

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจหาเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายและแอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมสในเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียชื้อ

พจมาน ผู้มีสัตย์¹ ปิยะรัตน์ จิตรภิมย์¹ และ เกรียงศักดิ์ มีพันธ์²

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

²หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลราชวิทยาลัย

บทคัดย่อ กลไกสำคัญที่เชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียชื้อดื้อต่อสารต้านจุลชีพ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส ชนิดฤทธิ์ขยายและแอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส **วัตถุประสงค์** เพื่อตรวจหาเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียชื้อที่สร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายและแอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลวชิรพยาบาล กรุงเทพมหานคร **วิธีการศึกษา** เชื้อที่ศึกษาแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ จำนวน 400 ไอโซเลท นำมาตรวจหาการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายโดยวิธี double disc synergy test และตรวจหาเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส โดยวิธี AmpC disc test **ผลการศึกษา** พบเชื้อที่สร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส ชนิดฤทธิ์ขยาย จำนวน 170 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 42.5 เชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.3 พบเชื้อที่สร้างทั้งเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายและ แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส จำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.8

Keywords: ● เอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย ● เอนเทอโรแบคทีเรียชื้อ ● แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส

เวชสารแพทย์ทหารบก 2558;68:165-71.

บทนำ

ปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มบีตา-แลคแทม (β-lactam) พบมากในเชื้อกลุ่มแกรมลบ รูปแท่ง รวมทั้งกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียชื้อ (*Enterobacteriaceae*) โดยเชื้อสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส (β-lactamase) มาทำลายยาซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนบีตา-แลคแทม (β-lactam ring) เช่น เพนิซิลลิน (penicillin) และเซฟาโลสปอรินส์ (cephalosporins) เอนไซม์กลุ่มนี้มีหลายชนิด ชนิดที่มีความสำคัญ คือ เอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (Extended-Spectrum β-lactamase; ESBL) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มบีตา-แลคแทมทั้งหมด ยกเว้นยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ (carbapenems) และเซฟาไมซิน (cephamycin) โดยเชื้อที่มักพบว่ามีโครงสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Klebsiella spp*¹ ปัจจุบันพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL

ที่แยกได้จากผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น และพบได้ทั่วโลก เช่น พบเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 4.8, 8.5 และมากกว่าร้อยละ 12 ในประเทศเกาหลี ไต้หวัน และฮ่องกงตามลำดับ² สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยการสร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 53.4 และ 53.6 ตามลำดับ³ นอกเหนือจากเอนไซม์ ESBL แล้ว ได้มีการค้นพบเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิด แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส (AmpC β-lactamase) ซึ่งสามารถทำลายยาเพนิซิลลิน ยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินส์ รุ่นที่ 3 โมโนแบคแทม (monobactam) เชซทรีโอแนม (aztreonam) และที่แตกต่างจากเอนไซม์ ESBL คือเอนไซม์นี้สามารถทำลายยาเซฟาไมซินได้และไม่ถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส (β-lactamase inhibitors) ชนิดกรดคลาวูลานิก (clavulanic acid)⁴ โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส พบได้บนโครโมโซมในเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียชื้อ บางชนิด เช่น *Enterobacter spp*, *Shigella spp*, *Providencia spp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 8 กรกฎาคม 2558 ได้ตีพิมพ์เมื่อ 28 สิงหาคม 2558

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พจมาน ผู้มีสัตย์ ¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา อาคาร 9 ซอยอัสสัมชัญ 15 แขวงศิริราช เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

และ *E. coli*^{5,6} อย่างไรก็ตามยีนดื้อยาชนิดนี้สามารถถ่ายทอดผ่านทางพลาสมิด (plasmid-mediated AmpC β -lactamase) จึงทำให้เชื้อบางชนิด เช่น *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp. และ *Proteus mirabilis* สร้างเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมสได้ในปัจจุบันพบความชุกของเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมสได้หลายพื้นที่ เช่น อินเดีย สาธารณรัฐเซเชลล์ ร้อยละ 24 และ 1.1 ตามลำดับ^{7,8} รวมทั้งประเทศไทย โดยพบในเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 5.13 นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันอีกด้วย⁹ ซึ่งเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมสได้นั้นจะบดบังการตรวจหาเอนไซม์ ESBL โดยจะทำให้ตรวจไม่พบการสร้างเอนไซม์ ESBL¹⁰ การตรวจโดยใช้กรดคลาวูลานิก ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL นั้นไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมสได้ จึงทำให้ตรวจไม่พบการดื้อยาของเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมส อีกทั้งยังไม่มีวิธีที่ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) แนะนำ ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์หลายคณะจึงศึกษาหาวิธีการตรวจหาแอมเพซซี บีตา-แลคทาเมส เช่น AmpC disc test, disc antagonism test, modified three-dimensional test, inhibitor-based method เป็นต้น¹¹ โดยสารยับยั้งเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมส ที่ใช้แทนกรดคลาวูลานิก ได้แก่ กรดโบโรนิก (boronic acid) นอกจากนี้ยังมีผู้นำยาเซฟิพิม (cefepime) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร่วมกับแอมเพซซี บีตา-แลคทาเมส อีกด้วย¹² ด้วยเหตุผลดังกล่าว หากห้องปฏิบัติการทำการตรวจหาเฉพาะเอนไซม์ ESBL เพียงอย่างเดียว อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการรักษาได้ เนื่องจากอาจเกิดผลลบปลอม (false negative) เพราะหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันเป็นไปได้ก็เชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมเพซซี บีตา-แลคทาเมส จะบดบังการตรวจหาเอนไซม์ ESBL หากตรวจโดยใช้กรดคลาวูลานิก จึงตรวจหาเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยการสร้างเอนไซม์ ESBL และ/หรือแอมเพซซี บีตา-แลคทาเมส ซึ่งนอกเหนือจากเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* แล้ว เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ก็สามารถพบได้ในเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกัน ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับใช้เป็นแนวทางในการรักษา การเฝ้าระวังเชื้อดื้อสารต้านจุลชีพ และรับมือกับเชื้อดื้อสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันได้ทันทั่วทั้ง

วัสดุและวิธีการ

เชื้อตัวอย่าง

เชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชราช จำนวน 400 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ *Enterobacter cloacae* จำนวน 21 ไอโซเลท *Enterobacter aerogenes* จำนวน 4 ไอโซเลท *K. pneumoniae* จำนวน 110 ไอโซเลท *K. ozanae* จำนวน 4 ไอโซเลท *E. coli* จำนวน 216 ไอโซเลท *P. mirabilis* จำนวน 14 ไอโซเลท *Proteus vulgaris* จำนวน 2 ไอโซเลท *Citrobacter diversus* จำนวน 5 ไอโซเลท *C. freundii* จำนวน 4 ไอโซเลท *Citrobacter amalonaticus* จำนวน 2 ไอโซเลท *Shigella* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท *Morganella morganii* จำนวน 2 ไอโซเลท *Serratia marcescens* จำนวน 2 ไอโซเลท *Providencia stuartii* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Salmonella* spp. 11 ไอโซเลท แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ เสมหะ (sputum) ปัสสาวะช่วงกลาง (midstream urine) ปัสสาวะจากสายสวน (catheterized urine) น้ำดี (bile) เลือด (blood) หนอง (pus) บาดแผล (wound) อุจจาระ (stool) น้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage) และสิ่งส่งตรวจที่ป้ายจากปากมดลูก (cervical swab)

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียจากคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชราช ถูกนำมาวินิจฉัยเชื้อโดยการทดสอบทางชีวเคมีอีกครั้ง ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

1. การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี double disc synergy test

นำเชื้อในกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียที่ได้รับความชุ่มชื้นให้ได้ที่ 0.5 McFarland โดยใช้เครื่องวัดความชุ่มชื้นของสารละลาย (Densitometer) จากนั้นนำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab) จุ่มลงไป ปิดข้างหลอดพอหมาด นำไปป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) ให้เป็นสนามเชื้อ วางแผ่นยา Amoxicillin/clavulanate (AMX/clo) (20/10 ไมโครกรัม) ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แล้ววางแผ่นยาเซฟาซิดิม (ceftazidime) (30 ไมโครกรัม) เซฟโดซิม (cefepodoxime) (10 ไมโครกรัม) เซฟไตรอะซอน (ceftriaxone) (30 ไมโครกรัม)

เซฟทาซิม (cefotaxime) (30 ไมโครกรัม) ให้ห่างจากขอบแผ่นยา AMX/clo 20 มิลลิเมตร บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ดูวงใสที่ถูกยับยั้ง โดยด้านที่ใกล้กับ AMX/clo จะขยายออกไปจากวงปกติซึ่งเกิดจากการเสริมฤทธิ์ของกรดคลาวูลานิก แปลผลเป็นบวก แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL

ในการทดลองนี้ใช้เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และใช้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ ESBL เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control)

2. การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส

ปรับเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MacFarland โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นของสารละลาย (Densitometer) จากนั้นป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้เป็นสนามเชื้อ วางแผ่นยาเซฟลอกซิทิน (30 ไมโครกรัม) บ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ถ้ามีขนาด ≤ 18 มิลลิเมตร แสดงว่าให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส¹³ อย่างไรก็ตามเชื้อที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจคัดกรองจะนำมาตรวจหาการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส โดยวิธี AmpC disc test ต่อไป

3. การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ AmpC- β -lactamase โดยวิธี AmpC disc test

3.1 การเตรียม AmpC disc

ผสมน้ำเกลือ (Normal saline solution) 1 ส่วน ต่อ 100x Tris-EDTA 1 ส่วน นำมา 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อ (sterile blank disc) ที่งอไว้ให้แห้ง เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาใช้ให้หยดน้ำเกลือ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อที่จะทดสอบหลายๆ โคโลนีป้ายลงบน AmpC disc ที่เตรียมไว้เพื่อให้เอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส ที่อยู่ภายในเซลล์หลั่งออกมานอกเซลล์

3.2 การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase

ปรับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland (เชื้อไวต่อยาเซฟลอกซิทิน) โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นของสารละลาย (Densitometer) ป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้เป็นสนามเชื้อ วางแผ่นยาเซฟลอกซิทิน (30 ไมโครกรัม)

ลงไป นำ AmpC disc ที่ป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้ว วางให้ใกล้ขอบของแผ่นยาเซฟลอกซิทินมากที่สุด บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ได้ จะทำลายยาเซฟลอกซิทินที่นำมาทดสอบ ซึ่งจะทำให้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เจริญได้ จึงเห็นลักษณะของ inhibition zone เป็นรูป clover-leaf แสดงว่าเชื้อที่อยู่บน AmpC disc นั้นสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส แปลผลเป็นบวก⁵

ในการทดลองนี้ใช้เชื้อ *E. cloacae* ATCC BAA-1143 ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และใช้เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ โดยผลที่ได้เป็นการตรวจพบการสร้างเอนไซม์หรือไม่พบการสร้างเอนไซม์ที่ศึกษา และนำเสนอข้อมูลเป็นร้อยละ

ผลการวิจัย

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย

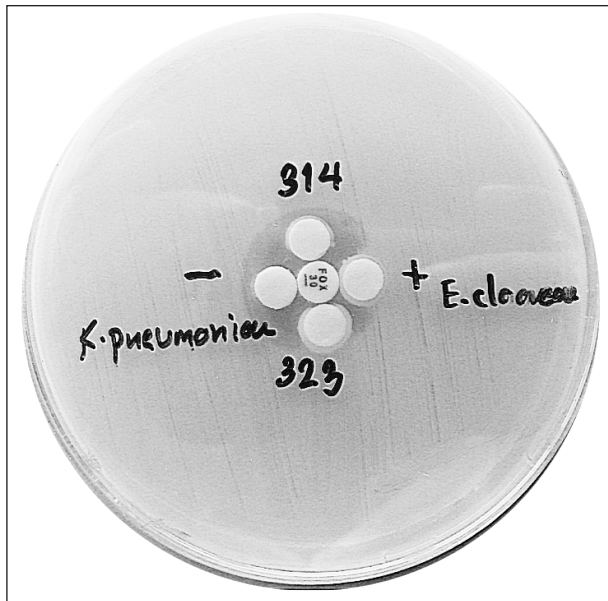
เมื่อนำเชื้อในกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซึ่งทั้ง 400 ไอโซเลท มาทดสอบหาการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย พบว่ามีเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 170 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 42.5 โดยพบในเชื้อ *E. coli* จำนวน 118 ไอโซเลท *E. cloacae* จำนวน 10 ไอโซเลท *K. pneumoniae* จำนวน 37 ไอโซเลท *Salmonella* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท *K. ozaenae* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *E. aerogenes* จำนวน 1 ไอโซเลท

การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส

เมื่อนำเชื้อในกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซึ่งทั้ง 400 ไอโซเลท มาตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส โดยการวางแผ่นยาเซฟลอกซิทิน พบว่ามีเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองทั้งสิ้น 71 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 17.8 ดังตารางที่ 1

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส โดยวิธี AmpC disc test

เป็นการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์แอมเพซี้ บีตา-แลคทาเมส โดยการวางแผ่นยาเซฟลอกซิทิน ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มีเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ป้ายอยู่ นำ AmpC disc ที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบมาวางใกล้แผ่นยาเซฟลอกซิทินมากที่สุด โดยที่แผ่น



รูปที่ 1 การทดสอบ AmpC disc เชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบคือ *E. cloacae* และหมายเลข 323 เชื้อที่ให้ผลลบต่อการทดสอบคือเชื้อ *K. pneumoniae* และหมายเลข 314

AmpC disc จะมี Tris-EDTA อยู่ ทำให้เอนไซม์แอมเพซี บีตา-แลคทาเมส หลั่งออกมาทำลายฤทธิ์ยาเซฟลอกซิทิน เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 จึงสามารถเจริญได้ จะมองเห็นการเจริญเข้าไปใกล้แผ่นยาเซฟลอกซิทิน ดังรูปที่ 1 จากการทดลองพบว่าเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบนี้มีจำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.3 ซึ่งเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ ได้แก่ *E. cloacae* จำนวน 8 ไอโซเลท *E. coli* จำนวน 7 ไอโซเลท *E. aerogenes* จำนวน 1 ไอโซเลท *P. mirabilis* จำนวน 1 ไอโซเลท *C. diversus* จำนวน 1 ไอโซเลท *C. freundii* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *P. stuartii* จำนวน 1 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อที่มีผลการตรวจคัดกรองเป็นบวก จำนวน 19 ไอโซเลท และให้ผลลบต่อการตรวจคัดกรองจำนวน 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้พบเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL และ แอมเพซี บีตา-แลคทาเมส ทั้งสิ้น 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.8 โดยพบในเชื้อ *E. cloacae* จำนวน 3 ไอโซเลท และ *E. coli* จำนวน 4 ไอโซเลท

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาพบว่าเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBL ทั้งสิ้น 170 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 42.5 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Sankar และคณะ ในประเทศอินเดีย ซึ่ง

ตารางที่ 1 ผลการตรวจคัดกรองและการตรวจหาการสร้างเอนไซม์แอมเพซี บีตา-แลคทาเมสโดยวิธี AmpC disc test

การตรวจคัดกรอง	AmpC disc test
AmpC screening positive (n = 71)	19
AmpC screening negative (n = 329)	2
Total (400)	21 (5.3%)

พบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียอี ร้อยละ 48.50¹⁴ จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าโดยส่วนใหญ่จะพบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 118 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 54.6 (118/216) ของเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศเกาหลี ที่พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 45.3¹⁵ ใกล้เคียงกับการศึกษาในโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 56.9¹⁶ และพบในเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 37 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 33.6 (37/110) ของเชื้อ *K. pneumoniae* ทั้งหมด สอดคล้องกับการศึกษาการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 32.0¹⁷ และใกล้เคียงกับการศึกษาในโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ร้อยละ 33.3¹⁶

จากการตรวจคัดกรองเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์แอมเพซี บีตา-แลคทาเมส โดยใช้ยาเซฟลอกซิทิน ซึ่งเป็นยาในกลุ่มเซฟาไมซิน พบมีเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง แต่เมื่อนำมาตรวจยืนยันโดยวิธี AmpC disc test พบว่าให้ผลเป็นลบ อาจเกิดจากเชือดังกล่าวมีกลไกการดื้อยาอื่นๆ เช่น การสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดอื่นๆ ที่ทำลายยาในกลุ่มเซฟาไมซินได้ หรือเกิดจากการลดความสามารถในการผ่านเข้าออกของเมมเบรนภายนอก (outer membrane permeability) ทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ หรือการนำยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) การลดปริมาณพอร์นินส์ เป็นต้น¹⁸⁻²⁰ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Grover และคณะ ที่พบเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. mirabilis* ที่ดื้อต่อยาเซฟลอกซิทิน และไม่สร้างเอนไซม์แอมเพซี บีตา-แลคทาเมส²⁰ อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยมีเชื้อที่ให้ผลลบต่อการตรวจคัดกรอง แต่พบมีการสร้างเอนไซม์แอมเพซี บีตา-แลคทาเมส จำนวน 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) อาจเกิดจากชนิดของเอนไซม์แอมเพซี บีตา-แลคทาเมส ซึ่งมีความไวต่อยาเซฟลอกซิทินแตกต่างกัน^{21,22}

วิธี AmpC disc เป็นวิธีที่นำเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงบนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ที่มีสารอีดีทีเอ (Tris-ethylene-diaminetetra acetic; Tris-EDTA) อยู่ หากเชื้อใดที่มีการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมสได้ ก็จะสามารถหลั่งออกมาทำลายยาเซฟลอกซิทิน ทำให้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 สามารถเจริญรอบแผ่นยาได้ จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อจำนวน 21 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบนี้ ซึ่งวิธี AmpC disc test เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส ที่มีลักษณะแบบ plasmid-mediated AmpC beta-lactamase⁵ แต่จากผลการวิจัยของผู้วิจัยในครั้งนี้ เชื้อส่วนใหญ่ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบนี้คือกลุ่ม chromosomal-mediated beta-lactamase ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี AmpC disc test นี้ก็สามารถตรวจหาเชื้อที่มีการสร้างแอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส แบบ chromosomal-mediated ที่มีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณมากได้¹⁸

ในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมสสามารถใช้หลักการเดียวกับการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL นั่นคือการใช้สารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์นั้นๆ เช่น กรดโบโรนิก (phenylboronic acid หรือ 3-aminophenylboronic acid) มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส²³ อย่างไรก็ตามยาคลอสซาซิลิน (cloxacillin) และยาเซฟิพิม (cefepime) ก็สามารถยับยั้งเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมสได้¹⁸ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการใช้กรดโบโรนิกคือ อาจมีเอนไซม์บางชนิดที่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยกรดโบโรนิก จึงต้องแปลผลด้วยความระมัดระวัง¹⁸

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการที่เชื้อสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมสนั้น มีผลต่อการตรวจหาเอนไซม์ ESBL เนื่องจากในการตรวจหาเอนไซม์ ESBL จะใช้กรดคลอวูลานิกเป็นสารยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส ดังนั้นควรมีการนำยาเซฟิพิมมาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกัน เนื่องจากเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส จะไวต่อยาเซฟิพิมซึ่งเป็นยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4 ในขณะที่ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ ESBL^{7,24}

โรคติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในปัจจุบัน เกิดขึ้นทั้งในชุมชนและในโรงพยาบาล โดยโรคติดเชื้อที่เกิดในโรงพยาบาลมีความชุกของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่าโรคติดเชื้อในชุมชน²⁵ ซึ่งส่วน

ใหญ่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital-acquired infections) ที่สำคัญคือการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยการสร้างเอนไซม์ ESBL นั้นเอง ซึ่งจากผลการวิจัยในครั้งนี้พบการสร้างเอนไซม์ ESBL สูงถึงร้อยละ 42.5 และหากเชื้อมีการดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แลคทาเมส ก็ยิ่งส่งผลกระทบต่อการรักษาเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการควบคุมและการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานการณ์ของการระบาดของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ และข้อมูลจากการเฝ้าระวังนี้ยังใช้เป็นแนวทางการใช้สารต้านจุลชีพสำหรับรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อ นอกจากนี้สถานพยาบาลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคติดเชื้อให้มีคุณภาพ โดยเฉพาะการวินิจฉัยโรคติดเชื้อทางห้องปฏิบัติการที่สามารถวินิจฉัยโรคติดเชื้อได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว เพื่อใช้เป็นแนวทางในการงดหรือลดการใช้สารต้านจุลชีพโดยไม่จำเป็น และเพิ่มคุณภาพการรักษาโรคติดเชื้อที่จำเป็นต้องได้รับสารต้านจุลชีพให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถป้องกันและควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพได้ และที่สำคัญสถานพยาบาลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการกำหนดมาตรการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในสถานพยาบาล ทั้งมาตรการทั่วไป เช่น การล้างมือ และมาตรการเฉพาะตามประเภทของผู้ป่วย เช่น contact precaution อย่างเป็นระบบและง่ายต่อการปฏิบัติด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชินี เลขที่โครงการ 058/54

เอกสารอ้างอิง

1. Pitout JD, Nordmann P, Laupland Kb, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:52-59.
2. 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.

3. Jitsurong S, Yodsawat J. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced in blood isolates of gram-negative bacteria in a teaching hospital in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:131-135.
4. Hanson ND. AmpC β -lactamases: what do we need to know for the future? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52:2-4.
5. Black JA, Moland Es, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005;43:3110-3.
6. Upadhyay S, Sen Mr, Bhattacharjee A. Presence of different beta-lactamase classes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* expressing AmpC beta-lactamase enzyme. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:239-242.
7. Sinha P, Sharma R, Rishi S, Sharma R, Sood S, Pathak D. Prevalence of extended spectrum beta lactamase and AmpC beta lactamase producers among *Escherichia coli* isolates in a tertiary care hospital in Jaipur. *Indian J Patho Microbiol* 2008; 51:367-669.
8. Husickova V, Chroma M, Kolar M, Hricova K, Stosova T, Kantor L, et al. Analysis of ESBL- and AmpC-positive Enterobacteriaceae at the Department of Neonatology, University Hospital Olomouc. *Curr Microbiol* 2011;62:1664-70.
9. ศิริลักษณ์ ชีระภุร, สุรกิจ หน่อคำหล้า, ศรีญา สถาน, สุนัยนุช บัวดี. ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL และ AmpC beta-lactamase ด้วยวิธี inhibitor Based. *พุทธชินราชเวชสาร* 2553;27:212-7.
10. Bell JM, Chitsaz M, Turnidge JD, Barton M, Walters LJ, Jones RN. Prevalence and Significance of a Negative Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Confirmation Test Result after a Positive ESBL Screening Test Result for Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2007;45:1478-82.
11. Manchanda V, Singh NP. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:415-8.
12. Gupta V, Singla N, Chander J. Detection of ESBLs using third & fourth generation cephalosporins in double disc synergy test. *Indian J Med Res* 2007;126:486-7.
13. Polsfuss S, Bloemberg Gv, Giger J, Meyer V, Bottger Ec, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011;49:2798-803.
14. Sanger S, Narayanan H, Kuppanan S, Nandagopal B. Frequency of extended-spectrum beta lactamase (ESBL)-producing Gram-negative bacilli in a 200-bed multi-specialty hospital in Vellore district, Tamil Nadu, India. *Infection* 2012;40:425-9.
15. Yoo JS, Byeon J, Yang J, Yoo JI, Chung GT, Lee YS. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from long-term care facilities in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:261-5.
16. Chayakulkeeree M, Junsriwong P, Keerasuntonpong A, Tribudharat C, Thamlikitkul V. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacilli at Siriraj Hospital, Thailand, 2003. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36:1503-9.
17. Ingviya N, Hortiwakul R, Chayakul P, Thamjarugwong B. Prevalence and susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing extended spectrum beta-lactamase in Sngklanagarind Hospital, Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 2003;20:127-34.
18. ภัสราชัย กิตติสิน, อนุชา อภิสารธนรักษ์. Beta-lactamases ในแบคทีเรียแกรมลบ จากความรู้พื้นฐานสู่เวชปฏิบัติ. กรุงเทพฯ: วี.เจ.พรินติ้ง, 2555.
19. Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001;7:333-6.
20. Grover N, Sahni AK, Bhattacharya S. Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. *Med J Armed Forces India* 2013;69:4-10.
21. Gokul BN, Menezes GA, Harish BN. ACC-1 β -Lactamase-producing *Salmonella enterica* Serovar Typhi, India. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1170-1.
22. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1924-31.
23. Su WY, Gottlieb T, Merlino J. Optimal phenotypic testing of AmpC beta-lactamases using boronic acid solutions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:49-51.
24. Mohanty S, Gaiand R, Ranjan R, Deb M. Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *J Infect Dev Ctries* 2009;21:24-9.
25. วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. การดื้อยาด้านจุลชีพ : ความสำคัญต่อระบบสุขภาพ. เวชบัณฑิตยสาร. 2554;4:93-7.

Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and AmpC Beta-Lactamase in *Enterobacteriaceae*

Potjaman Pumeesat¹, Piyarat Chitpirom¹ and Kriangsak Miphan².

¹Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdej Chaopraya Rajabhat University;

²Microbiology, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University.

Abstract: The crucial antibiotic resistant mechanism of *Enterobacteriaceae* is the production of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase. The aimed of this study was to investigate ESBL and AmpC beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* isolated from patients in Vajira Hospital, Bangkok.

Method: A total of 400 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* were examined for ESBL production by double disc synergy test and AmpC-producing strains were detected by AmpC disc test. **Results:** ESBL and AmpC - producing *Enterobacteriaceae* were 170 isolates (42.5%) and 21 isolates (5.3%), respectively. This study also found 7 isolates (1.8%) produced both ESBL and AmpC beta-lactamase.

Keywords: ● AmpC β -lactamase ● *Enterobacteriaceae* ● Extended-Spectrum ● β -lactamase

RTA Med J 2015;68:165-71.

