: *E. coli* amplified at 30 min

Lane 3: Negative control amplified at 40 min

Lane 4: *E. coli* amplified at 40 min

Lane 5: Negative control amplified at 60 min

Lane 6: *E. coli* amplified at 60 min

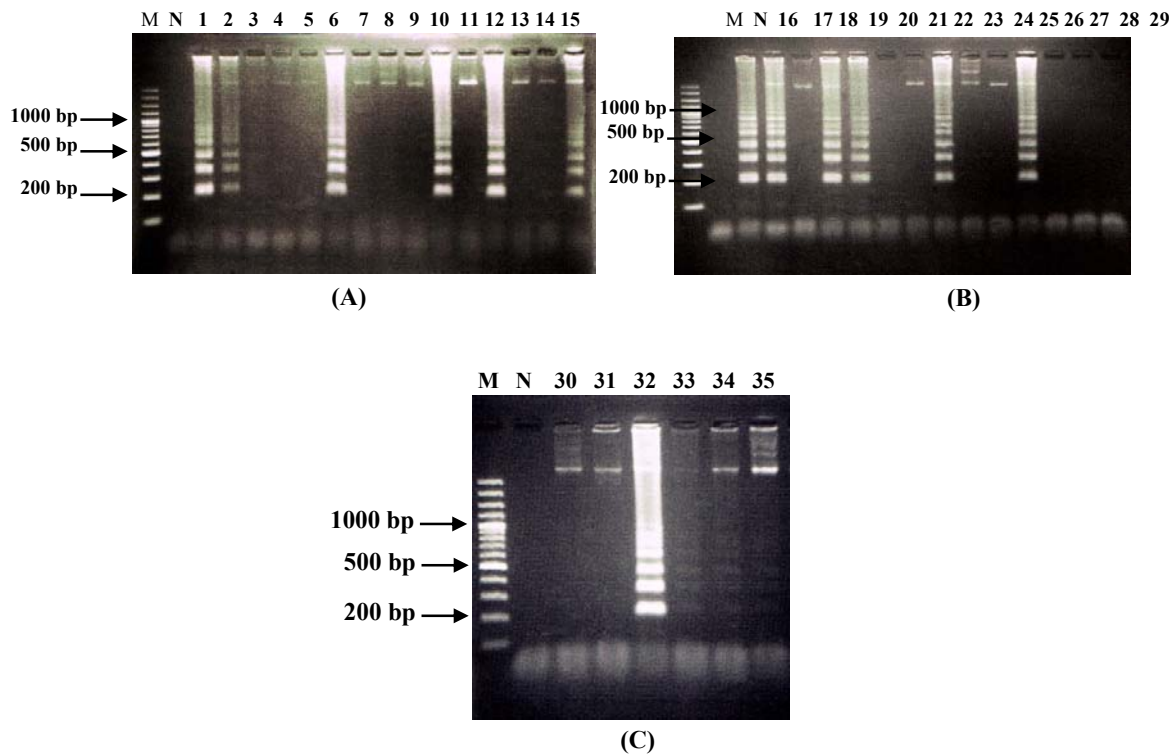


Figure 4.6 The result of LAMP amplification of *bla*_{CTX-M9} gene. The LAMP reaction was carried out at optimal condition obtained from previous experiment, 1 mM Mg^{2+} , 63°C for 60 min.

(A) The sample number 1-15, lane M is 100 bp DNA ladder plus, lane 1 is negative control, lane 2-16 are the sample 1-15, respectively.

(B) The sample number 16-29, lane M is 100 bp DNA ladder plus, lane 1 is negative control, lane 2-15 are the sample number 16-29, respectively.

(C) The sample number 30-35, lane M is 100 bp DNA ladder plus, lane 1 is negative control, lane 2-7 are the sample number 30-35, respectively.

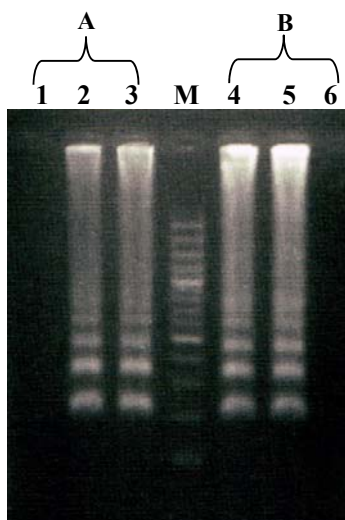
ตาราง 4.3 ผลการตรวจสอบยีน *bla*_{CTX-M9} โดยวิธี LAMP

No.	Organisms	<i>bla</i> _{CTX-M9}	No.	Organisms	<i>bla</i> _{CTX-M9}
1	<i>E. coli</i>	+	19	<i>E. coli</i>	+
2	<i>E. coli</i>	+	20	<i>K. pneumoniae</i>	+
3	<i>E. coli</i>	-	21	<i>E. coli</i>	-
4	<i>E. coli</i>	-	22	<i>K. pneumoniae</i>	-
5	<i>E. coli</i>	-	23	<i>K. pneumoniae</i>	+
6	<i>E. coli</i>	+	24	<i>E. coli</i>	-
7	<i>E. coli</i>	-	25	<i>E. coli</i>	-
8	<i>K. pneumoniae</i>	-	26	<i>K. pneumoniae</i>	+
9	<i>E. coli</i>	-	27	<i>K. pneumoniae</i>	-
10	<i>E. coli</i>	+	28	<i>K. pneumoniae</i>	-
11	<i>E. coli</i>	-	29	<i>E. coli</i>	-
12	<i>K. pneumoniae</i>	+	30	<i>E. coli</i>	-
13	<i>E. coli</i>	-	31	<i>E. coli</i>	-
14	<i>E. coli</i>	-	32	<i>E. coli</i>	+
15	<i>E. coli</i>	+	33	<i>E. coli</i>	+
16	<i>E. coli</i>	+	34	<i>E. coli</i>	+
17	<i>E. coli</i>	+	35	<i>E. coli</i>	+
18	<i>E. coli</i>	-			

+ = product of *bla*_{CTX-M9}; - = no product of *bla*_{CTX-M9}

4.4.2 การตรวจหายีน *bla*_{CTX-M9} gene ด้วยวิธี LAMP โดยใช้ thermal cycling equipment เปรียบเทียบกับ conventional water bath

วิธี LAMP ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาโดยมีจุดมุ่งหมายที่จะนำไปใช้งานในประเทศกำลังพัฒนาเนื่องจากการใช้เพียงแค่ conventional water bath ก็สามารถเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายได้ (Mori et al., 2001; Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบผลของการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายด้วย thermal cycling equipment กับ conventional water bath ในการศึกษานี้ใช้ *E. coli* No.6 และ No.10 ซึ่งมียีน *bla*_{CTX-M9} อยู่ (จากการตรวจสอบโดย PCR) เป็นตัวเปรียบเทียบโดยใช้สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาเหมือนกัน คือ Mg^{2+} 1 mM 63°C เป็นเวลา 60 นาที พบว่าการใช้ conventional water bath ให้ผลเช่นเดียวกับ thermal cycling equipment ดังรูป 4.7



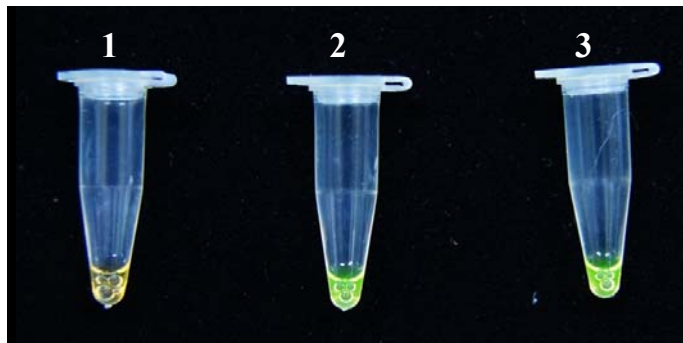
รูป 4.7 The result of LAMP amplification of *bla*_{CTX-M9} gene using conventional water bath and thermal cycling equipment.

(A) The LAMP amplification using conventional water bath, lane 1 is negative control, lane 2 and 3 are the sample of number 6 and 10, respectively which produced *bla*_{CTX-M9}. Lane M is 100 bp DNA ladder plus.

(B) The LAMP amplification using thermal cycling equipment, lane 4 and 5 are the sample of number 6 and 10, respectively which produced *bla*_{CTX-M9}, lane 6 is negative control.

4.4.3 การตรวจผลของ LAMP โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

สี SYBR Green I ซึ่งเป็นสีที่เข้าไปแทรกกระหว่างสาย DNA ทำให้เกิด DNA-dye-complex สามารถดูดซับแสงสีน้ำเงินและปล่อยแสงสีเขียวออกมา เป็นสีที่ใช้ในการตรวจการเพิ่มจำนวนของ DNA กันอย่างแพร่หลาย ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ SYBR Green I เพื่อยืนยันการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมายโดย LAMP โดยการเติมสารละลาย SYBR Green I ลงในปฏิกิริยาหลังหยุดปฏิกิริยาแล้ว พบว่าถ้ามีการเพิ่มจำนวน DNA สารละลายจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวและเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต แต่ถ้าไม่มีการเพิ่มจำนวน DNA สารละลายยังคงมีสีส้มเหมือนเดิม ผลของการทดลองแสดงในรูปที่ 4.8



รูป 4.8 Visual inspection of LAMP products detected using SYBR Green I. The CTX-M9 primers were used for this assay.

- (1) Negative control (nuclease free water) is orange color
- (2) *E. coli* (No.6) is green color as a positive
- (3) *E. coli* (No.10) is green color as a positive

4.4.4 การเปรียบเทียบความจำเพาะ (specificity) และ ความไว (sensitivity)

ระหว่าง LAMP กับ PCR

E. coli No.6 ซึ่งให้ผลบวกในการตรวจทั้ง 2 วิธี ได้ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธีตรวจสอบทั้ง 2 วิธี

4.4.4.1 เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบยีน *bla*_{CTX-M9} gene ใน ESBL producing *E. coli* (No.6) โดย LAMP และ PCR detection

ทำการเปรียบเทียบความไวของวิธีตรวจสอบโดยการเตรียม serial 10-fold dilution ของพลาสมิด DNA โดยใช้ความเข้มข้น 10^{-5} ng/μl ถึง 10^3 ng/μl แล้วนำไปทำปฏิกิริยา พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจพบแถบ DNA ขนาด 539 คู่เบสของยีน *bla*_{CTX-M9} ได้ที่ความเข้มข้น 10^3 ng/μl ถึง 10^{-1} ng/μl (รูปที่ 4.9A) ขณะที่แถบ DNA ลักษณะเป็น ladder ความยาว 226 คู่เบส สามารถพบได้ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ (10^3 ng/μl to 10^{-5} ng/μl) ดังรูปที่ 4.9B จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าวิธี LAMP มีความไวในการตรวจสอบยีน *bla*_{CTX-M9} มากกว่า PCR อย่างน้อย 10000 เท่า (ตาราง 4.4)

ตาราง 4.4 Comparison the sensitivity of LAMP and PCR for *bla*_{CTX-M9} gene detection of *E. coli* (No.6)

Amplification method	Plasmid concentration (ng/μl)
	<i>bla</i> _{CTX-M9}
LAMP	10^{-5}
PCR	10^{-1}

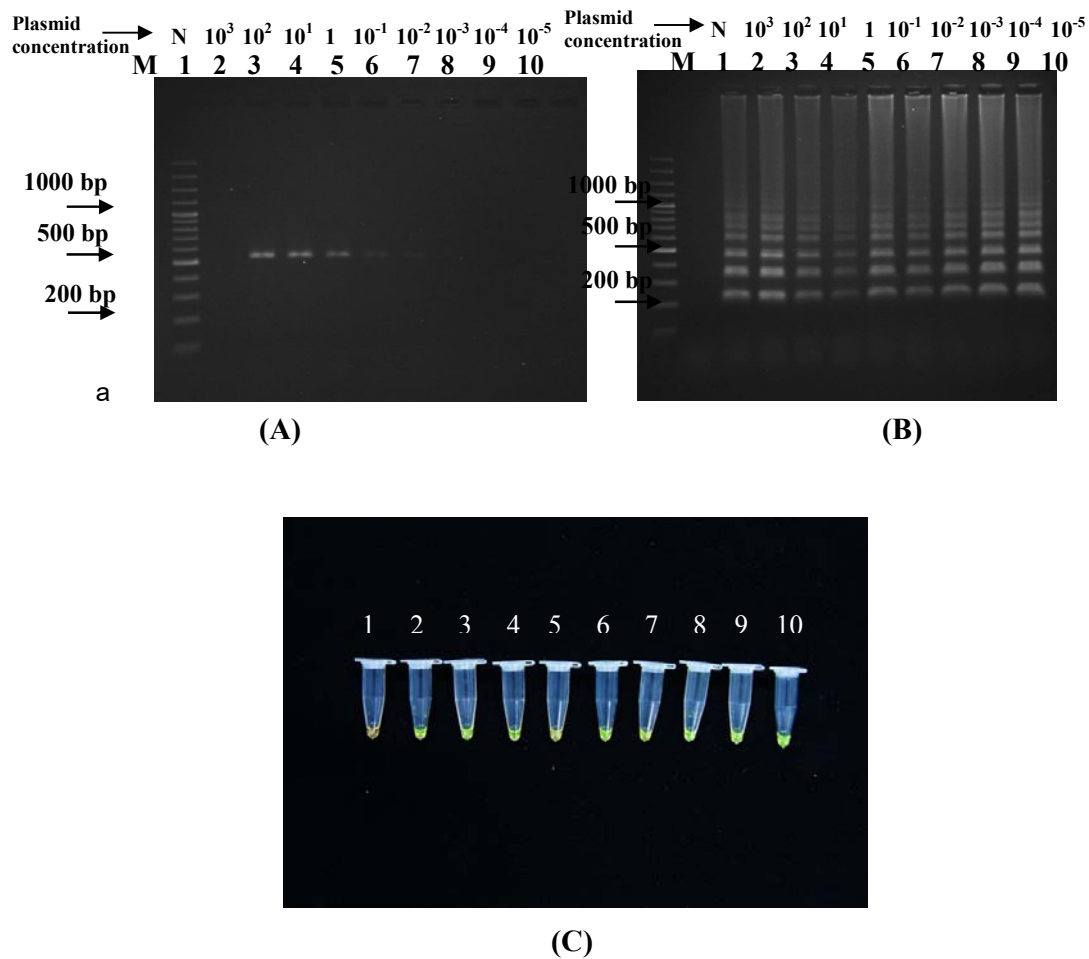


Figure 4.9 Comparison of sensitivity between PCR method (A) and LAMP method (B) for detection *bla*_{CTX-M9} gene of *E. coli* (No.6). The color change (orange color: negative control; green color: positive) after addition of SYBR Green I (C).

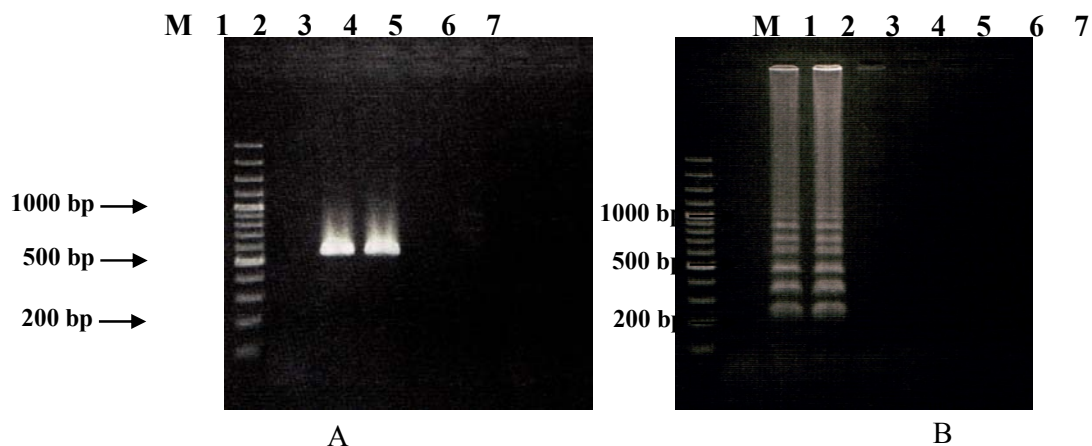
Lane M : 100 bp DNA Ladder plus marker,

Lane 1 : Negative control (nuclease free water)

Lane 2-10: *E. coli* (No.6), serial dilutions at 10^3 ng/μl to 10^{-5} ng/μl, respectively.

4.4.4.2 เปรียบเทียบความจำเพาะในการตรวจสอบยีน *bla*_{CTX-M9} gene ใน ESBP producing *E. coli* (No.6) โดย LAMP และ PCR detection

ในการเปรียบเทียบความจำเพาะทำได้โดยใช้ prime ของปฏิกิริยา LAMP และ PCR ไปใช้เพิ่มจำนวนยีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *bla*_{CTX-M9} ได้แก่ *E. coli* (No.10 represent positive strain), *E. coli* (No.12 represent positive strain), *E. coli* strain K12 มีพลาสมิดที่ดื้อต่อ nalidixic, *Salmonella krefeld* มีพลาสมิดที่ดื้อต่อ ampicillin, pGEM[®] T Easy vector มีพลาสมิดที่ดื้อต่อ ampicillin, และ pBluescript[®] SK vector มีพลาสมิดที่ดื้อต่อ ampicillin พบว่าการทดสอบโดยใช้ primer สำหรับ LAMP สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้เฉพาะ *E. coli* (No.10) และ *E. coli* (No.12) แต่ไม่เพิ่มจำนวนยีนอื่นๆ (รูป 4.10B) ส่วน primer สำหรับ PCR ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน แต่ในตัวอย่าง *S. Krefeld* ซึ่งมียีนที่ดื้อต่อ ampicillin พบการจับกันแบบไม่เฉพาะเจาะจงซึ่งเป็นปัญหาที่พบบ่อยใน PCR (รูป 4.10A) สามารถสรุปได้ว่า prime สำหรับ LAMP มีความจำเพาะต่อ DNA เป้าหมายมากกว่า PCR



รูป 4.10 Comparison of specificity between PCR method (A) and LAMP method (B) for detection *bla*_{CTX-M9} gene

Lane M: 100 bp DNA Ladder plus marker

Lane 1: Negative control (nuclease free water)

Lane 2: *E. coli* (No.10 represent positive strain)

Lane 3: *E. coli* (No.12 represent positive strain)

Lane 4: *E. coli* strain K12 plasmid containing nalidixic resistance gene

Lane 5: *Salmonella Krefeld* plasmid containing ampicillin resistance gene

Lane 6: pGEM[®] T Easy vector containing ampicillin resistance gene

Lane 7: pBluescript[®] SK vector containing ampicillin resistance gene

4.4.5 การวิเคราะห์ LAMP products

4.4.5.1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพื่อยืนยันผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาว่าเป็นผลผลิตจาก DNA ที่ต้องการจริง จึงทำการย่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม แล้วทำการดูผลด้วย agarose gel electrophoresis โดยคำนวณขนาดของเส้น DNA ที่ถูกย่อยจากโครงสร้างที่ 15 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ที่สุดของปฏิกิริยา พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *MboI* และ *TaqI* มีขนาดใกล้เคียงกับที่คำนวณได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 โดยจะพบแถบ DNA ขนาด 168 177 และ 250 คู่เบส เมื่อย่อยด้วย *MboI* และขนาด 165 193 229 281 และ 314 เมื่อย่อยด้วย *TaqI*. (รูปที่ 4.12)

```

                F3                      F2 TaqI MboI
251 5'- TTAAGCA GAG TGAACGCAA AAGCAGC TGC TTAAT CAGCC TGTCCGAGATC AAGC TGCCG ATCTGGTTAA CTACAATCCG -3'
      3'- aattcgtctc actttgcgtt ttcg tcgag aattagtcgg aaact ttaq ttcggacggc tagaccaatt gatgttaggc -5'
                TaqI

                B1C
331 5'- ATTGCCGAAA AACACGTCAA CGGCACAATG ACGCTGGCAG AGCTGAGCGC GGC CGCGTTG CAGTACAGCG ACA ATACCGC -3'
      3'- taacggcgtt ttgtgcagtt gccg tgttac tgcgaccgtc tcga tcgcg ccggcgcaac gtcattgtcgc tgttatggcg -5'
                F1C                      TaqI MboI

411 5'- CATGAACAAA TTGATTGCCC AGCTCGGTGG CCCGGGAGGC GTGACGGCTT TTGCCCGCGC GATC GGCAT GAGACGTTTC -3'
      3'- gtacttgttt aactaacggg tcga ccacc gggcc tccg cactgccgaa aacgggcgcg ctagcc gcta ctctgcaaag -5'
                TaqI B2                      B3

491 5'- GTCTGGATCG -3'
      3'- cagacc tagc -5'

```

รูป 4.11 The nucleotide sequence of the sense and anti-sense strand of *bla*_{CTX-M9} gene was shown. DNA sequences used for primer design are shown by black boxes. The restriction site for *MboI* and *TaqI* are indicated by blue box and red box, respectively.

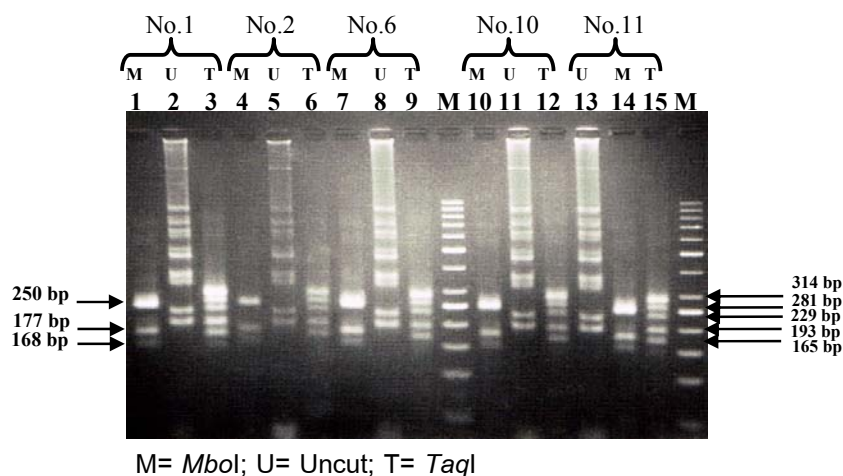


Figure 4.12 Restriction digestion analysis of the LAMP product, the digestion product was electrophoresed in 2% agarose gel.

Lane 1: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 1.) LAMP product

Lane 2: *E. coli* (No 1.) LAMP product

Lane 3: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 1.) LAMP product

Lane 4: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 2.) LAMP product

Lane 5: *E. coli* (No 2.) LAMP product

Lane 6: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 2.) LAMP product

Lane 7: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 6.) LAMP product

Lane 8: *E. coli* (No 6.) LAMP product

Lane 9: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 6.) LAMP product

Lane M: 50-bp DNA ladder marker

Lane 10: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 10.) LAMP product

Lane 11: *E. coli* (No 10.) LAMP product

Lane 12: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 10.) LAMP product

Lane 13: *E. coli* (No 12.) LAMP product

Lane 14: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 12.) LAMP product

Lane 15: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 12.) LAMP product

Lane M: 50-bp DNA ladder marker

4.4.5.2 Southern blot DNA-DNA hybridization

เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะว่าตรงกับยีนที่ต้องการตรวจสอบจริง ผู้วิจัยจึงทำการยืนยันด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ PCR product ของ *E. coli* (No.11) ที่มียีน *bla*_{CTX-M9} เป็น hybridization DNA probe (รูปที่ 4.13) ผลิตภัณฑ์จาก LAMP ของ *E. coli* No.1, 2 and 6 หลังจากย่อยด้วย *Mbol* and *TaqI* ทำการ probe กับ probe ที่ label ด้วย digoxigenin-11-dUTP ผลที่ได้พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นผลผลิตจากยีน *bla*_{CTX-M9} ซึ่งเป็น DNA เป้าหมายจริงๆ (รูปที่ 4.14)

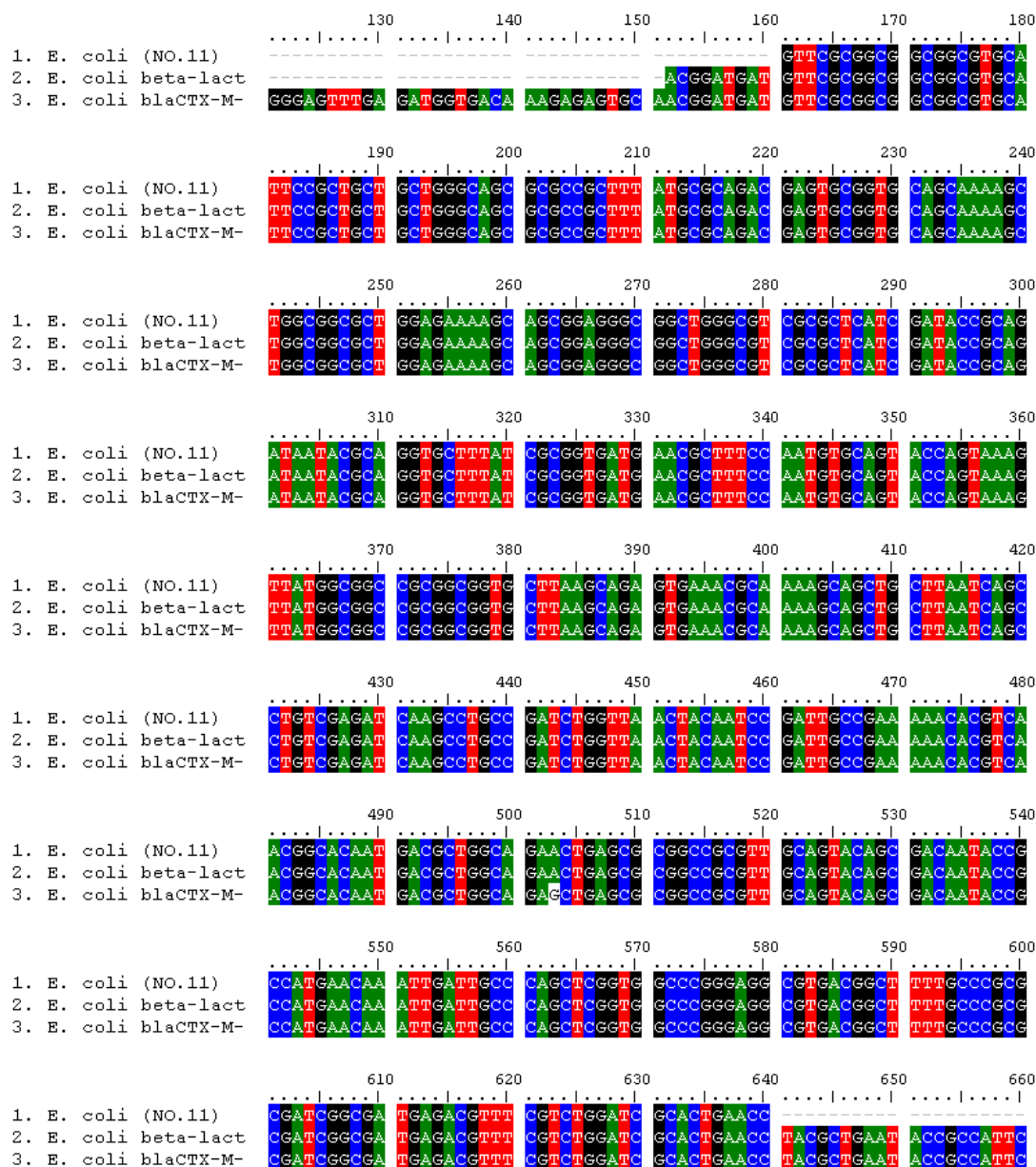


Figure 4.13 The PCR product sequencing result of *E. coli* (No.10) and the alignment of nucleotide sequence of *E. coli* (No.10) was compared with the other strain of bacteria. (1) The PCR product of *E. coli* (No.10) has been presented the *bla*_{CTX-M9} gene by PCR sequencing; (2) *E. coli* which was obtained GenBank database has been presented the *bla*_{CTX-M14} gene; (3) *E. coli* which was obtained GenBank database has been presented the *bla*_{CTX-M9} gene.

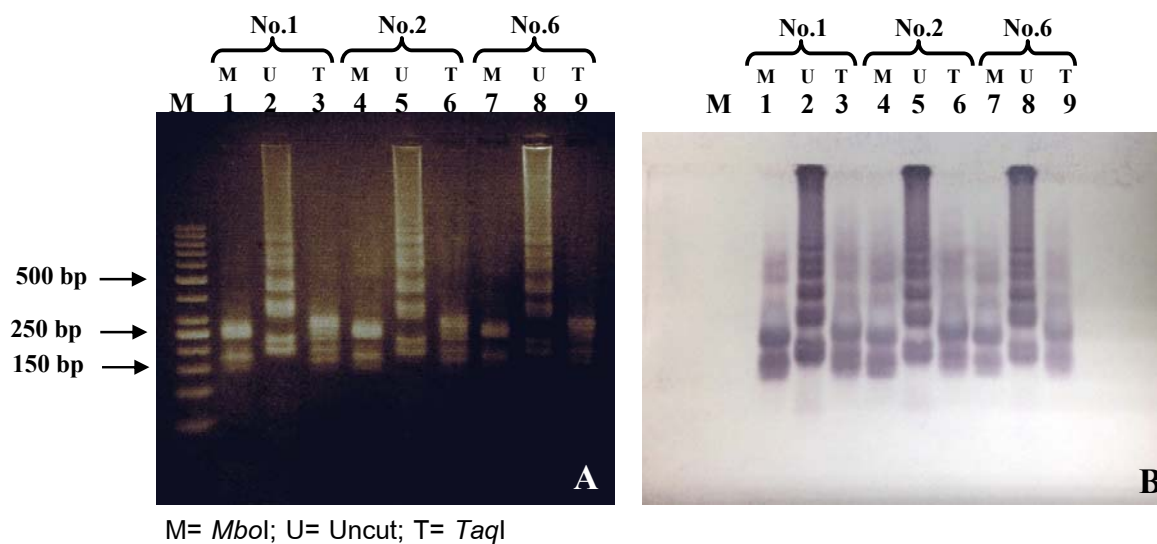


Figure 4.14 The Southern blot analysis of restriction digestion of the LAMP product, the digestion product was electrophoresed in 2% agarose gel.

A: Agarose gel electrophoresis patterns of restriction enzyme digestion

Lane M: 50-bp DNA ladder marker

Lane 1: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 1.) LAMP product

Lane 2: *E. coli* (No 1.) LAMP product

Lane 3: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 1.) LAMP product

Lane 4: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 2.) LAMP product

Lane 5: *E. coli* (No 2.) LAMP product

Lane 6: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 2.) LAMP product

Lane 7: *Mbol* digestion of *E. coli* (No 6.) LAMP product

Lane 8: *E. coli* (No 6.) LAMP product

Lane 9: *TaqI* digestion of *E. coli* (No 6.) LAMP product

B: Southern hybridization resulting from the transfer of the DNAs in the gel from A to nylon membrane and hybridized with PCR product of *E. coli* (No.11) as probe

Discussion

การตรวจสอบเชื้อในตระกูล Enterobacteriaceae ที่สร้าง ESBLs มีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากเอนไซม์นี้ทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษา ทำให้มีความเสี่ยงสูงที่จะไม่สามารถรักษาได้ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อที่สร้าง ESBLs จึงควรทำก่อนที่จะเริ่มการรักษาเพื่อให้สามารถเลือกใช้ยาได้อย่างเหมาะสม

วิธี Double disk synergy test (DDST) เป็นหนึ่งในวิธี phenotypic ที่นิยมใช้ในการตรวจสอบว่าเชื้อมีการสร้าง ESBLs หรือไม่ เนื่องจากมีราคาถูก มีความไวสูง และทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไป (53) วิธีนี้ใช้ตรวจสอบความสามารถของเชื้อในการทำลายยาในกลุ่ม 3rd generation cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime and cefepime) ร่วมกับการใช้ β -lactamase inhibitor (clavulanic acid) (43) ลักษณะของ inhibition zone ที่เกิดจะมีลักษณะเฉพาะคือจะมีวงกว้างในด้านที่ใกล้กับแผ่นยาที่มี clavulanic acid รูปร่างของ inhibition zone ที่เกิดจะเหมือนกับ champagne-cork หรือพวงกุญแจ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อสร้าง ESBLs ชนิดใด (SHV, TEM and CTX-M type) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี DDST เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นเพื่อยืนยันว่าเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีการสร้าง ESBLs จริง จากผลการทดลองพบว่า inhibition zone รอบๆ แผ่นยา cefotaxime (CTX) หรือ ceftazidime (CAZ) จะมีขนาดเล็ก แต่จะใหญ่ขึ้นในบริเวณที่ใกล้กับแผ่นยา clavulanic acid ซึ่งวิธี DDST นี้มีความเฉพาะเจาะจงสูงและให้ผลใกล้เคียงร้อยละ 100 ในการตรวจสอบเชื้อที่สร้าง ESBLs อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถบอกได้ว่า ESBLs ที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นชนิดใด ดังนั้นการตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ชนิดนั้นๆ จึงมีความจำเป็น

หนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบหาสารพันธุกรรมคือ polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีความจำเพาะค่อนข้างสูงและสามารถตรวจการเกิด point mutation ในยีนที่สร้าง ESBLs ได้ด้วย (43, 54) หนึ่งในเชื้อที่สร้าง ESBLs ที่สำคัญคือเชื้อในตระกูล Enterobacteriaceae มีรายงานหลายชิ้นที่รายงานการพัฒนาวิธี PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อในตระกูล Enterobacteriaceae ที่สร้าง ESBLs ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองใช้ PCR ในการตรวจสอบยีนที่สร้าง ESBL ชนิด CTX-M9 (*bla*_{CTX-M9}) พบว่ามี 16 จาก 35 สายพันธุ์ที่มียีน *bla*_{CTX-M9} ข้อดีของวิธี PCR คือทำได้ง่ายและมีความถูกต้อง อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อด้อยหลายประการ คือ การต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ซึ่งไม่สามารถจัดหาได้ทุกห้องปฏิบัติการ และต้องเสียเวลาตรวจผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และทำได้โดยใช้อุปกรณ์ทั่วไป

งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็วเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อที่สร้าง ESBLs มีงานวิจัยหลายชิ้นที่วิธีนี้ในการตรวจเชื้อก่อโรค เช่น *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (55), Infectious spleen and kidney necrosis virus (56), *Haemophilus parasuis* (57) and *Mycobacterium bovis* (58) โดยในงานวิจัยนี้จะเน้นไปที่การพัฒนาวิธี LAMP เพื่อตรวจสอบยีน *bla_{CTX-M9}*

ขั้นแรกผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา พบว่า 1 mM Mg^{2+} concentration ที่ 63°C เป็นเวลา 60 นาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับยีนนี้ (รูป 4.4 และ 4.5) หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงใช้สภาวะของปฏิกิริยานั้นทำการทดสอบกับเชื้อตัวอย่างทั้งหมด พบว่าให้ผลตรงกับวิธี PCR แต่ใช้เวลานานการทดสอบน้อยกว่าเนื่องจากการที่วิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมเป้าหมายได้ที่อุณหภูมิคงที่ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาในการเปลี่ยนอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนเหมือนวิธี PCR หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบว่าถ้าเปลี่ยนจากเครื่อง thermal cycle ที่มีราคาแพง ไม่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ไปใช้ water bath จะให้ผลอย่างไร พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันดังแสดงในรูป 4.7 ดังนั้นวิธี LAMP สามารถใช้ตรวจสอบได้รวดเร็ว ถูกต้อง และใช้อุปกรณ์ที่มีราคาถูกกว่าวิธี PCR

เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก LAMP เกิดจากยีนที่เป็นเป้าหมายจริงๆ ผู้วิจัยจึงได้ทำการยืนยันผลิตภัณฑ์โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จากรายงานของ Notomi และคณะพบว่าในปฏิกิริยา LAMP จะเกิดโครงสร้างต่างๆ ขึ้นมากมายทั้งที่เป็นแบบ stem loop และรูปร่างคล้ายดอกไม้ซึ่งเกิดจากการที่มี loop อยู่ในโครงสร้างหลาย loop และโครงสร้างที่ 15 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายดอกไม้และเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ที่สุดที่เกิดในปฏิกิริยาได้ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการวิเคราะห์หาตำแหน่งที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ พบว่าเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *MboI* จะได้ชิ้น DNA ความยาว 168 177 และ 250 คู่เบส และเมื่อตัดด้วย *TaqI* จะได้ชิ้น DNA ที่มีความยาว 165 193 229 281 และ 314 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากทำการย่อยผลิตภัณฑ์ด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่าขนาดของ DNA ที่ได้มีขนาดตรงกับที่คาดการณ์ไว้ นอกจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จาก LAMP โดยวิธี agarose gel electrophoresis แล้ว ยังสามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วยโดยการเติม SYBR Green I ลงไปในปฏิกิริยาหลังจากทำการหยุดปฏิกิริยาแล้วถ้ามีการเพิ่มจำนวน DNA จะได้สีเขียวเรืองแสงแต่ถ้าไม่มีการเพิ่มจำนวน DNA ก็จะไม่เปลี่ยนสี ซึ่งการสังเกตด้วยตาเปล่านี้ช่วยลดเวลาในการทำ electrophoresis ทำให้รายงานผลได้เร็วขึ้น

ความไวในการตรวจสอบก็เป็นปัจจัยสำคัญในการบอกว่าวิธีนั้นเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือไม่ ทางผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบความไวของวิธี LAMP เทียบ

กับ PCR โดยการลดปริมาณ DNA ตั้งต้นลงแบบอนุกรมแล้วดูผลที่เกิดขึ้น พบว่าวิธี LAMP มีความไวมากกว่า PCR อย่างน้อย 10000 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่ใช้วิธีนี้ในการตรวจเชื้อก่อโรคเช่น *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (55), *Ralstonia solanacearum* (59) and *Porphyromonas gingivalis* (60).

สุดท้ายทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความจำเพาะของวิธี LAMP เนื่องจากในการตรวจสอบสารพันธุกรรมต่างๆ การเกิดผลบวกปลอมสามารถพบได้บ่อยและเป็นปัญหาของวิธี PCR ทำได้โดยใช้ ยีนดื้อยาอื่นๆที่ไม่จำเพาะกับ primer ของยีน *bla_{CTX-M9}* พบว่าวิธี LAMP มีความจำเพาะเท่ากับหรือมากกว่าวิธี PCR เนื่องจากในบางตัวอย่างวิธี PCR จะสังเกตเห็นแถบ DNA ที่เกิดขึ้นอย่างไม่เฉพาะเจาะจงได้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี LAMP ใช้ primer 4 คู่ที่จำเพาะกับ 6 ตำแหน่งบนสาย DNA เป้าหมาย ทำให้โอกาสเกิดผลบวกปลอมน้อยลง

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า วิธี LAMP เป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ β -lactamase ชนิดออกฤทธิ์กว้างของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* เนื่องจากมีความรวดเร็ว ความไวสูงและจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงทำให้สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทั่วไปได้

Conclusion

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ CTX-M9 ในเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* โดยใช้เทคนิค LAMP จากผลการทดลองพบว่าเทคนิคนี้สามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบได้ และเทคนิคนี้มีข้อดี คือ สามารถทราบผลในเวลารวดเร็ว มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่าและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและมีราคาแพง เมื่อทำการตรวจสอบในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับยีน blaCTX-M9 คืออุณหภูมิ 63°C 60 นาที พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็น ladder ความยาว 226 คู่เบส และมีความจำเพาะต่อ blaCTX-M9 ค่อนข้างสูง เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการยืนยันด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ผลผลิตขนาด 168 177 และ 250 เมื่อย่อยด้วย MboI และขนาด 165 193 229 281 และ 314 เมื่อย่อยด้วย TaqI นอกจากนี้ LAMP ยังมีความไวกว่าวิธี PCR ถึง 10000 เท่า

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าวิธี LAMP เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ ความไวสูง ถูกต้อง รวดเร็ว และสามารถที่จะนำไปใช้ตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ และจากการที่วิธีนี้ใช้เพียง water bath ในการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจสอบตามห้องปฏิบัติการต่างๆได้ การดูผลก็สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยการเติม SYBR Green I ลงไปในปฏิกิริยาหลังจากหยุดปฏิกิริยาแล้ว ซึ่งจะมีสีเขียวถ้ามีการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย (ผลบวก) แต่จะไม่เปลี่ยนสีถ้าไม่มีการเพิ่มจำนวน

ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า LAMP เป็นวิธีที่จำเพาะและความไวสูง ให้ผลรวดเร็วและประหยัดจึงเหมาะสมที่จะพัฒนาให้ใช้เป็นวิธีตรวจสอบเชื้อที่สร้าง ESBL ในโรงพยาบาลหรือห้องปฏิบัติการต่างๆ ในประเทศกำลังพัฒนาหรือบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อเหล่านั้น

References

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. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86.
3. Perez F, Endimani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol. 2007;7:459-69.
4. Jacoby GA, Munoz-Price LS. Mechanisms of disease "The new β -lactamases". N Engl J Med. 2005;352:380-91.
5. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2006;42:657-68.
6. Paterson DL. β -lactamase inhibitors and new β -lactamases. Curr Treatment Option Infect Dis. 1999;1:85-7.
7. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect. 2003;47:273-95.
8. Lulitanond A, Kaewkes W. Prevalence 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.
9. Biedenbach DJ, Johnson DM, Jones RN. *In vitro* evaluation of cefepime and other broad-spectrum β -lactams in eight medical center in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;35:325-31.
10. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddhara C, Fennewald M. et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -

- lactamase in nosocomial Enterobacterial isolated in Bangkok, Thailand. J Clin Microb. 201;39:175-82.
11. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. Clin Infect Dis. 2002;34:603-11.
 12. 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.
 13. Ingviya N, Hortiwakul R, Chayakul P, Thamjarungwong B. Prevalence and susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended-spectrum betalactamases in Songklanagarind hospital, Thailand. J Infect Dis. Antimicrob Agents. 2003;20:127-34.
 14. Kusum M, Wongwanich S, Dhiraputra C, Pongpech P, Naenna P. Occurrence of extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital, Thailand. J Med Assoc Thai. 2004;87:1029-33.
 15. Niumsup PR, Tansawai U, Boonkerd N, Polwichai P, Dejsirilert S. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Thai hospitals. J Infect Chemother. 2008;14:404-8.
 16. Woodford N, Sundsfjord A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? J Antimicrob Chemother. 2005;56:259-61.
 17. Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. Clin Infect Dis. 2007;44:418-23.
 18. Notomi T, Okayama H, Masubuchi M, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DN. Nucleic Acid Res. 2000;28:E63.
 19. Kaneko H, Kaeana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods. 2007;499-501.

20. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infection diseases. *J Infect Chemother.* 2009;15:62-9.
21. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat.* 2006;9:142-56.
22. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. *Can J Microbiol.* 2004;50:137-65.
23. Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiell* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5715-21.
24. Chanawong A, M'Zali, FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-m-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:630-7.
25. Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M, Quin JP. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: Prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:790-3.
26. Munday CJ, Xiong J, Li C, Shen D, Hawkey PM. Dissemination of CTX-M type β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates in the People's Republic of China. *Inter J Antimicrob Agents.* 2004;23:175-80.
27. Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishino H, et al. Production of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo β -lactamase by five gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:631-8.
28. Nagano N, Shibata N, Saitou Y, Arakawa Y. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum ETX-M-2 type β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5530-6.
29. Nagano N, Nagano Y, Cardevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3978-84.

30. Joeng SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Song JS, Jung HI, et al. Dissemination of transferable CTX-M type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. J Applied Microbiol. 2005;98:921-7.
31. Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1572-5.
32. Kim J, Lim YM, Rheem I, Lee Y, Lee JC, Seol SY, et al. CTX-M and SHV-12 β -lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. FEMS Microbiol Lett. 2005;245:93-8.
33. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:3739-43.
34. Koh TH, Wang GCT, Sng LH, Yi Z, Koh TY. CTX-M and plasmid-mediated AmpC-producing *Enterobacteriaceae*, Singapore. Emerg Infect Dis. 2004;10:1172-3.
35. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, Where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2818-24.
36. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Arch Intern Med. 2005;165:1375-80.
37. Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infection due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2001;39:2206-12.

38. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis II JS. Extended-spectrum β -lactamases: Epidemiology, detection and treatment. *Pharmacotherapy*. 2001;21:920-8.
39. Endimiani A, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Tamborini A, et al. Bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum β -lactamase: Treatment outcome of patients receiving imipenem or ciprofloxacin. *Clin Infect Dis*. 2004;38:243-51.
40. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med*. 2006; 119(6 Suppl 1):S20-8.
41. Ramphal R, Ambrose PG. Extended-spectrum β -lactamases and clinical outcome: Current date. *Clin Infect Dis*. 2006;42:S164-72.
42. Drieux L, Brossier F, Songakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamases: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(Suppl 1):90-103.
43. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:159-66.
44. Poxton IR. Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: do they have a role in bacteriology? *Med Princ Pract*. 2004;444(Suppl 1):73-9.
45. Gilbert GL. Molecular diagnostics in infectious diseases and public health microbiology: cottage industry to post genomics. *Trends Mol Med*. 2002;8:280-7.
46. Van Belkum A. Molecular diagnostics in medical microbiology: yesterday, today, and tomorrow. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:497-501.
47. Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trend Microbiol*. 2002;10:185-97.
48. Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. *J Mol Diagn*. 2008;10:185-97.
49. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*. 2004;59:145-57.

50. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008;3:877-82.
51. Hara-Kondo Y, Yoshino N, Kojima T, Ikeda M. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;253:155-61.
52. Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS.* 2004;112:908-29.
53. Garrec H., Drieux-Rouzet L., Golmard J. L., Jarlier V., Robert, J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 2011;49(3):1048-57.
54. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(1):150-4.
55. Rigano LA., Marano MR., Castagnaro AP, Do Amaral AM., Vojnov AA. Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. *BMC Microbiol.* 2010: 10-176.
56. Ding WC, Chen J, Shi YH., Lu XJ, Li MY. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Arch Virol.* 2010;155(3): 385-9.
57. Yang W, Ying F, Yingyu L, Pin C, Wentao L, Shuqing L, et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;313(1): 54-60.
58. Zhang J, Zhang GH, Yang L, Huang R, Zhang Y, Jia K, Yuan W, Li SJ. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. *Vet J.* 2011;187(3):393-6.
59. Kubota R, Vine BG, Alvarez AM, Jenkins DM. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology.*

2008;98(9):1045-51.

60. Yoshida A, Nagashima S, Ansai T, Tachibana M, Kato H, Watari H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. J Clin Microbiol. 2005;43(5): 2418-24.

Output of Research

ผลงานอื่นๆ เช่น การไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

- นำเสนอผลการวิจัยเบื้องต้นเรื่อง “Rapid detecton of extended-spectrum β -lactamase gene from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification” ในงานประชุม The 7th Indochina conference on Pharmaceutical Sciences in conjunction with The 2nd Universiti Kebangsaan Malaysia – Mahidol University Joint Scientific Conference เมื่อวันที่ 14 – 16 ธันวาคม 2554 ณ โรงแรมอโนมา กรุงเทพฯ

- Poster presentation เรื่อง “Rapid detecton of extended-spectrum β -lactamase gene from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 12 วันที่ 12 – 15 ตุลาคม 2555 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

Rapid Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase Gene from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification

K. Pothisamutyothin¹, S. Nathisuwan², M.T. Chomnawang¹, C. Wiwat¹ and K. Thirapanmethee^{1*}

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Sri-Ayudhya Road, Rajthevi, Bangkok 10400, Thailand

²Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Sri-Ayudhya Road, Rajthevi, Bangkok 10400, Thailand

Key words: β -lactamase enzyme, ESBL, Loop-mediated isothermal amplification, Nucleic acid detection

INTRODUCTION

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are a group of enzyme β -lactamases that is able to hydrolyze most of the β -lactam antibiotics. ESBLs are usually encoded by genes located on large plasmids found in Gram-negative bacteria including *Enterobacteriaceae* (1). ESBLs have become a concern in both antimicrobial treatment and infection control. The detection method of those ESBLs-producing bacteria is necessary for identification, prevention and treatment. The methods for detection of ESBLs can be divided into two groups; phenotypic method using non-molecular techniques and genotypic method using molecular techniques.

The phenotypic detection can differentiate between ESBLs and over productions of cephalosporinase while genotypic method is used to identify the ESBLs encoded genes. At present, the genotypic methods widely used for detection of those enzymes are polymerase chain reaction (PCR). However, this method is expensive and time-consuming for routine laboratory in developing countries. Therefore, the rapid, cost-effective and accurate diagnoses are important to be considered.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel isothermal amplification technique. LAMP can be performed by a set of 4 specially designed oligonucleotide primers consisting of forward inner primer (FIP), backward inner primer (BIP), B3 and F3. This method is faster, more sensitive and specific than conventional PCR, as well as no requirement for specialized laboratory equipments. Moreover, this method can be visualized by real-time turbidity caused by precipitation of magnesium pyrophosphate, a by-product of reaction.

The aim of this study is to develop the LAMP method in order to detect CTX-M1 type ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. For this purpose, *E. coli* (27 strains) and *K. pneumoniae* (8 strains) were isolated from patients in infectious unit at Ramathibodi Hospital. The ESBLs production was confirmed by double-disk synergy test (DDST) and PCR. Then, a set of specific oligonucleotide primers was designed and used to perform the LAMP reaction. The LAMP condition will be further optimized and tested for specificity and sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains: This study was an experimental study to identify β -lactamase genes in ESBL-producing *E.coli* and *K.pneumoniae* clinical isolates obtained from Ramathibodi Hospital followed by an evaluation of activities of antimicrobial agents alone or in combination against these isolates using time-kill method. The study protocol was approved by Committee on Human Right Related to Researches Involving Human Subjects of Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University on July 15, 2005 with approval number 0609/2005.

Preparation of plasmid DNA from bacterial cells: A single colony of *E.coli* and *K.pneumoniae* was cultured in 5 ml of LB broth containing 100 μ g/ml ampicillin at 37°C for 12-16 hr with continuous shaking at 150 rpm. Then, bacterial DNA was extracted by plasmid extraction kit (Real biotech corporation, Taiwan).

Double-disk synergy test (DDST): Bacteria were suspended equivalent to McFarland 0.5 turbidity standard in Mueller-Hinton broth and inoculated onto Mueller-Hinton agar plate. Then, disks containing cefotaxime (CTX 30 μ g), ceftazidime (CAZ 30 μ g) were placed 20 mm (center to center) from amoxicillin-clavulanic acid disk (30 and 10 μ g respectively). These plates were incubated at 37°C overnight.

Polymerase chain reaction (PCR): PCR was performed at a final volume of 25 μ l in 1.5 ml tubes. The primers used for PCR amplification are listed in Table 1. Each reaction contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 0.2 mM each of deoxynucleoside triphosphate; 2 mM $MgCl_2$; 0.4 μ M primers of Forward and Reward; and 4U of *Taq* DNA polymerase. Template DNA (1 μ l) was added to 24 μ l of

master mixture. The PCR program was performed with pre-heat at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of DNA denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 52°C for 30 sec, extension at 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Gels were stained with ethidium bromide at 0.5 µg/ml and visualized by UV transillumination. A 100-bp DNA ladder was used as a marker. Negative control was PCR mixture with the addition of water in place of template DNA.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A set of four primers specific to the ESBL gene was designed by Eiken explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>). The forward inner primer (FIP) consisted of the F1C sequence, TTTT and the F2 sequence. The backward inner primer (BIP) consisted of the B1C sequence, TTTT and B2 sequence. LAMP was performed at a final volume of 25 µl in 1.5 ml tubes. The primers used for LAMP amplification are listed in Table 2. Each reaction contained 0.8 µM each FIP and BIP, 0.2 µM each F3 and B3, 200 µM each dNTP, 1 M betaine, 1X thermopol buffer, 2 mM MgSO₄, 4U *Bst* DNA polymerase. After incubation at 60-65°C for 1 h, the reaction was stopped by heating at 80°C for 2 min. Then, the LAMP products were analyzed on 2% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light. The specificity of reaction was confirmed by digestion with restriction enzymes, *Mbo*I and *Pvu*II. After digestion, the digested products (10 µl) were analyzed by electrophoresis on 3% agarose gels electrophoresis and visualized under UV light.

Table 1. Oligonucleotide primers of PCR for detection of β-lactamase genes.

Primer	Annealing temperature (°C)	Nucleotide sequence (5' → 3')	Expected Amplicon size (bp)	Reference (GenBank accession No.)
CTX-M-1-F	52	CGG TGC TGA AGA AAA GTG	369	X92506
CTX-M-1-R		TGT CAC CCA ATG CTT TAC C		(<i>E.coli</i>)

Table 2. Oligonucleotide primers of LAMP for detection of β-lactamase genes.

Primer	Sequence (5' → 3')
CTX-M1F3	GCGATAACGTGGCGATGA
CTX-M1B3	TCAGATTCCGCAGAGTTTGC
CTX-M1FIP	TTCGTCTCCCAGCTGTCGGGTTTTTGATTGCTCACGTTGGCG
CTX-M1BIP	GTTCCGTCTCGACCGTACCGATTTTGCCCGAGGTGAAGTGGTAT

RESULTS AND DISCUSSION

Double-disk synergy test (DDST): The test result was considered as positive when decreased susceptibility to cefotaxime and ceftazidime were combined with a clear-cut enhancement of the inhibition zone of those antibiotics in front of the clavulanate-containing disk (Figure 1). The results showed that 20 out of 27 strains *E.coli* carried CTX-M1 gene whereas for *K.pneumoniae*, CTX-M1 gene was detected in 6 out of 8 strains.



Fig 1. A positive result of double-disk synergy test. Cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) and amoxicillin-clavulanate (AMC) disks were placed at a distance of 20 mm from others. The inhibition zone was enhanced between CTX, CAZ and AMC disks, indicating synergy between CTX, CAZ and AMC.

Polymerase chain reaction (PCR): PCR results indicated that CTX-M1 gene was detected in 20 out of 27 *E.coli* strains whereas for *K.pneumoniae*, CTX-M1 gene was detected in 6 out of 8 strains as shown in Table 3 and Figure 2.

Table 3. PCR results

No.	Organisms	CTX-M1
1	<i>E.coli</i>	-
2	<i>E.coli</i>	+
3	<i>E.coli</i>	+
4	<i>E.coli</i>	+
5	<i>E.coli</i>	+
6	<i>E.coli</i>	+
7	<i>E.coli</i>	+
8	<i>K.pneumoniae</i>	+
9	<i>E.coli</i>	-
10	<i>E.coli</i>	-
11	<i>E.coli</i>	+
12	<i>K.pneumoniae</i>	+
13	<i>E.coli</i>	+
14	<i>E.coli</i>	+
15	<i>E.coli</i>	+
16	<i>E.coli</i>	+
17	<i>E.coli</i>	+
18	<i>E.coli</i>	+

No.	Organisms	CTX-M1
19	<i>E.coli</i>	+
20	<i>K.pneumoniae</i>	+
21	<i>E.coli</i>	+
22	<i>K.pneumoniae</i>	+
23	<i>K.pneumoniae</i>	+
24	<i>E.coli</i>	+
25	<i>E.coli</i>	-
26	<i>K.pneumoniae</i>	-
27	<i>K.pneumoniae</i>	+
28	<i>K.pneumoniae</i>	-
29	<i>E.coli</i>	+
30	<i>E.coli</i>	-
31	<i>E.coli</i>	+
32	<i>E.coli</i>	-
33	<i>E.coli</i>	+
34	<i>E.coli</i>	+
35	<i>E.coli</i>	-

NC 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10

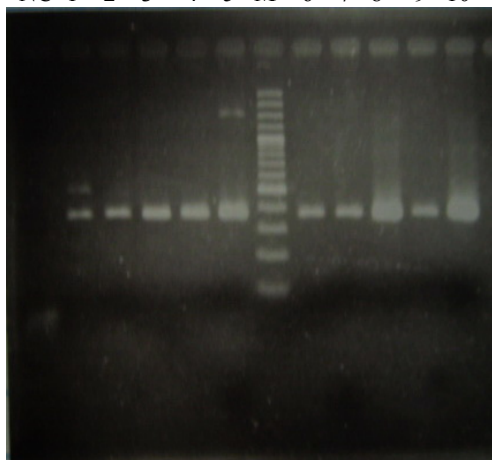


Fig 2. Positive of PCR products were separated in a 2% agarose gel. A single amplicon of 369 bp was generated.

Lane NC, Negative control (The addition of water in place of template DNA)

Lane 1, *E.coli* (No.2)

Lane 2, *K.pneumoniae* (No.8)

Lane 3, *E.coli* (No.14)

Lane 4, *E.coli* (No.15)

Lane 5, *E.coli* (No.16)

Lane M, Marker = 100-bp DNA ladder plus marker

Lane 6, *E.coli* (No.17)

Lane 7, *E.coli* (No.18)

Lane 8, *K.pneumoniae* (No.22)

Lane 9, *K.pneumoniae* (No.23)

Lane10, *E.coli* (No.24)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): To determine the optimal temperature and time of the LAMP reaction, the result showed that the best condition was observed at 63°C for 60 min. After separated by 2% agarose gel electrophoresis, the typical ladder pattern of amplified products could be seen under UV light. The amplified products were confirmed by digesting with restriction endonucleases, *MboI* and *PvuII*. The fragments were analyzed by gel electrophoresis (Figure 3). This ladder pattern was characteristic of the LAMP amplification and indicated that stem-loop DNA with inverted repeats of the target sequence was produced.

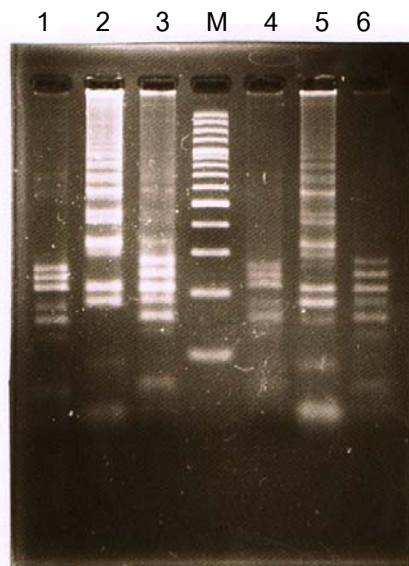


Fig 3. Restriction analysis of the LAMP product. The digestion product was electrophoresed in 3% agarose gel.

Lane1, *PvuII* digestion of *E.coli* LAMP product;
 Lane 2, *E.coli* LAMP product;
 Lane 3, *MboI* digestion of *E.coli* LAMP product;
 Lane M, 100-bp DNA ladder plus marker;
 Lane 4, *PvuII* digestion of Reference M1;
 Lane 5, Reference M1 LAMP product;
 Lane 6, *MboI* digestion of Reference M1 LAMP product.

CONCLUSION

A set of four specific oligonucleotide primers was designed based on the sequence of CTX-M1 type ESBL gene. The optimum condition for amplification was at 63°C for 60 min. The results from LAMP were comparable to PCR method but it was more rapid and easier to perform. However, a condition for the LAMP technique should be further developed in order to optimize sensitivity and specificity.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (MRG5380022)

REFERENCES

1. Pitout JDD. Infections with Extended-Spectrum β -lactamase-Producing Enterobacteriaceae. Adls Data information BV, All rights reserved, 2010; 70 (3); 313-333.
2. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W and Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008; 14 (Suppl.1); 90-103.
3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 2000; 28:12; 1-7.



Rapid detection of extended-spectrum β -lactamase gene from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification

Thirapanmethree K^{1*}, Pothisamutyothin K¹, Nathisuwan S², Wiwat C¹

¹ Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok

² Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok

E-mail: krit.thi@mahidol.ac.th



Introduction

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are a group of enzyme β -lactamases that is able to hydrolyze most of the β -lactam antibiotics. ESBLs are usually encoded by genes located on large plasmids found in Gram-negative bacteria including Enterobacteriaceae. The methods for detection of ESBLs can be divided into two groups; phenotypic method using non-molecular techniques and genotypic method using molecular techniques. The phenotypic detection can differentiate between ESBLs and over productions of cephalosporinase while genotypic method is used to identify the ESBLs encoded genes. At present, the genotypic methods widely used for detection of those enzymes are polymerase chain reaction (PCR). However, this method is expensive and time-consuming for routine laboratory in developing countries. Therefore, the rapid, cost-effective and accurate diagnoses are important to be considered. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel isothermal amplification technique. LAMP can be performed by a set of 4 specially designed oligonucleotide primers consisting of forward inner primer (FIP), backward inner primer (BIP), B3 and F3. This method is faster, more sensitive and more specific than conventional PCR, as well as no requirement for specialized laboratory equipment. The aim of this study is to develop the LAMP method in order to detect CTX-M9 type ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and Methods

Bacterial strains: Clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* were obtained from Ramathibodi Hospital. The study protocol was approved by Committee on Human Right Related to Researches Involving Human Subjects of Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University on July 15, 2005 with approval number 0609/2005.

Plasmid extraction: A single colony of *E. coli* and *K. pneumoniae* was cultured in 5 ml of LB broth containing 100 μ g/ml ampicillin at 37°C for 12-16 h with continuous shaking at 150 rpm. Then, bacterial DNA was extracted by plasmid extraction kit (Real biotech corporation, Taiwan).

Polymerase chain reaction (PCR): Specific detection of CTX-M9 gene (*bla*CTX-M9) was performed using specific set of primer (CTX-M9 F: 5'-CGT ATT GGG AGT TTG AGA TG-3', and CTX-M9 R: 5'-GGT ATT CAG CGT AGG TTC-3'). The amplification processes were carried out 30 cycles of DNA denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 50°C for 30 sec, extension at 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 5 min.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A set of four primers specific to CTX-M9 gene (*bla*CTX-M9) was designed using EikenexplorerV4 software (Table 1). LAMP amplification was performed in 25 μ l reaction mixture containing 0.8 μ M each FIP and BIP, 0.2 μ M each F3 and B3, 200 μ M each dNTP, 1 M betaine, 1X thermopol buffer, 2 mM MgSO₄, 4U *Bst* DNA polymerase. The amplification processes were carried out 60-65°C for 1 h, the reaction was stopped by heating at 80°C for 2 min. The amplified products were analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide and visualized under a UV transilluminator. The product was confirmed by digestion with restriction enzymes, *Mbol* and *TaqI*, and analyzed on 3% agarose gels electrophoresis and visualized under UV light.

Results and Discussion

Polymerase chain reaction (PCR): PCR results indicated that CTX-M9 gene was detected in 21 out of 27 *E. coli* strains whereas *K. pneumoniae*, CTX-M9 gene was detected in 7 out of 8 strains as shown in Figure 1.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): To determine the optimal temperature and time of the LAMP reaction, the reaction was performed at various temperature and time. The result showed that the best condition was observed at 63°C for 60 min. After separated on 1.5% agarose gel electrophoresis, the typical ladder pattern of amplified products could be seen under UV light as shown in Figure 2. The amplified products were confirmed by digesting with restriction endonucleases, *Mbol* and *TaqI*. The fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis (Figure 3). This ladder pattern was characteristic of the LAMP amplification and indicated that stem-loop DNA with inverted repeats of the target sequence was produced.

Conclusion

A set of four specific oligonucleotide primers was designed based on the sequence of CTX-M9 ESBL gene. The optimum condition for amplification was at 63°C for 60 min. The results from LAMP were comparable to PCR method but it was more rapid and easier to perform. The sensitivity and specificity of LAMP technique is being investigated.

References

1. Dreux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008; 14 (Suppl. 1): 90-103.
2. Ndotomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000; 28:12, 1-7.

Table 1. Oligonucleotide primers of LAMP for detection of CTX-M9 genes

Primer	Sequence (5'→3')
CTX-M9F3	GAGTGAACGCAAAAGCAGC
CTX-M9B3	CCAGACGAAACGTCTCATCG
CTX-M9FIP	GCCGTGACGTGTTTTTCGCGCTTTTCAGCCTGTCGAGATCAAGC
CTX-M9BIP	CGCGTTGCAGTACAGCGACATTTTAAAGCGCTCACGCCCTC

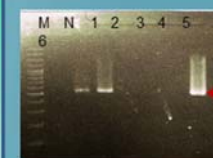


Figure 1. Positive of PCR products. A single amplicon of 539 bp was generated. Lane M: 100-bp DNA ladder plus marker. Lane N: Negative control. Lane 1: *E. coli* (No.1). Lane 2: *E. coli* (No.2). Lane 3: *E. coli* (No.3). Lane 4: *E. coli* (No.4). Lane 5: *E. coli* (No.5). Lane 6: *E. coli* (No.6).

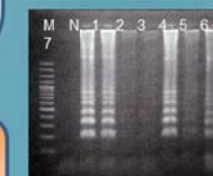


Figure 2. The typical ladder pattern of LAMP product. Lane M: 100-bp DNA ladder plus marker. Lane N: Negative control. Lane 1: *E. coli* (No.1). Lane 2: *E. coli* (No.2). Lane 3: *E. coli* (No.3). Lane 4: *E. coli* (No.4). Lane 5: *E. coli* (No.6). Lane 6: *E. coli* (No.9). Lane 7: *E. coli* (No.10).

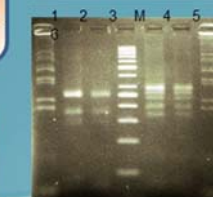


Figure 3. Restriction analysis of the LAMP product. Lane 1: *E. coli* (No.1) LAMP product. Lane 2: *Mbol* digestion of *E. coli* (No.1) LAMP product. Lane 3: *Mbol* digestion of *E. coli* (No.2) LAMP product. Lane M: 50-bp DNA ladder marker. Lane 4: *TaqI* digestion of *E. coli* (No.1) LAMP product. Lane 5: *TaqI* digestion of *E. coli* (No.2) LAMP product. Lane 6: *E. coli* (No.2) LAMP product.

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (MRG5380C22)