

การตรวจหายีน  $bla_{OXA}$  ระดับโมเลกุล  
ในเชื้อ เอสเชอริเชีย โคลิ  
ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง

นางสาวพัชรา คุณากรธำรงค์  
นางสาวอศิราภ วีรภัทรสกุล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
พ.ศ. 2559

MOLECULAR DETECTION OF *bla*<sub>OXA</sub> GENE  
IN EXTENDED SPECTRUM BETA - LACTAMASES  
PRODUCING *ESCHERICHIA COLI*

MISS PATCHARA KUNAKORNTUMRONGRUK  
MISS AKIRA WEERAPATTARASAKUL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHARMACY  
FACULTY OF PHARMACY  
MAHIDOL UNIVERSITY

2016

โครงการพิเศษ

เรื่อง การตรวจหายีน  $bla_{OXA}$  ระดับโมเลกุลในเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล  
ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง

.....

(นางสาวพัชรา คุณากรอำรุงรักษ์)

.....

(นางสาวอศิราภี วีรภัทรสกุล)

.....

(รศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง)

อาจารย์ที่ปรึกษา

## บทคัดย่อ

### การตรวจหายีน $bla_{OXA}$ ระดับโมเลกุลในเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง

พัชรา คุณากรธำรงค์, อศิราภี วีรภัทรสกุล

อาจารย์ที่ปรึกษา : มัลลิกา ชมนาวัง\*

\* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : เอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง, เอสเชอริเชีย โคไล, ยีน  $bla_{OXA}$

อัตราการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ เอสเชอริเชีย โคไล ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง มีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษา ความชุกของยีนดื้อยา  $bla_{OXA}$  ในเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออก-ฤทธิ์กว้างในประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน โดยตัวอย่างเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง 285 ตัวอย่าง แยกได้จากส่งตรวจของผู้ป่วยติดเชื้อ จากโรงพยาบาล 5 แห่งตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ.2557 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2558 โดยนำมาคัดกรองเชื้อที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้าง ด้วยวิธี disk diffusion และทดสอบทางพีไนด์ด้วยวิธี double disk ตามที่ Clinical and Laboratory Standards Institute 2016 (CLSI) แนะนำ จากนั้นนำมาทดสอบการปรากฏของยีน  $bla_{OXA}$  ของ OXA cluster 2 และ 10 ด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน และตรวจสอบลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลของยีนที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้า ซึ่งจากการทดลองพบความชุกของยีน  $bla_{OXA}$  อยู่ในอัตราที่ต่ำมาก คิดเป็นร้อยละ 0.35 โดยพบยีน  $bla_{OXA}$  จำนวน 1 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลในภาคกลาง ซึ่งเป็นชนิด OXA cluster 10 และไม่พบตัวอย่างที่มียีนชนิด OXA cluster 2 จากนั้นมีการส่งยีนลำดับเบสพบว่าเป็นยีน  $bla_{OXA-10}$  จากข้อมูลเป็นการยืนยันได้ว่า ยีน  $bla_{OXA}$  มีการแพร่กระจายน้อยในเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ที่สร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ชนิดออกฤทธิ์กว้างในประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานการศึกษา ยีน  $bla_{OXA}$  ในเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล อยู่ไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้แสดงให้เห็นการปรากฏของยีนชนิด OXA จึงควรมีการศึกษา ยีนชนิดนี้ในอนาคตต่อไป

## Abstract

### Molecular detection of *bla*<sub>OXA</sub> gene in ESBL- producing *Escherichia coli*

Patchara Kunakorntrumrongruk, Akira Weerapattarasakul

Project advisor : Mullika Chomnawang\*

\*Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Key words:** extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), *Escherichia coli*, *bla*<sub>OXA</sub> gene

Extended spectrum  $\beta$  - lactamases (ESBLs) - producing *Escherichia coli* are increasing rapidly and bringing a serious threat to currently available antibiotics worldwide. This study was aimed to investigate the prevalence of *bla*<sub>OXA</sub> genes in of ESBLs-producing *E. coli* in Thailand with the specifically designed PCR primers. A total of 285 isolates of ESBLs-producing *E. coli* obtained from five regions in Thailand from June 2014 to June 2015. ESBLs production of these isolates were examined by disk diffusion method. Phenotypic confirmation was performed by double disk test recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute 2016 (CLSI). Molecular detection of 2 types of *bla*<sub>OXA</sub> genes (OXA cluster 2 and 10) was performed using polymerase chain reaction (PCR) technique with specific primers for each gene and was confirmed by DNA sequencing. The results showed that the prevalence of *bla*<sub>OXA</sub> gene was very low rate at about 0.35%. The OXA cluster 10 was found on a single isolate from the central region and none of isolates were positive for OXA cluster 2. DNA sequencing provided the confirmatory data that the PCR product was *bla*<sub>OXA-10</sub> gene. This data confirmed that there are currently very few epidemiologic data on the geographical spread of OXA-type ESBLs in *E. coli* in Thailand. Nonetheless, the result of this study showed existed OXA-type ESBLs in Thailand which could be closely observed in the future.