# STUDY OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE (ESBL)-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS

**WARARAT CHIANGJONG**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF**
**THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF**
**MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)**
**FACULTY OF GRADUATE STUDIES**
**MAHIDOL UNIVERSITY**
**2006**

**ISBN 974-04-6984-1**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาเชื้อ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอลโดยลักษณะทางจีโนทัยป์และฟีโนทัยป์ (STUDY OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE (ESBL)-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS)

วรารัตน์ เชียงจง 4736624 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สมพร ศรีเฟื่องฟุ้ง, Ph.D., ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D.

## บทคัดย่อ

อีเอสบีแอลเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อดื้อยากลุ่มpenicillin, cephalosporin และ aztreonam (ยกเว้นยากลุ่ม cephamycin และ carbapenem) เอนไซม์อีเอสบีแอลพบมากในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจหาคุณสมบัติการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอลซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศิริราชระหว่างมกราคม-กุมภาพันธ์ 2547 และ กรกฎาคม-สิงหาคม 2548 ต่อยา 5 ชนิด โดยวิธี disk diffusion, วิธี MIC และศึกษาลักษณะทางฟีโนทัยป์ สำหรับการศึกษาลักษณะทางจีโนทัยป์ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอลทำโดยใช้เทคนิคPCRในการหาอีเอสบีแอลยีนได้แก่ ยีน SHV, ยีน TEM, ยีน CTX-M, ยีน OXA-10-like และ ยีน VEB-1-like ตามด้วยการหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางฟีโนทัยป์และจีโนทัยป์ นอกจากนี้งานวิจัยยังได้รวมถึงการศึกษาเบื้องต้นของการแยกสายพันธุ์ของ เชื้อ *K. pneumoniae* โดยใช้เทคนิคrandomly amplified polymorphic DNA (RAPD) และ Southern blot hybridization

โดยทั่วไปการทดสอบเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอลส่วนใหญ่ใช้วิธี disk diffusion และ MIC สำหรับการทดสอบเบื้องต้นและการทดสอบเพื่อยืนยันว่าผลถูกต้องในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอล 100 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วย cefotaxime, ceftazidime และ ceftriaxone โดยวิธี disk diffusion พบเชื้อที่สงสัยว่าผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอล 100%, 95%และ 100%ตามลำดับ การทดสอบโดยวิธีMIC พบเชื้อที่สงสัยว่าผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอล 100%, 99%และ 99%ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อเหล่านี้มาทดสอบยืนยัน พบว่าทุกสายพันธุ์เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอลเมื่อทดสอบด้วย cefotaxime/clavulanate และ ceftazidime/clavulanate การทดสอบลักษณะทางจีโนทัยป์โดยใช้เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอล 30 สายพันธุ์ พบว่าทั้งหมดมียีน *intI1* และ ยีนSHV รองลงมาคือ ยีน TEM (70%), ยีน CTX-M (50%) และยีน VEB-1-like (36.7%) สำหรับยีน OXA-10-like ไม่สามารถสรุปผลการศึกษาได้เนื่องจากข้อจำกัดของการศึกษา การหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนทัยป์และฟีโนทัยป์พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางฟีโนทัยป์กับยีน SHV, ยีน CTX-M และ ยีน VEB-1-like แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับยีน TEM การศึกษาการระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล พบว่าทั้งวิธีRAPD และ Southern blot hybridization มีประสิทธิภาพเท่ากันในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *K. pneumoniae* ดังนั้นรูปแบบที่แตกต่างกันทั้ง 30 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบจึงบ่งชี้ว่าโรคติดเชื้อ *K. pneumoniae*ที่ผลิตเอนไซม์อีเอสบีแอลเกิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ที่มีอยู่ทั่วไปในโรงพยาบาลศิริราช

165 หน้า. ISBN 974-04-6984-1

STUDY OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE (ESBL)-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS

WARARAT CHIANGJONG 4736624 SIMI/M
M.Sc.(MICROBIOLOGY)
THESIS ADVISORS: SOMPORN SRIFUENGFUNG, Ph.D., CHANWIT TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D.

## ABSTRACT

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are beta-lactamases capable of conferring bacterial resistance to the penicillins, cephalosporins and aztreonam (but not cephamycins and carbapenems). ESBLs are most prevalent in *Klebsiella pneumoniae*. The purpose of the research is to determine susceptibilities of ESBL-producing *K. pneumoniae* from patients admitted to Siriraj Hospital during January-February 2004 and July-August 2005 to 5 drugs by disk diffusion method and minimum inhibitory concentrations (MICs) and to determine the ESBL genotypes in the ESBL-producing *K. pneumoniae*. The ESBL genotypes including $bla_{SHV}$, $bla_{TEM}$, $bla_{CTX\text{-}M}$, $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$, and $bla_{VEB\text{-}1\text{-}like}$ genes were detected by PCR. The comparison between genotypes and phenotypes was then studied. This study also included preliminary typing methods for epidemiological study of *K. pneumoniae* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and Southern blot hybridization with specific probe.

Both disk diffusion method and MICs were the common method for ESBL detection. For initial screen and confirmatory test, disk diffusion method and MICs were evaluated by using 100 clinical isolates of ESBL-producing *K. pneumoniae*. The isolates were suspected to be ESBL producers by cefotaxime, ceftazidime and ceftriaxone using disk diffusion method (100%, 95% and 100%, respectively) and using MICs (100%, 99% and 99%, respectively). For confirmatory test, 100% of ESBL producers were detected by cefotaxime/clavulanate or ceftazidime/clavulanate. For genotypic method, ESBL genotypes were evaluated by using the 30 ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates. There were *intI1* (100%), $bla_{SHV}$ (100%), $bla_{TEM}$ (70%), $bla_{CTX\text{-}M}$ (50%) and $bla_{VEB\text{-}1\text{-}like}$ genes (36.7%). The result from $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ gene could not be concluded without further extensive study. For the comparison between phenotypic and genotypic characteristics of the 30 ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates, phenotypes (MIC levels of cefotaxime, ceftazidime and ceftriaxone) were related with the presence of $bla_{SHV}$, $bla_{CTX\text{-}M}$, or $bla_{VEB\text{-}1\text{-}like}$ genes, but not $bla_{TEM}$ gene. For molecular epidemiology, the combined results of RAPD analysis using 3 primers were equally effective to Southern blot analysis in discrimination of clinical isolates (30 patterns in 30 isolates). These different patterns indicated that infections caused by ESBL-producing *K. pneumoniae* in Siriraj Hospital were polyclonal in nature.

KEY WORDS: EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE/ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*/ GENETIC/ RAPD

165 pp. ISBN 974-04-6984-1