เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้าง Extended spectrum β - lactamase ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ : ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและ Pulsotype

นางสาวจุลินทร พงศ์ทองคำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1319-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20470770

EXTENDED SPECTRUM β - LACTAMASE PRODUCING *Klebsiella pneumoniae* ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMEN : ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERN AND PULSOTYPE

Miss Julintorn Pongtongkam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department Program in Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1319-3

Thesis Title	EXTENDED SPECTRUM β - LACTAMASE PRODUCING *Klebsiella pneumoniae* ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMEN : ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERN AND PULSOTYPE
By	Miss Julintorn Pongtongkam
Field of study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Pintip Pongpech, Ph. D.
Thesis co –advisor	Siripan Wongwanich, M.Sc

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Suchada Kiranadana
.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranadana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Ratana Serinirach
.....Chairman

(Associate Professor Dr. Ratana Serinirach, Ph.D.)

Pintip Pongpech
.....Thesis Advisor

(Associate Professor Dr. Pintip Pongpech, Ph.D.)

Siripan Wongwanich
.....Thesis Co –advisor

(Siripan Wongwanich, M.Sc.)

Chertsak Dhiraputra
..... Member

(Associate Professor Chertsak Dhiraputra, M.D., M. Sc)

จุลินทร พงศ์ทองคำ : เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้าง Extended spectrum β - lactamase ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ: ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพและ pulsotype (Extended Spectrum β - lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Clinical Specimen : Antimicrobial Susceptibility Pattern and Pulsotype) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นาง ศิริพรรณ วงศ์วาณิช,164 หน้า, ISBN 974-17-1319-3

เชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด 400ไอโซเลต ซึ่งแยกมาจากเสมหะ, ปัสสาวะ และเลือดของผู้ป่วยที่โรงพยาบาลศิริราช เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ extended spectrum β - lactamase (ESBL)โดยใช้วิธี initial screen test และ phenotypic confirmatory test ซึ่งกำหนดโดย NCCLS พบว่าเป็นเชื้อที่สร้าง ESBL 100 ไอโซเลต ส่วนเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมดจำนวน 36 ไอโซเลตที่แยกมาจากอุจจาระของคนปกติ 100 ตัวอย่างเป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL ผลจากการศึกษาส่วนนี้ชี้ให้เห็นว่า initial screen testต้องใช้ผลที่แสดงว่าเชื้อเป็น suspicious ESBL producer จากยาทั้ง 3 ชนิดคือ ceftazidime, cefotaxime และ ceftriaxone เนื่องจากให้ผลที่สอดคล้องกับวิธี phenotypic confirmatory test ส่วนวิธี E - test ESBL screen test จะมีประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อที่สร้าง ESBL ต่ำกว่าการใช้วิธี phenotypic confirmatory test

จากการทดสอบความไวรับต่อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL โดยการหาค่า MIC ของยา ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime และ imipenem โดยใช้ E - test strip เมื่อพิจารณาจากค่า MIC สามารถแยกเอนไซม์ ESBL คร่าวๆ ตามการออกฤทธิ์เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อ 32 ไอโซเลตอยู่ในกลุ่มมีฤทธิ์เป็น Broad type, 13 ไอโซเลตมีฤทธิ์เป็น Ceftazidimase activity และ 55 ไอโซเลตไม่สามารถจำแนกว่าเป็นชนิดใด อย่างไรก็ดีควรทำการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับลักษณะของเอนไซม์ก่อนที่จะสามารถสรุปได้ว่าอยู่ในกลุ่มใด ส่วนผลความไวรับของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ได้มีเพียง 5% ของเชื้อไวต่อยา ceftazidime ในขณะที่ 87%, 79%, 30%, 90% และ 100% ไวต่อยา cefotaxime, ceftriaone, cefuroxime, cefoxitin และ imipenem ตามลำดับ ในขณะที่ผลจากการศึกษาโดยวิธี Kirby - Bauer susceptibility test พบว่าเชื้อ 50%, 71%, 16%, 67%, และ 38% ไวต่อยา gentamicin, amikacin, tobramycin, ciprofloxacin และ trimethoprim -sulfamethoxazole ตามลำดับ

เชื้อ *K. pneumoniae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ จำนวน 100 ตัวที่แยกได้ในช่วงเวลา 6 เดือนติดต่อกัน สามารถจำแนกออกเป็น 86 pulsotypes และพบว่าไม่มีสายพันธุ์ที่เป็น endemic และ ไม่มีการระบาดของเชื้อนี้ด้วย

ภาควิชาสหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4289658020 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD : *Klebsiella pneumoniae* / EXTENDED SPECTRUM β - LACTAMASE / PULSED - FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

JULINTORN PONGTONGKAM: EXTENDED SPECTRUM β - LACTAMASE PRODUCING *Klebsiella pneumoniae* FROM CLINICAL SPECIMEN: ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERN AND PULSOTYPE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. PINTIP PONGPECH, THESIS COADVISOR : SIRIPAN WONGWANICH, M.Sc., 164 pp. ISBN 974-17-1319-3

One hundred ESBL producing isolates were detected from 400 *K. pneumoniae* isolated from sputum, urine , and blood of the patients in Siriraj Hospital using the NCCLS initial screen test and the phenotypic confirmatory test. No ESBL producing isolates could be detected from 36 *K. pneumoniae* isolated from the feces of 100 normal persons. Suggestive evidence from this study was that the use of positive results from all three drugs : ceftazidime, cefotaxime, and ceftriaxone in the initial screen test was necessary for the detection of suspicious ESBL producer. The results from such criterion were best correlated with those from the phenotypic confirmatory test. E -test ESBL screening test was shown to be less efficient than the NCCLS phenotypic confirmatory test .

Antimicrobial susceptibility test of all ESBL producing *K pneumoniae* were performed. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of the cephalosporins included ceftazidime,cefotaxime, ceftriaxone and cefuroxime and that of the carbapenem were detected using E - test strip. According to the MICs, it was suggestive that 32 isolates produced ESBL with " broad " activity , 13 isolates produced enzyme with "ceftazidimase" activity and 55 isolates were ESBL with undetermined activity. Therefore, further study on the enzymes' characteristics should be performed before more definite conclusions could be made. Among the ESBL producing isolates, only 5% were susceptible to ceftazidime, while 87%, 79%, 30 %, 90 % and 100% were susceptible to cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime, cefoxitin and imipenem, respectively. From the Kirby - Bauer susceptibility test, 50%, 71%, 16%, 67% and 38% of the ESBL producing isolates were susceptible to gentamicin, amikacin, tobramycin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole, respectively.

There were as many as 86 different pulsotypes among all 100 ESBL producing *K. pneumoniae* isolated during the 6 month period of study. Thus, evidences of the endemic and epidemic strains were not demonstrated.

Department Medical Microbiology — Student 's signature Julintorn Pongtongkam
Field of study Medical Microbiology — Advisor 's signature Pintip Pongpech
Academic year 2002 — Co - advisor 's signature Siripan Wongwanich

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep gratitude to Associate Professor Dr. Pintip Pongpech, of Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceulical Science, Chulalongkorn University, my advisor, and Mrs. Siripan Wongwanich of Anaerobic Bacteriology Section, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Publish health, my co -advisor, for their valuable advices, indispensable help, encouraging guidance, initiating ideas and construction criticisms throughout my study.

My sincere gratitude is also given to the member of my advisory committee, Associate Professor Dr. Ratana Serinirach, of Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University and especially to Associate Professor Chertsak Dhiraputra, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, for their kindness, valuable comments helpful suggestion for the completeness this thesis.

I will forever be appreciated to the staffs of the Siriraj Hospital, for their kind help in collecting the specimens. Without their generous helps, it would have been impossible for me to carry on this study succesfully.

I also wish to thank all staff members of National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Publish Health, for their encouragement and kindness in every way.

I like to thank to the National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Publish Health , for partly support in this study.

Finally, I wish to express all my deepest gratitude to Instructor Penpun Naena, of Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University , my family and my friends for their encouragement, understanding and support during my study period.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....x

ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

II. LITERATURE REVIEWS..... 5

III. MATERIALS AND METHODS.....44

IV. RESULTS..... 61

V. DISCUSSION..... 84

VI. CONCLUSION..... 91

REFERENCES..... 93

APPENDICES

APPENDIX I..... 108

APPENDIX II..... 123

APPENDIX III.....128

APEENDIX IV.....152

BIOGRAPHY..... 164

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Characteristics of TEM - type β - lactamase	39
2.2	Characteristics of SHV - type β - lactamase	40
2.3	Characteristics of CTX - M type ESBLs	41
2.4	Characteristics of OXA type ESBLs	42
2.5	Characteristics of novel, unrelated ESBLs	43
4.1	Total number of *K. pneumoniae* isolates from various clinical specimens and from feces of normal person during August 2000 to January 2001	67
4.2.1	Number of suspicious extended spectrum β - lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae* isolates from various clinical specimens based on NCCLS initial screen test	68
4.2.2	Number of suspicious for extended spectrum β - lactamase (ESBL) producing *K.pneumoniae* isolates from feces of normal person based on NCCLS initial screen test	68
4.3	Number of suspicious extended spectrum β - lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae* isolates from various clinical specimens in relation to the number of the antimicrobial agents tested	69
4.4	Number of extended spectrum β - lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae* isolates from various clinical specimens determined by phenotypic confirmatory test as compared with the initial screen test	70

Table **Page**

4.5 Number of extended spectrum β - lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae* isolates from various clinical specimens determined by E - test ESBL strips as compared with the initial screen test.....71

4.6 Antimicrobial susceptibility of extended spectrum β - lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae* isolates from each clinical specimens against cephalosporin and imipenem as detected by E – test.....72

4.7.1 Antimicrobial susceptibility of ESBL producing *K. pneumoniae* isolates from each clinical specimen against other groups of antimicrobial agents besides beta - lactams as detected by agar disk diffusion method.....73

4.7.2 Antimicrobial susceptibility of Non - ESBL producing *K. pneumoniae* isolates from feces of normal person against other groups of antimicrobial agents besides beta -lactams as detected by agar disk diffusion method.....74

4.8 Distribution of phenotype of extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *K. pneumoniae*..... 75

4.9 Pulsotypes of extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *K.pneumoniae* isolates from various clinical specimens.....76

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Amino acid substitution in TEM - ESBL derivatives	36
2.2	Amino acid substitution in TEM IRT derivatives	37
2.3	Amino acid substitution in SHV- ESBL derivatives	38
3.1	E - test ESBL strips (CTX /CTXL , CAZ/CAZL)	60
4.1	Pulsotypes of ESBL producing *K. pneumoniae* isolated from blood	81
4.2	Pulsotypes of ESBL producing *K. pneumoniae* isolated from sputum	82
4.3	Pulsotypes of ESBL producing *K. pneumoniae* isolated from urine	83

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	et all
g	gram
hr	hours
M	molar (s)
mM	millimolar (s)
μM	micromolar (s)
mg	milligram (s)
ml	millilitre (s)
mm	millimeter (s)
NCCLS	National Committee for Clinical laboratory Standards
ESBL	Extended spectrum β-lactamase
ATCC	American Type Culture Collection
cm	centimeter
°C	Degree Celsius
μg	microgram
μl	microliter
s	second
v	volt
%	percent
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
PFGE	Pulsed – Field Gel Electrophoresis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย